

Veljača 2023.

Upute za uporabu za PAXgene[®] Blood RNA Kit (Priručnik)



Verzija 3 (V3)

IVD

Za in vitro dijagnostičku uporabu



REF

762174



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

Proizvodi QIAGEN[®] GmbH za PreAnalytiX GmbH

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NJEMAČKA

R2

MAT

1130774HR

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

PreAnalytiX GmbH, 8634 Hombrechtikon, CH.

© 2023 PreAnalytiX GmbH. PreAnalytiX, logotip PreAnalytiX i svi drugi zaštitni znakovi u vlasništvu su društva PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH, osim ako nije drukčije navedeno.

Ugovor o ograničenoj licenciji za PAXgene Blood RNA Kit

Uporabom ovog proizvoda svaki kupac ili korisnik proizvoda pristaje na sljedeće uvjete:

1. Proizvod se može upotrebljavati samo u skladu s protokolima koji su isporučeni s proizvodom i ovim priručnikom i namijenjen je samo za uporabu s komponentama koje su sadržane na panelu. PreAnalytiX® u okviru svojeg intelektualnog vlasništva ne daje nikakvu licenciju za uporabu ili ugrađivanje komponenata ovog panela s bilo kojom komponentom koja nije sadržana u ovom panelu, osim kako je opisano u protokolima koji su isporučeni s proizvodom, koji se nalaze u ovom priručniku i drugim protokolima dostupnima na web-mjestu www.qiagen.com i www.prealanalytix.com.
2. Osim izričito navedenih licencija, društvo PreAnalytiX ne jamči da ovaj komplet i/ili njegova uporaba ne krše prava trećih strana.
3. Ovaj komplet licenciran je samo za jednokratnu uporabu i ne smije se ponovno upotrebljavati, prerađivati niti preprodavati.
4. Društvo PreAnalytiX odriče se svih drugih licencija, izričitih ili impliciranih, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik kompleta potvrđuju da neće poduzeti niti dopustiti drugim osobama poduzimanje koraka koji bi mogli dovesti do kršenja prethodno navedenih odredbi ili omogućiti njihovo kršenje.
6. Društvo PreAnalytiX može provesti zabrane navedene u ovom Ugovoru o ograničenoj licenciji na bilo kojem sudu te će potraživati sve sudske troškove i troškove postupka istraživanja, uključujući troškove odvjetnika, za svaku radnju s ciljem provedbe ovog Ugovora o ograničenoj licenciji ili bilo kojeg svojeg prava intelektualnog vlasništva povezanog s kompletom i/ili njegovim komponentama.

Ažurirane uvjete licencije potražite na www.qiagen.com i www.prealanalytix.com.

HB-3009-002 BD-8945 1130774HR © 2023 PreAnalytiX GmbH, sva prava pridržana.

Distributeri proizvoda društva PreAnalytiX

Proizvode društva PreAnalytiX za PreAnalytiX proizvode i distribuiraju QIAGEN i BD.

Sadržaj

Sadržaj.....	3
Predviđena uporaba	6
Predviđeni korisnik.....	6
Opis i načelo	7
Uvod	7
Načelo i postupak	7
Prikupljanje i stabilizacija uzoraka	8
Izolacija RNK.....	8
Ručna izolacija RNK.....	9
Automatizirana izolacija RNK.....	11
Uključeni materijali.....	14
Sadržaj kompleta	14
Dijelovi kompleta	15
Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni	16
Za sve protokole.....	16
Za ručni protokol.....	16
Za automatizirani protokol	17
Upozorenja i mjere opreza	18
Sigurnosne informacije	18
Podaci o kontaktu za hitne slučajeve	18
Mjere opreza	19
Pohrana i rukovanje reagensima	22

Stabilnost tijekom uporabe	22
Prikupljanje, pohrana i rukovanje ispitcima	23
Protokol: ručna izolacija ukupne RNK iz ljudske pune krvi prikupljene u epruветama PAXgene Blood RNA Tubes	24
Protokol: automatizirana izolacija ukupne RNK iz ljudske pune krvi prikupljene u epruветama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	31
Ograničenja uporabe proizvoda	39
Kontrola kvalitete	39
Radne značajke	40
Prikupljanje i stabilizacija uzoraka	40
Ručna izolacija RNK.....	45
Automatizirana izolacija RNK.....	53
Stabilnost izolirane RNK.....	56
Važne napomene	57
Uporaba instrumenta QIAcube Connect MDx.....	57
Pokretanje instrumenta QIAcube Connect MDx	57
Instaliranje protokola na instrument QIAcube Connect MDx	59
Punjenje instrumenta QIAcube Connect MDx	60
Spin kolone (PSC, PRC), epruвета za mikrocentrifugu i plastični pribor instrumenta QIAcube Connect MDx.....	63
Zbrinjavanje	69
Literatura.....	70
Vodič za rješavanje problema	71
Simboli.....	73
Kontaktни podaci	75

Dodatak A: Opće napomene o postupanju s RNK	76
Dodatak B: Kvantifikacija i određivanje kvalitete ukupne RNK	77
Dodatak C: Rukovanje epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	79
Informacije za naručivanje	81
Povijest revizija dokumenta	83

Predviđena uporaba

Za in vitro dijagnostičku uporabu.

PAXgene Blood RNA System sastoji se od epruveta za prikupljanje krvi (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) i kompleta za pročišćavanje nukleinske kiseline (PAXgene Blood RNA Kit). Namijenjen je za prikupljanje, pohranu i prijenos krvi i stabilizaciju unutarstanične RNK u zatvorenoj epruveti te naknadnu izolaciju i pročišćavanje RNK domaćina iz pune krvi za RT-PCR koji se upotrebljava u molekularnom dijagnostičkom testiranju.

Značajke radnog učinka sustava PAXgene Blood RNA System utvrđene su samo s genskim transkriptima FOS i IL1B. Korisnik je odgovoran za utvrđivanje odgovarajućih značajki radnog učinka sustava PAXgene Blood RNA System za druge ciljne transkripte.

Indikacije za upotrebu

Komplet PAXgene Blood RNA Kit služi za pročišćavanje unutarstanične RNK iz pune krvi prikupljene u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Kada se komplet upotrebljava u kombinaciji s epruvetom PAXgene Blood RNA Tube (BRT), sustav pruža pročišćenu unutarstaničnu RNK iz pune krvi za reakciju RT-PCR koja se upotrebljava u molekularnom dijagnostičkom testiranju.

Predviđeni korisnik

Ovaj proizvod namijenjen je uporabi za profesionalne korisnike, primjerice tehničare i liječnike koji su obučeni za in vitro dijagnostičke postupke.

Ovaj komplet namijenjen je za profesionalnu uporabu.

Opis i načelo

Uvod

Prikupljanje pune krvi prvi je korak u mnogim molekularnim ispitivanjima kojima se proučava stanična RNK. Međutim, veliki problem u takvim eksperimentima predstavlja nestabilnost profila stanične RNK in vitro. Istraživanja društva PreAnalytiX pokazala su da se broj kopija pojedinačnih vrsta mRNK u punoj krvi može promijeniti za više od 1000 puta tijekom pohrane ili transporta pri sobnoj temperaturi (Rainen et al., 2002). Te su promjene uzrokovane brзом degradacijom RNK i induciranom ekspresijom određenih gena nakon prikupljanja uzorka krvi. Takve promjene u profilu ekspresije RNK onemogućuju pouzdana ispitivanja ekspresije gena. Stoga je metoda kojom bi se očuvao profil ekspresije RNK tijekom i nakon flebotomije ključna za točnu analizu ekspresije gena u ljudskoj punoj krvi.

Načelo i postupak

Društvo PreAnalytiX razvilo je sustav koji omogućava prikupljanje, stabilizaciju, pohranu i transport ispitaka ljudske pune krvi, uz brz i učinkovit protokol za izolaciju unutarstanične RNK. Za sustav je potrebna uporaba epruveta PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) za prikupljanje krvi i stabilizaciju RNK, nakon čega slijedi ručna ili automatizirana izolacija RNK s pomoću kompleta PAXgene Blood RNA Kit. Ručni i automatizirani protokoli pružaju u suštini jednak radni učinak s obzirom na kvalitetu i prinos RNK. Podaci o radnom učinku za ručni protokol (počevši od stranice 45) i automatizirani protokol (počevši od stranice 53) uključeni su u ovaj priručnik.

PAXgene Blood RNA System omogućuje standardizaciju koraka predanalitičkog tijeka rada od prikupljanja ispitka krvi do izolacije stanične RNK u skladu s normom ISO 20186-1:2019, Molekularna in vitro dijagnostička ispitivanja – Specifikacije za procese prije ispitivanja za vensku punu krv – 1. dio: Izolirana stanična RNK.

Prikupljanje i stabilizacija uzoraka

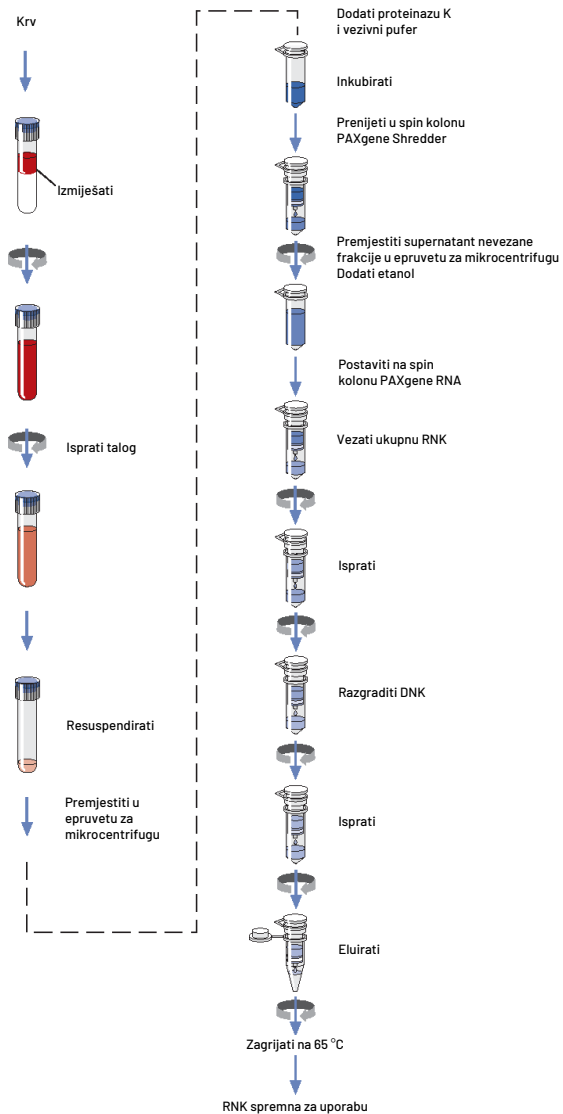
Epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) sadržavaju vlasnički reagens za stabilizaciju RNK. Taj aditiv štiti molekule RNK od degradacije RNazama i umanjuje ex vivo promjene u ekspresiji gena. Značajke radnog učinka sustava PAXgene Blood RNA utvrđene su s genskim transkriptima FOS i IL1B koji se mogu pregledati počevši od stranice 40.

Izolacija RNK

Komplet PAXgene Blood RNA Kit služi za izolaciju ukupne RNK iz 2,5 ml ljudske pune krvi prikupljene s pomoću epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Postupak je jednostavan i može se provesti s pomoću ručnih ili automatiziranih protokola (pogledajte sliku 1 ili sliku 3, stranica 10. ili 12.). U oba protokola izolacija počinje korakom centrifugiranja za stvaranje taloga nukleinskih kiselina u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Talog se ispiri i resuspendira, nakon čega slijedi ručna ili automatizirana izolacija RNK. U načelu, oba protokola slijede jednake korake protokola koji uključuju jednake komponente kompleta.

Ručna izolacija RNK

Resuspendirani talog inkubira se u optimiziranim puferima zajedno s proteinazom K (PK) kako bi došlo do razgradnje proteina. Provodi se dodatno centrifugiranje s pomoću spin kolone PAXgene Shredder (PSC) kako bi se homogenizirao lizat stanica te uklonio preostali stanični ostatak, a supernatant nevezane frakcije (engl. flow-through fraction) prenosi se u novu epruvetu za mikrocentrifugu (MCT). Dodaje se etanol kako bi se prilagodili uvjeti vezanja te se lizat postavlja u spin kolonu PAXgene RNA (PRC). Tijekom kratkog centrifugiranja RNK se selektivno veže na membranu od silika-gela PAXgene, dok kontaminanti prolaze kroz membranu. Preostali kontaminanti se uklanjaju u nekoliko učinkovitih koraka ispiranja. Između prvog i drugog koraka ispiranja membrana se tretira DNazom I (RNFD) kako bi se uklonile količine vezane DNK u tragovima. Nakon koraka ispiranja RNK se eluira u puferu za eluciju (BR5) i toplinski se denaturira. Značajke radnog učinka ručne izolacije RNK s pomoću sustava PAXgene Blood RNA System prikazane su na stranici 45.



Slika 1: Ručni postupak s pomoću sustava PAXgene Blood RNA.

Automatizirana izolacija RNK

Izolacija RNK u krvi automatizirana je na instrumentu QIAGEN QIAcube Connect MDx. Inovativni instrument upotrebljava naprednu tehnologiju za obradu QIAGEN spin kolona, što omogućuje laku integraciju automatizirane pripreme uzoraka s niskom brzinom protoka u laboratorijski tijek rada. Za pripremu uzoraka s pomoću instrumenta QIAcube Connect MDx upotrebljavaju se isti koraci kao i u ručnom postupku (tj. liza, vezanje, ispiranje i elucija) i može se upotrebljavati isti komplet PAXgene Blood RNA Kit.

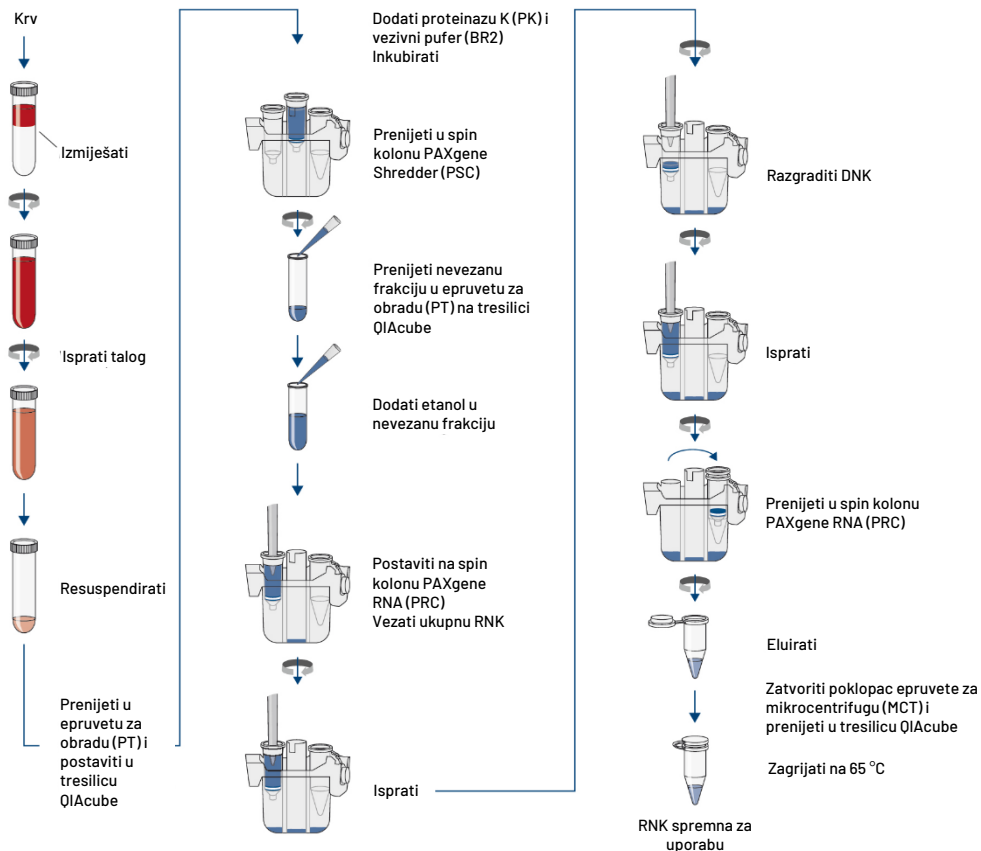


Slika 2: QIAcube Connect MDx.



QIAGEN QIAcube Connect MDx nije dostupan u svim zemljama. Za dodatne pojedinosti obratite se tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.

Protokol automatizirane izolacije RNK sastoji se od 2 dijela (ili protokola), „PAXgene Blood RNA Part A“ (od krvi u epruveti PAXgene Blood RNA Tube do elucije) i „PAXgene Blood RNA Part B“ (nakon elucije do RNK spremne za uporabu), uz kratku ručnu intervenciju između 2 dijela (pogledajte sliku 3).




Slika 3: Automatizirani postupak s pomoću sustava PAXgene Blood RNA.

Centrifugirani, isprani i resuspendirani talog nukleinske kiseline (pogledajte odjeljak „Izolacija RNK“, stranica 8) prenosi se iz epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT) u epruvete za obradu (PT), koje se postavljaju u jedinicu termotresilice na radnoj površini instrumenta QIAcube Connect MDx. Rukovatelj odabire i pokreće protokol „PAXgene Blood RNA Part A“ iz izbornika. Instrument QIAcube Connect MDx izvodi korake protokola do elucije RNK u puferu za eluciju (BR5). Rukovatelj prenosi epruvete za mikrocentrifugu koje sadržavaju pročišćenu RNK u jedinicu termotresilice instrumenta QIAcube Connect MDx. Rukovatelj odabire i pokreće protokol „PAXgene Blood RNA Part B“ iz izbornika, a instrument QIAcube Connect MDx provodi denaturaciju toplinom. Značajke radnog učinka automatizirane izolacije RNK s pomoću sustava PAXgene Blood RNA System na instrumentu QIAcube Connect MDx prikazane su na stranici 53.

Uključeni materijali

Sadržaj kompleta

PAXgene Blood RNA Kit Kataloški br. Broj instrumenata za prikupljanje			(50) 762174 50
Naziv komponente	Opis	Simbol	Količina
BR1	Resuspension Buffer (Pufer za resuspendiranje)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Vezivni pufer)*	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (Pufer za ispiranje 1)*	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (Pufer za ispiranje 2) (koncentrat)†	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Pufer za eluciju)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (Voda bez ribonukleaze (RNaze))(bočica)	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (Proteinaza K) (zeleni poklopac)	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (Spin kolone PAXgene RNA) (crvene)‡	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Collection Tubes (Epruvete za prikupljanje) (2 ml)§	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard™	Secondary BD Hemogard Closures (Sekundarni poklopci BD Hemogard)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (Epruvete za mikrocentrifugu) (1,5 ml)¶	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (DNaza I, bez RNaze) (liofilizirana)	DNA REM	1500 Kunitz jedinica¶
RDD	DNA Digestion Buffer (Pufer za razgradnju DNK) (bijeli poklopac)	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (Pufer za resuspendiranje DNaze) (epruveta, ljubičasti poklopac)	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (Spin kolone PAXgene Shredder) (ljubičaste)‡	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Priručnik	Priručnik za PAXgene Blood RNA Kit (inačica 3)		1

* Nije kompatibilan s reagensima za dezinfekciju koji sadržavaju izbjeljivač. Sadržava sol gvanidina. Za Sigurnosne informacije pogledajte stranicu 18.

† Pufer za ispiranje 2 (BR4) isporučuje se kao koncentrat. Prije prve uporabe dodajte 4 volumena etanola (96 – 100 % v/v, razred čistoće p.a.), kako je naznačeno na bočici, za dobivanje radne otopine.

‡ Svaka kolona zapakirana je u blister namijenjen isključivo za jednokratnu uporabu. Upute za zbrinjavanje potražite u sigurnosnim informacijama.

§ Epruvete su dostupne u plastičnim vrećicama, a svaka je epruveta namijenjena samo za jednokratnu uporabu. Upute za zbrinjavanje potražite u sigurnosnim informacijama.

¶ Kunitz jedinice obično se upotrebljavaju za mjerenje DNaze I te se definiraju kao količina DNaze I koja uzrokuje povećanje u A_{260} od 0,001 po minuti po mililitru pri 25 °C, pH 5,0, s visoko polimeriziranom DNK kao supstratom (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* 33, 349 i 363).

Dijelovi kompleta

Naziv komponente	Opis	Aktivni sastojak	Koncentracija
BR1	Resuspension Buffer (Pufer za resuspendiranje)	Nema	-
BR2	Binding Buffer (Vezivni pufer)	Gvanidin tiocijanat	≥ 30 do < 50 % w/w
BR3	Wash Buffer 1 (Pufer za ispiranje 1)	Gvanidin tiocijanat Etanol	≥ 10 do < 20 % w/w ≥ 3 do < 10 % w/w
BR4	Wash Buffer 2 (Pufer za ispiranje 2) (koncentrat)	Nema	-
BR5	Elution Buffer (Pufer za eluciju)	Nema	-
RNFW	RNase-Free Water (Voda bez ribonukleaze (RNaze))(bočica)	Nema	-
PK	Proteinase K (Proteinaza K) (zeleni poklopac)	Proteinaza K	≥ 1 do < 3 % w/w
RNFD	DNase I, RNase-free (DNaza I, bez RNaze)(liofilizirana)	DNaza	≥ 90 do ≤ 100 % w/w
RDD	DNA Digestion Buffer (Pufer za razgradnju DNK)(bijeli poklopac)	Nema	-
DRB	DNase Resuspension Buffer (Pufer za resuspendiranje DNaze) (epruveta, ljubičasti poklopac)	Nema	-

Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni

Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (STL) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

Za sve protokole

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; kat. br. 762165)
- Etanol (96 – 100 % v/v, razred čistoće p.a.)
- Pipete* (10 µl – 4 ml)
- Sterilni vrhovi pipeta, s barijerom protiv aerosola, bez RNaze[†]
- Menzura[‡]
- Centrifuga* koja može doseći 3000 – 5000 × g te je opremljena rotorom s njišućim vjedrima za postavljanje epruveta PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Vorteks miješalica*
- Zdrobljeni led
- Trajni marker za označavanje

Za ručni protokol

- Mikrocentrifuga s varijabilnom brzinom* koja može doseći raspon od najmanje 1000 – 8000 × g, iako su primjenjive i niže i više gravitacijske (g) sile (pogledajte korake protokola za više informacija) te je opremljena rotorom za epruvete za mikrocentrifugu od 2 ml

* Provjerite jesu li uređaji i instrumenti redovito pregledavani, održavani i kalibrirani prema preporuci proizvođača.

[†] Provjerite jeste li upoznati sa smjernicama o rukovanju RNK (Dodatak A, stranica 75).

[‡] Za dodavanje etanola u koncentrat pufera BR4.

- Tresilica-inkubator* sposobna za inkubaciju pri 55 °C i 65 °C i trešnju pri ≥ 400 o/min, ne prelazeći 1400 o/min (npr. termomiješalica Compact, Eppendorf® ili slična)

Za automatizirani protokol

- Škare
- QIAcube Connect MDx* (QIAGEN, kat. br. 9003070)

Potrošni materijal za QIAcube Connect MDx:

- Filter-Tips, 1000 μ L (1024)(QIAGEN, kat. br. 990352)†
- Reagent Bottles, 30 mL (6)(QIAGEN, kat. br. 990393)†
- Rotor Adapters (10 \times 24)(QIAGEN, kat. br. 990394)†

Dodatna oprema za QIAcube Connect MDx:

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

Servisni kompleti za QIAcube Connect MDx:

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

* Provjerite jesu li uređaj i instrument redovito pregledavani, održavani i kalibrirani prema preporuci proizvođača.

† Uključen i u Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, kat. br. 990395).

Upozorenja i mjere opreza

Imajte na umu da kupci u Europskoj uniji svaki ozbiljan štetni događaj koji je nastao u vezi s uređajem moraju prijaviti proizvođaču i nadležnom tijelu države članice u kojoj se korisnik i/ili pacijent nalaze.

Imajte na umu da će kupci izvan Europske Unije ozbiljne štetne događaje koji su nastali u vezi s uređajem, ovisno o lokalnim propisima koje je potrebno proučiti, možda morati prijaviti proizvođaču i/ili njegovu ovlaštenom predstavniku i regulatornom tijelu koje je nadležno za korisnika i/ili pacijenta.

Sigurnosne informacije

Kad radite s kemikalijama i biološki opasnim materijalom, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu upotrebu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (STL). Oni su dostupni na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na web-adresi **www.qiagen.com/safety**. Ondje možete pronaći, pregledati i ispisati sigurnosno-tehnički list (STL) za svaki komplet QIAGEN i svaku komponentu kompleta.

- Sve kemikalije i biološki materijali potencijalno su opasni. Ispitci krvi i uzorci potencijalno su infektivni te se njima mora rukovati kao biološki opasnim materijalom.
- Biološki opasan otpad i otpad od kompleta odlažite u skladu s lokalnim sigurnosnim postupcima.

Podaci o kontaktu za hitne slučajeve

CHEMTREC

Izvan SAD-a i Kanade +1 703-527-3887

Mjere opreza

Kada radite s krvi, primjenjujte uobičajene mjere opreza kako biste izbjegli opasnost od mogućeg izlaganja patogenima koji se prenose krvlju (npr. HIV, hepatitis B i drugi virusi koji se prenose krvlju). Za zaštitu od izlaganja krvi upotrebljavajte rukavice, kute, zaštitu za oči, drugu osobnu zaštitnu opremu i tehnički nadzor. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (STL). Oni su dostupni na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na web-mjestu **www.preanalytix.com**. Ondje možete pronaći, pregledati i ispisati sigurnosno-tehničke listove (STL-ove) za ovaj komplet.

OPREZ



NEMOJTE dodavati izbjeljivač ili kisele otopine izravno u otpad nastao pripremom uzoraka.

Veživni pufer (BR2) i pufer za ispiranje 1 (BR3) sadržavaju gvanidin tiocijanat, koji u kombinaciji s izbjeljivačem može stvoriti visoko reaktivne spojeve. Ako se veživni pufer (BR2) ili pufer za ispiranje 1 (BR3) proliju, očistite odgovarajućim laboratorijskim deterdžentom i vodom. Ako se tekućina koja sadržava potencijalno infektivne agense prolije, očistite zahvaćeno područje najprije laboratorijskim deterdžentom i vodom, a zatim 1-postotnim (v/v) natrijevim hipokloritom (izbjeljivač).

Mješavina otopine za stabilizaciju RNK i krvi iz epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT) može se dezinficirati uporabom 1 volumena komercijalno dostupne otopine izbjeljivača (5-postotni natrijev hipoklorit) na 9 volumena mješavine otopine za stabilizaciju RNK i krvi.

Otpad nastao pripremom uzoraka, kao što su supernatanti iz koraka centrifugiranja u postupku izolacije RNK, smatra se potencijalno infektivnim. Za zbrinjavanje biološki opasnog materijala upotrebljavajte spremnike za biološki opasan otpad. Zbrinjavanje se mora provoditi u skladu s lokalnim propisima i postupcima vaše ustanove.

Određene komponente kompleta PAXgene Blood RNA Kit namijenjene su isključivo za jednokratnu uporabu. Informacije o pojedinačnim komponentama potražite u odjeljku Sadržaj kompleta na stranici 14.

Sljedeće izjave o opasnosti i mjerama opreza odnose se na komponente kompleta PAXgene Blood RNA Kit. Sigurnosne informacije o epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) potražite u *Priručniku za PAXgene Blood RNA Tube*.

Buffer BR2



Sadržava: gvanidin tiocijanat. Opasnost! Štetno ako se proguta. Može biti štetno u dodiru s kožom ili ako se udiše. Uzrokuje ozbiljno oštećenje očiju. Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. U dodiru s kiselinama oslobađa vrlo otrovni plin. Izbjegavati ispuštanje u okoliš. Nositi zaštitne rukavice / zaštitno odijelo / zaštitu za oči / zaštitu za lice. U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ako ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispiranje. U SLUČAJU izloženosti ili sumnje na izloženost: odmah nazvati CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA ili liječnika. Odložiti sadržaj/spremnik u odobreno postrojenje za odlaganje otpada.

Buffer BR3



Sadržava: etanol; gvanidin tiocijanat. Opasnost! Zapaljiva tekućina i para. Uzrokuje ozbiljno oštećenje očiju. U dodiru s kiselinama oslobađa vrlo otrovni plin. Čuvati odvojeno od topline/iskre/otvorenog plamena/vrućih površina. Ne pušiti. Nositi zaštitne rukavice / zaštitno odijelo / zaštitu za oči / zaštitu za lice. U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ako ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispiranje. Odmah nazvati CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA ili liječnika.

DNase I



Sadržava: DNazu. Opasnost! Može izazvati alergijsku reakciju na koži. Ako se udiše može izazvati simptome alergije ili astme ili poteškoće s disanjem. Izbjegavati udisanje prašine. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice. Nositi sredstva za zaštitu dišnog sustava. U SLUČAJU izloženosti ili sumnje na izloženost: nazvati CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA ili liječnika. Premjestiti osobu na svjež zrak i postaviti je u položaj koji olakšava disanje. Prije ponovne uporabe oprati kontaminiranu odjeću.

Pohrana i rukovanje reagensima

Spin kolone PAXgene RNA (PRC), spin kolone PAXgene Shredder (PSC), proteinaza K (PK) te puferi (BR1, BR2, BR3, BR4 i BR5) trebaju se pohraniti na suhom na temperaturi naznačenoj na naljepnici kompleta.

RNase-Free DNase Set, koji sadržava DNazu I (RNFD), pufer za razgradnju DNK (RDD) te pufer za resuspendiranje DNaze (DRB), isporučuje se pri sobnoj temperaturi. Pohranite sve komponente RNase-Free DNase Set odmah nakon primitka pri temperaturi naznačenoj na naljepnici. U slučaju propisne pohrane komplet je stabilan do datuma isteka roka trajanja na kutiji kompleta.

Potrebno je paziti na rokove trajanja i uvjete pohrane ispisane na kutiji i naljepnicama svih komponenata. Nemojte upotrebljavati komponente kojima je istekao rok ili koje su bile nepravilno pohranjene.

Stabilnost tijekom uporabe

Nakon prve uporabe kompleta reagensi su stabilni u originalnim bočicama na temperaturama i do isteka roka trajanja koji su naznačeni na naljepnici na kutiji kompleta.

Reagensi kojima su napunjene bočice za reagense instrumenta QIAcube Connect MDx stabilni su 3 mjeseca ako se pohrane na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C).

Rekonstituirana DNaza I (RNFD) na temperaturi 2 – 8 °C u originalnoj staklenoj bočici (temeljna standardna otopina) stabilna je 6 tjedana.

Alikvoti temeljne standardne otopine za jednokratnu uporabu u epruvetama za mikrocentrifugu od 1,5 ml (isporučene u kompletu) stabilni su 9 mjeseci ako se pohrane na –20 °C. Nakon odmrzavanja alikvoti za jednokratnu uporabu stabilni su 6 tjedana ako se pohrane na 2 – 8 °C.

Prikupljanje, pohrana i rukovanje ispvcima

Komplet PAXgene Blood RNA Kit upotrebljava se s krvi prikupljenom u epruvcama PAXgene Blood RNA Tubes. Krv se mora prikupiti u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) prema uputama u Priručniku za PAXgene Blood RNA Tube. Ako je potrebno, pogledajte Dodatak C (stranica 79) za preporuke o rukovanju epruvcama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Sa svim je uzorcima potrebno postupati kao da su potencijalno opasni. Značajke radnog učinka sustava PAXgene Blood RNA utvrđene su s genskim transkriptima FOS i IL1B koji se mogu pregledati na stranicama 41–44.

Protokol: ručna izolacija ukupne RNK iz ljudske pune krvi prikupljene u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes

Važne točke prije započinjanja

- Provjerite je li kutija kompleta netaknuta i neoštećena te potvrdite da puferi nisu iscurili. Ne upotrebljavajte oštećeni komplet.
- Prilikom uporabe pipete provjerite je li pipeta postavljena na točan volumen te je li tekućina pažljivo i potpuno aspirirana i dispenzirana.
- Kako biste izbjegli prenošenje uzoraka u pogrešnu epruvetu ili spin kolonu, pobrinite se da su sve epruvete i spin kolone propisno označene s pomoću trajnog markera. Označite poklopac i tijelo svake epruvete (PT, MCT). Za spin kolone, označite tijelo epruvete za obradu. Zatvorite svaku epruvetu ili spin kolonu nakon što se u njih prenese tekućina.
- Prolijevanja uzoraka i pufera tijekom postupka mogu smanjiti prinos i čistoću RNK.
- Osim ako je drugačije naznačeno, svi koraci u ovom protokolu, uključujući korake centrifugiranja, trebaju se provesti pri sobnoj temperaturi (15 – 25 °C).

Zbog osjetljivosti tehnologija amplifikacije nukleinske kiseline, potrebno je poduzeti sljedeće mjere opreza prilikom rukovanja uzorcima kako bi se izbjegla križna kontaminacija:

- Pažljivo pipetirajte uzorak u spin kolonu (PSC, PRC) bez navlaživanja ruba kolone.
- Uvijek promijenite vrhove pipeta između prijenosa tekućina. Upotrijebite vrhove pipeta s barijerom protiv aerosola.
- Izbjegnite dodirivanje membrane spin kolone (PSC, PRC) vrhom pipete.
- Nakon miješanja vorteks miješalicom ili zagrijavanja epruvete za mikrocentrifugu kratko je centrifugirajte kako biste uklonili kapljice s unutrašnje strane poklopcu.

- Tijekom cijelog postupka nosite rukavice. U slučaju dodira između rukavica i uzorka, odmah promijenite rukavice.
- Zatvorite spin kolonu (PSC, PRC) prije nego što je postavite u mikrocentrifugu. Centrifugirajte prema opisanom u postupku.
- Otvorite samo jednu po jednu spin kolonu (PSC, PRC) i izbjegavajte stvaranje aerosola.
- Za učinkovitu paralelnu obradu više uzoraka, napunite nosač epruvetama za obradu u koje se spin kolone (PSC, PRC) mogu prenijeti nakon centrifugiranja. Zbrinite iskorištene epruvete za obradu koje sadržavaju nevezanu frakciju i postavite spin kolone (PSC, PRC) u nove epruvete za obradu prije nego što ih vratite u centrifugu.

Postupci koje treba napraviti prije započinjanja

- Krv se mora prikupiti u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) prema uputama u *Priručniku za PAXgene Blood RNA Tube*. Ako je potrebno, pogledajte Dodatak C (stranica 79) za preporuke o rukovanju epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Pobrinite se da su epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkubirane najmanje 2 sata pri sobnoj temperaturi nakon prikupljanja krvi kako bi se osigurala potpuna liza krvnih stanica i taloženje RNK. Inkubacija epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT) preko noći može povećati prinose. Ako prije pohrane na 2 – 8 °C, –20 °C ili –70 °C nije provedena početna inkubacija krvi na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 h, najprije prilagodite temperaturu epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT) sobnoj temperaturi, a zatim je inkubirajte na toj temperaturi 2 h prije početka postupka.
- Pročitajte sigurnosne informacije na stranici 18.
- Pročitajte smjernice o rukovanju s RNK (Dodatak A, stranica 76).
- Pobrinite se da su instrumenti, poput pipeta i tresilice-inkubatora, redovito pregledavani i kalibrirani u skladu s preporukama proizvođača.

- Tresilica-inkubator potreban je u koracima 5 i 20. Postavite temperaturu tresilice-inkubatora na 55 °C.
- Vezivni pufer (BR2) može u pohrani stvoriti precipitat. Ako je potrebno, zagrijte ga na 37 °C kako bi se precipitat razgradio.
- Pufer za ispiranje 2 (BR4) isporučuje se kao koncentrat. Prije prve uporabe dodajte 4 volumena etanola (96 – 100 % v/v, razred čistoće p.a.), kako je naznačeno na bočici, za dobivanje radne otopine.
- Ako prvi puta upotrebljavate RNase-Free DNase Set, pripremite temeljnu standardnu otopinu DNaze I. Otopite krutu DNazu I (RNFD; 1500 Kunitz jedinica)* u 550 µl pufera za resuspendiranje DNaze (DRB) koji je isporučen s kompletom. Obratite pažnju na to da se nijedan dio DNaze I (RNFD) ne izgubi prilikom otvaranja bočice. Rekonstituiranu DNazu I (RNFD) nemojte miješati vorteks miješalicom. DNaza I je posebno osjetljiva na fizičku denaturaciju. Miješanje se mora obavljati samo nježnim preokretanjem bočice.
- Rekonstituirana DNaza I (RNFD) može se pohraniti na 2 – 8 °C u originalnoj staklenoj bočici (standardna otopina) ili na –20 °C nakon uklanjanja temeljne standardne otopine iz staklene bočice i njezine podjele na alikvotne za jednokratnu uporabu (upotrijebite epruvetu za mikrocentrifugu od 1,5 ml isporučenu u kompletu; količina je dovoljna za 5 alikvota). Odmrznuti alikvoti mogu se pohraniti pri 2 – 8 °C. Nakon odmrzavanja nemojte ponovno zamrzavati alikvote.
- Prilikom rekonstituiranja i alikvotiranja DNaze I (RNFD) obvezno slijedite smjernice za rukovanje s RNK (Dodatak A, stranica 76).

Postupak

1. Centrifugirajte epruvetu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tijekom 10 min pri 3000 – 5000 × g s pomoću rotora s njišućim vjedorima.

* Kunitz jedinice upotrebljavaju se za mjerenje DNaze I te se definiraju kao količina DNaze I koja uzrokuje povećanje u A_{260} od 0,001 po minuti po mililitru pri 25 °C, pH 5,0, s visoko polimeriziranom DNK kao supstratom (Kunitz, M. (1950.) J. Gen. Physiol. **33**, 349 i 363).



Pobrinite se da je uzorak krvi inkubiran u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tijekom najmanje 2 h pri sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) kako bi se postigla potpuna liza krvnih stanica i taloženje RNK.



Rotor mora sadržavati adaptere za epruvete sa zaobljenim dnom. Ako se upotrebljavaju druge vrste adaptera za epruvete, epruvete mogu puknuti tijekom centrifugiranja.

2. Uklonite supernatant pretakanjem ili pipetiranjem. Dodajte 4 ml vode bez RNaze (RNFw) u talog i zatvorite epruvetu novim sekundarnim poklopcem BD Hemogard (isporučen s kompletom).

Ako je supernatant pretočen, pazite da ne poremetite talog te osušite rub epruvete čistim papirnatim ručnikom.

3. Miješajte vorteks miješalicom dok se talog vidljivo ne razgradi te centrifugirajte 10 min pri 3000 – 5000 × g s pomoću rotora s njišućim vjedrima. Uklonite i zbrinite cijeli supernatant.

Mali ostaci materijala preostali u supernatantu nakon miješanja vorteks miješalicom, no prije centrifugiranja, neće utjecati na postupak.



Nepotpuno uklanjanje supernatanta inhibirat će lizu i razrijediti lizat te stoga utjecati na uvjete za vezanje RNK na membranu PAXgene.

4. Dodajte 350 µl pufera za resuspendiranje (BR1) i miješajte vorteks miješalicom dok se talog vidljivo ne razgradi.
5. Pipetirajte uzorak u epruvetu za mikrocentrifugu od 1,5 ml. Dodajte 300 µl vezivnog pufera (BR2) i 40 µl proteinaze K (PK). Miješajte vorteks miješalicom 5 s i inkubirajte 10 min pri 55 °C koristeći tresilicu-inkubator pri 400 – 1400 o/min. Nakon inkubacije postavite temperaturu tresilice-inkubatora na 65 °C (za korak 20).



Ne miješajte vezivni pufer (BR2) i proteinazu K (PK) prije dodavanja u uzorak.

6. Pipetirajte lizat izravno u PSC (ljubičasti) postavljen u epruvetu za obradu od 2 ml i centrifugirajte 3 min pri najvećoj brzini (ne prelazeći 20.000 × g).



Pažljivo pipetirajte lizat u spin kolonu (PSC) i vizualno pregledajte je li lizat potpuno prenesen u spin kolonu (PSC).

Kako biste spriječili oštećenja kolona (PSC) i epruveta (PT), ne premašujte $20.000 \times g$.




Neki uzorci mogu proći kroz PSC bez centrifugiranja. To se događa zbog niske viskoznosti nekih uzoraka i ne smije se smatrati znakom kvara proizvoda.

- Pažljivo prenesite cijeli supernatant nevezane frakcije u novu epruvetu za mikrocentrifugu od 1,5 ml, a da pritom ne poremetite talog u epruveti za obradu.
- Dodajte 350 μ l etanola (96 – 100 % v/v, razred čistoće p. a.). Miješajte vorteks miješalicom i kratko centrifugirajte (1 – 2 s pri $500 - 1000 \times g$) kako bi se uklonile kapljice s unutrašnje strane poklopca epruvete.



Centrifugiranje ne smije biti duže od 1 – 2 s jer bi to moglo dovesti do taloženja nukleinskih kiselina i smanjenih prinosa ukupne RNK.

- Pipetirajte 700 μ l uzorka u PRC (crveni) postavljen u epruvetu za obradu od 2 ml i centrifugirajte 1 min pri $8000 - 20.000 \times g$. Postavite spin kolonu (PRC) u novu epruvetu za obradu od 2 ml i zbrinite staru epruvetu za obradu koja sadržava nevezanu frakciju.
 - Pipetirajte preostali uzorak u PRC i centrifugirajte 1 min pri $8000 - 20.000 \times g$. Postavite spin kolonu (PRC) u novu epruvetu za obradu od 2 ml i zbrinite staru epruvetu za obradu koja sadržava nevezanu frakciju.
-  Pažljivo pipetirajte uzorak u spin kolonu (PRC) i vizualno pregledajte je li uzorak potpuno prenesen u spin kolonu (PRC).
- Pipetirajte 350 μ l pufera za ispiranje 1 (BR3) u PRC. Centrifugirajte 1 min pri $8000 - 20.000 \times g$. Postavite spin kolonu (PRC) u novu epruvetu za obradu od 2 ml i zbrinite staru epruvetu za obradu koja sadržava nevezanu frakciju.
 - Dodajte 10 μ l temeljne standardne otopine DNaze I (RNFD) u 70 μ l pufera za razgradnju DNK (RDD) u epruveti za mikrocentrifugu od 1,5 ml. Miješajte laganim, kratkim udarcem epruvete te kratko centrifugirajte kako biste prikupili preostalu tekućinu sa strana epruvete.

Ako obrađujete, primjerice, 10 uzoraka, dodajte 100 µl temeljne standardne otopine DNaze I (RNFD) u 700 µl pufera za razgradnju DNK (RDD). Upotrijebite epruvete za mikrocentrifugu od 1,5 ml koje su isporučene s kompletom.



DNaza I je posebno osjetljiva na fizičku denaturaciju. Miješanje se mora obavljati samo laganim, kratkim udarcem epruvete. Ne miješajte vorteks miješalicom.

13. Pipetirajte mješavinu za inkubaciju DNaze I (RNFD) (80 µl) izravno na membranu PRC-a i postavite na radnu površinu stola (20 – 30 °C) na 15 minuta.



Pobrinite se da je mješavina za inkubaciju DNaze I (RNFD) postavljena izravno na membranu. Razgradnja DNaze bit će nepotpuna ako se dio mješavine nanese i ostane na stijenkama ili O-prstenu spin kolone (PRC).

14. Pipetirajte 350 µl pufera za ispiranje 1 (BR3) u PRC i centrifugirajte 1 minutu pri 8000 – 20.000 × g. Postavite spin kolonu (PRC) u novu epruvetu za obradu od 2 ml i zbrinite staru epruvetu za obradu koja sadržava nevezanu frakciju.

15. Pipetirajte 500 µl pufera za ispiranje 2 (BR4) u PRC i centrifugirajte 1 minutu pri 8000 – 20.000 × g. Postavite spin kolonu (PRC) u novu epruvetu za obradu od 2 ml i zbrinite staru epruvetu za obradu koja sadržava nevezanu frakciju.



Pufer za ispiranje 2 (BR4) isporučuje se kao koncentrat. Pobrinite se da je etanol dodan u pufer za ispiranje 2 (BR4) prije uporabe (pogledajte „Postupci koje treba napraviti prije započinjanja“, stranica 25).

16. Dodajte još 500 µl pufera za ispiranje 2 (BR4) u PRC. Centrifugirajte 3 min pri 8000 – 20.000 × g.

17. Zbrinite epruvetu za obradu koja sadržava nevezanu frakciju i postavite PRC u novu epruvetu za obradu od 2 ml. Centrifugirajte 1 min pri 8000 – 20.000 × g.

18. Zbrinite epruvetu za obradu koja sadržava nevezanu frakciju. Postavite PRC u epruvetu za mikrocentrifugu od 1,5 ml i pipetirajte 40 µl pufera za eluciju (BR5) izravno na membranu PRC-a. Centrifugirajte 1 min pri 8000 – 20.000 × g kako biste eluirali RNK.

Važno je namočiti cijelu membranu puferom za eluciju (BR5) kako bi se postigla maksimalna učinkovitost elucije.

19. Ponovite korak elucije (korak 18) kako je opisano, upotrebljavajući 40 µl pufera za eluciju (BR5) i istu epruvetu za mikrocentrifugu.

20. Inkubirajte eluat 5 min pri 65 °C u tresilici-inkubatoru (iz koraka 5) bez trešnje.

Nakon inkubacije odmah ohladite na ledu.



Inkubacija uzoraka pri 65 °C denaturira RNK za postupke daljnje obrade. Čak i ako postupak daljnje obrade uključuje korak s denaturacijom toplinom, ne izostavljajte taj korak. Dovoljna denaturacija RNK u ovom koraku ključna je za maksimalnu učinkovitost postupaka daljnje obrade. Ne premašujte vrijeme ni temperaturu inkubacije.

21. Ako se uzorci RNK neće odmah upotrebljavati, pohranite ih na –20 °C ili –70 °C.

Budući da RNK ostaje denaturirana nakon ponovljenog zamrzavanja i odmrzavanja, nije potrebno ponoviti inkubaciju pri 65 °C. Ako upotrebljavate uzorke RNK za dijagnostičko ispitivanje, slijedite upute proizvođača.

Za točnu kvantifikaciju RNK mjerenje apsorbancije pri 260 nm preporučujemo razrjeđivanje uzoraka s 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Razrjeđivanje uzoraka u vodi bez RNaze može dovesti do netočno niskih vrijednosti.

Postavite nultu vrijednost spektrofotometra s pomoću prazne otopine koja se sastoji od jednakog omjera pufera za eluciju (BR5) i pufera Tris-HCl kao u uzorcima koji će se mjeriti. Pufer za eluciju (BR5) ima visoku apsorbanciju pri 220 nm, što može dovesti do visokih pozadinskih razina apsorbancije ako spektrofotometar nije propisno postavljen na nultu vrijednost.



Za kvantifikaciju u puferu Tris-HCl primijenite odnos $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Pogledajte Dodatak B, stranica 77.

22. Zatvorite sve bočice koje sadržavaju pufer i vodu bez RNaze, bočice i epruvete koje sadržavaju enzime i pufer za enzime te vrećice koje sadržavaju plastični materijal iz kompleta korištenog za protokol. Do sljedeće uporabe pohranite preostali sadržaj kompleta kako je opisano u odjeljku „Pohrana i rukovanje reagensima” (stranica 22) i „Stabilnost tijekom uporabe” (stranica 22).

* Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (STL) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

Protokol: automatizirana izolacija ukupne RNK iz ljudske pune krvi prikupljene u epruветama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Važne točke prije započinjanja

- Provjerite je li kutija kompleta netaknuta i neoštećena te potvrdite da puferi nisu iscurili. Ne upotrebljavajte oštećeni komplet.
- Prilikom uporabe pipete provjerite je li pipeta postavljena na točan volumen te je li tekućina pažljivo i potpuno aspirirana i dispenzirana.
- Kako biste izbjegli prenošenje uzoraka u pogrešne epruветe i plastične potrošne materijale, pobrinite se da su sve epruветe za obradu, epruветe za mikrocentrifugu i adapteri rotora propisno označeni trajnim markerom. Označite poklopac i tijelo svake epruветe za mikrocentrifugu, tijelo svake epruветe za obradu i vanjsku stijenku svakog adaptera rotora.
- Prolijevanja uzoraka i pufera tijekom postupka mogu smanjiti prinos i čistoću RNK.
- Osim ako je drugačije naznačeno, svi koraci u ovom protokolu, uključujući korake centrifugiranja, trebaju se provesti pri sobnoj temperaturi (15 – 25 °C).

Zbog osjetljivosti tehnologija amplifikacije nukleinske kiseline, potrebno je poduzeti sljedeće mjere opreza prilikom rukovanja uzorcima kako bi se izbjegla križna kontaminacija:

- Pažljivo pipetirajte uzorak u epruветu za obradu na dno epruветe bez navlaživanja ruba epruветe.
- Uvijek promijenite vrhove pipeta između prijenosa tekućina. Upotrijebite vrhove pipeta s barijerom protiv aerosola.
- Izbjegnite dodirivanje membrane spin kolone (PSC, PRC) vrhom pipete.

- Nakon miješanja vorteks miješalicom ili zagrijavanja epruvete za mikrocentrifugu kratko je centrifugirajte kako biste uklonili kapljice s unutrašnje strane poklopca.
- Tijekom cijelog postupka nosite rukavice. U slučaju dodira između rukavica i uzorka, odmah promijenite rukavice.

Postupci koje treba napraviti prije započinjanja

- Krv se mora prikupiti u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) prema uputama u *Priručniku za PAXgene Blood RNA Tube*. Ako je potrebno, pogledajte Dodatak C (stranica 79) za preporuke o rukovanju epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Pobrinite se da su epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkubirane najmanje 2 sata pri sobnoj temperaturi nakon prikupljanja krvi kako bi se osigurala potpuna liza krvnih stanica i taloženje RNK. Inkubacija epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT) preko noći može povećati prinose. Ako je epruveta PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pohranjena na temperaturama od 2 – 8 °C, –20 °C ili –70 °C nakon prikupljanja krvi, prvo joj prilagodite temperaturu sobnoj temperaturi pa je pohranite na sobnoj temperaturi 2 sata prije početka postupka.
- Pročitajte sigurnosne informacije na stranici 18.
- Pročitajte „Važne napomene“, stranica 57.
- Pročitajte smjernice o rukovanju s RNK (Dodatak A, stranica 76).
- Pročitajte odgovarajući Korisnički priručnik za instrument QIAcube Connect MDx i sve dodatne informacije isporučene s instrumentom, obraćajući posebnu pozornost na sigurnosne informacije.
- Pobrinite se da su uređaji i instrumenti, poput pipeta i instrumenta QIAcube Connect MDx, redovito pregledavani i kalibrirani u skladu s preporukama proizvođača.
- Vezivni pufer (BR2) može u pohrani stvoriti precipitat. Ako je potrebno, zagrijte ga na 37 °C kako bi se precipitat razgradio.

- Pufer za ispiranje 2 (BR4) isporučuje se kao koncentrat. Prije prve uporabe dodajte odgovarajući volumen etanola (96 – 100 % v/v, razred čistoće p.a.), kako je naznačeno na bočici, za dobivanje radne otopine.
- Ako prvi puta upotrebljavate RNase-Free DNase Set, pripremite temeljnu standardnu otopinu DNaze I. Otopite krutu DNazu I (RNFD; 1500 Kunitz jedinica)* u 550 µl pufera za resuspendiranje DNaze (DRB) koji je isporučen s kompletom. Obratite pažnju na to da se nijedan dio DNaze I (RNFD) ne izgubi prilikom otvaranja bočice. Rekonstituiranu DNazu I (RNFD) nemojte miješati vorteks miješalicom. DNaza I je posebno osjetljiva na fizičku denaturaciju. Miješanje se mora obavljati samo nježnim preokretanjem bočice.
- Rekonstituirana DNaza I (RNFD) može se pohraniti na 2 – 8 °C u originalnoj staklenoj bočici (standardna otopina) ili na –20 °C nakon uklanjanja temeljne standardne otopine iz staklene bočice i njezine podjele na alikvote za jednokratnu uporabu (upotrijebite epruvetu za mikrocentrifugu od 1,5 ml isporučenu u kompletu; količina je dovoljna za 5 alikvota). Odmrznuti alikvoti mogu se pohraniti pri 2 – 8 °C. Nakon odmrzavanja nemojte ponovno zamrzavati alikvote.
- Prilikom rekonstituiranja i alikvotiranja DNaze I (RNFD) obvezno slijedite smjernice za rukovanje s RNK (Dodatak A, stranica 76).
- Instalirajte ispravni adapter tresilice (uključen uz instrument QIAcube Connect MDx; upotrebljavajte adapter za epruvete sa sigurnosnim poklopcem od 2 ml, označene s „2”), te postavite nosač tresilice na gornju stranu adaptera.
- Provjerite ladicu za otpad i ispraznite je ako je potrebno.
- Instalirajte sve povezane protokole ako to već niste učinili za prethodne procese. Za QIAcube Connect MDx potrebno je preuzeti sve protokole koji se nalaze u povezanoj zip datoteci. Pogledajte „Instaliranje protokola na instrument QIAcube Connect MDx”, stranica 59.

* Kunitz jedinice upotrebljavaju se za mjerenje DNaze I te se definiraju kao količina DNaze I koja uzrokuje povećanje u A_{260} od 0,001 po minuti po mililitru pri 25 °C, pH 5,0, s visoko polimeriziranom DNK kao supstratom (Kunitz, M. (1950.) J. Gen. Physiol. **33**, 349 i 363).

Postupak

1. Zatvorite vratašca instrumenta QIAcube Connect MDx i uključite instrument prekidačem za napajanje (pogledajte sliku 15, stranica 58).

Oglašava se zvučni signal i pojavljuje se zaslon pokretanja. Instrument automatski izvodi početna testiranja.

2. Otvorite vratašca instrumenta QIAcube Connect MDx i postavite potrebne reagense i plastični pribor u instrument. Pogledajte „Punjenje instrumenta QIAcube Connect MDx“, stranica 60.

Radi uštede vremena punjenje se može izvesti tijekom jednog ili oba koraka centrifuge u trajanju od 10 min (koraci 3 i 5).

3. Centrifugirajte epruvetu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tijekom 10 min pri 3000 – 5000 × g s pomoću rotora s njišućim vjedrima.








Pobrinite se da je uzorak krvi inkubiran u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tijekom najmanje 2 h pri sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) kako bi se postigla potpuna liza krvnih stanica i taloženje RNK.



Rotor mora sadržavati adaptere za epruvete sa zaobljenim dnom. Ako se upotrebljavaju druge vrste adaptera za epruvete, epruvete mogu puknuti tijekom centrifugiranja.

4. Uklonite supernatant pretakanjem ili pipetiranjem. Ako je supernatant pretočen, pazite da ne poremetite talog te osušite rub epruvete čistim papirnatim ručnikom. Dodajte 4 ml vode bez RNaze (RNFW) u talog i zatvorite epruvetu novim sekundarnim poklopcem BD Hemogard (isporučen s kompletom).
5. Miješajte vorteks miješalicom dok se talog vidljivo ne razgradi te centrifugirajte 10 min pri 3000 – 5000 × g s pomoću rotora s njišućim vjedrima. Uklonite i zbrinite cijeli supernatant.

Mali ostaci materijala preostali u supernatantu nakon miješanja vorteks miješalicom, no prije centrifugiranja, neće utjecati na postupak.

-  Nepotpuno uklanjanje supernatanta inhibirat će lizu i razrijediti lizat te stoga utjecati na uvjete za vezanje RNK na membranu PAXgene.
6. Dodajte 350 µl pufera za resuspendiranje (BR1) i miješajte vorteks miješalicom dok se talog vidljivo ne razgradi.
7. Pipetirajte uzorak u epruvetu za obradu od 2 ml.
-  Upotrijebite epruvete za obradu od 2 ml uključene u komplet PAXgene Blood RNA Kit.
8. Postavite otvorene epruvete za obradu koje sadržavaju uzorak u tresilicu instrumenta QIAcube Connect MDx (pogledajte sliku 18, stranica 62). Položaji uzoraka označeni su brojevima radi lakšeg postavljanja. Umetnite čepove nosača tresilice (uključeni uz instrument QIAcube Connect MDx) u uture na rubu nosača tresilice uz svaku epruvetu za obradu. To omogućava detekciju uzoraka tijekom provjere postavljanja.
-  Pobrinite se da je instaliran ispravan adapter tresilice (Shaker Adapter, 2 ml, epruvete sa sigurnosnim poklopcem, označene s „2“, priložene uz instrument QIAcube Connect MDx).
-  Ako obrađujete manje od 12 uzoraka, pobrinite se da postavite nosač tresilice kako je prikazano na slici 22, stranica 66. Jedan (1) ili 11 uzoraka ne mogu se obrađivati. Brojevi položaja na nosaču tresilice odgovaraju brojevima položaja u centrifugi.
9. Zatvorite vratašca instrumenta QIAcube Connect MDx (pogledajte sliku 15, stranica 58).
10. Odaberite protokol „PAXgene Blood RNA Part A“ i započnite protokol.
- Slijedite upute navedene na dodirnom zaslonu instrumenta QIAcube Connect MDx.
-  Pobrinite se da su oba dijela programa (dio A i dio B) instalirani na instrumentu QIAcube Connect MDx (pogledajte „Instaliranje protokola na instrument QIAcube Connect MDx“, stranica 59).



Instrument će izvršiti provjeru postavljanja za uzorke, vrhove, adaptere rotora i bočice za reagense.

11. Nakon što završi protokol „PAXgene Blood RNA Part A“, otvorite vratašca instrumenta QIAcube Connect MDx (pogledajte sliku 15, stranica 58). Uklonite i zbrinite PRC iz adaptera rotora i prazne epruvete za obradu iz tresilice.



Tijekom procesa instrument premješta spin kolone iz položaja 1 na adapteru rotora (položaj poklopca L1) u položaj 3 na adapteru rotora (položaj poklopca L2)(pogledajte sliku 20, stranica 64).

12. Zatvorite poklopce svih epruveta za mikrocentrifugu od 1,5 ml koje sadržavaju pročišćenu RNK u adapterima rotora (položaj 3, položaj poklopca L3, pogledajte sliku 20, stranica 64). Premjestite epruvete za mikrocentrifugu od 1,5 ml na adapter tresilice instrumenta QIAcube Connect MDx (pogledajte sliku 18, stranica 62).
13. Zatvorite vratašca instrumenta QIAcube Connect MDx (pogledajte sliku 15, stranica 58).
14. Odaberite protokol „PAXgene Blood RNA Part B“ i započnite protokol.

Slijedite upute navedene na dodirnom zaslonu instrumenta QIAcube Connect MDx.



Ovaj program inkubira uzorke pri 65 °C i denaturira RNK za postupke daljnje obrade. Čak i ako postupak daljnje obrade uključuje korak s denaturacijom toplinom, ne izostavljajte taj korak. Dovoljna denaturacija RNK u ovom koraku ključna je za maksimalnu učinkovitost postupaka daljnje obrade.

15. Nakon što završi program „PAXgene Blood RNA Part B“, otvorite vratašca instrumenta QIAcube Connect MDx (pogledajte sliku 15, stranica 58). Odmah postavite epruvete za mikrocentrifugu s pročišćenom RNK na led.



UPOZORENJE: vruća površina. Tresilica može dosegnuti temperaturu do 70 °C. Nemojte je dodirivati dok je vruća.



Nemojte ostavljati pročišćenu RNK u instrumentu QIAcube Connect MDx. Budući da uzorci nisu ohlađeni, može doći do degradacije pročišćene RNK. Stoga se ne preporučuje izvođenje procesa pripreme uzoraka preko noći i bez nadzora.

16. Ako se uzorci RNK neće odmah upotrebljavati, pohranite ih na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ili $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Budući da RNK ostaje denaturirana nakon ponovljenog zamrzavanja i odmrzavanja, nije potrebno ponoviti protokol inkubacije toplinom („PAXgene Blood RNA Part B“). Ako upotrebljavate uzorke za dijagnostičko ispitivanje, slijedite upute proizvođača.

Za točnu kvantifikaciju RNK apsorbancijom pri 260 nm preporučujemo razrjeđivanje uzoraka u 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. * Razrjeđivanje uzoraka u vodi bez RNaze može dovesti do netočno niskih vrijednosti.

Postavite nultu vrijednost spektrofotometra s pomoću prazne otopine koja se sastoji od jednakog omjera pufera za eluciju (BR5) i pufera Tris-HCl kao u uzorcima koji će se mjeriti. Pufer za eluciju (BR5) ima visoku apsorbanciju pri 220 nm, što može dovesti do visokih pozadinskih razina apsorbancije ako spektrofotometar nije propisno postavljen na nultu vrijednost.



Za kvantifikaciju u puferu Tris-HCl primijenite odnos $A_{260} = 1 \Rightarrow 44\text{ }\mu\text{g/ml}$. Pogledajte Dodatak B, stranica 77.

17. Uklonite nosač za bočice za reagense s radne površine instrumenta QIAcube Connect MDx (pogledajte sliku 18, stranica 62) te zatvorite sve bočice za reagense propisno označenim poklopcima. Zatvorite sve bočice koje sadržavaju pufere i vodu bez RNaze, bočice i epruvete koje sadržavaju enzime i pufere za enzime te vrećice koje sadržavaju plastični materijal iz kompleta korištenog za protokol. Do sljedeće uporabe pohranite preostali sadržaj kompleta i bočice za reagense kako je opisano u odjeljcima „Pohrana i rukovanje reagensima“ (stranica 22) i „Stabilnost tijekom uporabe“ (stranica 22).

* Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (STL) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

Uklonite i zbrinite preostale reagense u epruветama za obradu u utorima za epruветe za mikrocentrifugu instrumenta QIAcube Connect MDx. Uklonite i zbrinite adaptere rotora iz centrifuge. Ispraznite ladicu za otpad instrumenta QIAcube Connect MDx (pogledajte sliku 15, stranica 58). Zatvorite vratašca instrumenta te isključite instrument prekidačem za napajanje.

Ograničenja uporabe proizvoda

Komplet PAXgene Blood RNA Kit namijenjen je za izolaciju unutarstanične RNK iz ljudske pune krvi ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocita/ml) za in vitro dijagnostičke primjene. Nije namijenjen za izolaciju genomske DNK ili nukleinskih kiselina virusa iz ljudske pune krvi. Zbog ograničenog broja transkripata potvrđenih za specifikacije stabilizacije (genski transkripti FOS i IL1B), značajke radnog učinka nisu utvrđene za sve transkripte. Korisnici trebaju pregledati podatke proizvođača i svoje vlastite podatke kako bi odredili je li potrebno potvrđivanje za druge transkripte. Komponente kompleta namijenjene su samo za uporabu u ručnom i automatiziranom protokolu opisanom u ovim uputama za uporabu.

Informacije o uporabi epruveta PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) potražite u *Priručniku za PAXgene Blood RNA Tube*.

Kontrola kvalitete

U skladu sa sustavom za upravljanje kvalitetom društva QIAGEN certificiranim u skladu s normom ISO, svaka serija kompleta PAXgene Blood RNA Kit ispituje se prema unaprijed određenim specifikacijama kako bi se osigurala dosljedna kvaliteta proizvoda.

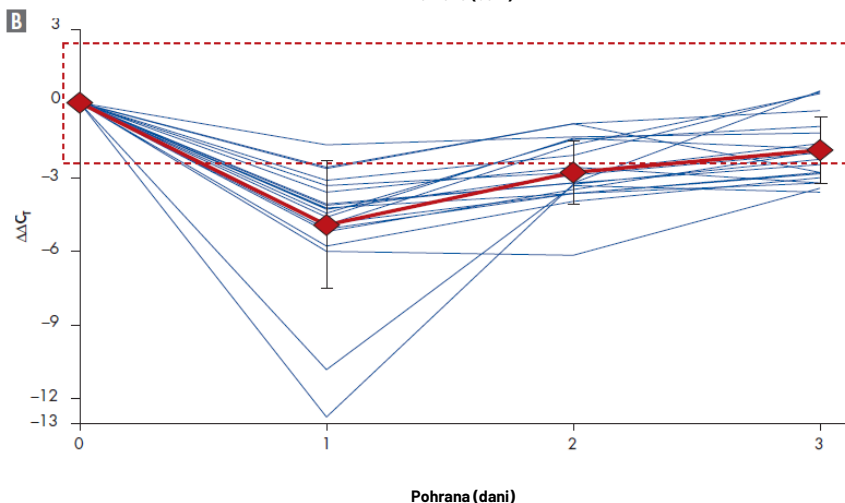
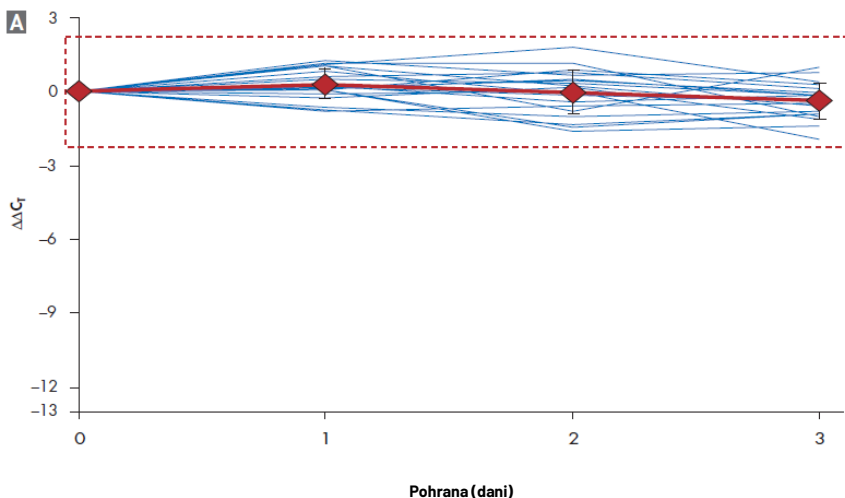
Radne značajke

Prikupljanje i stabilizacija uzoraka

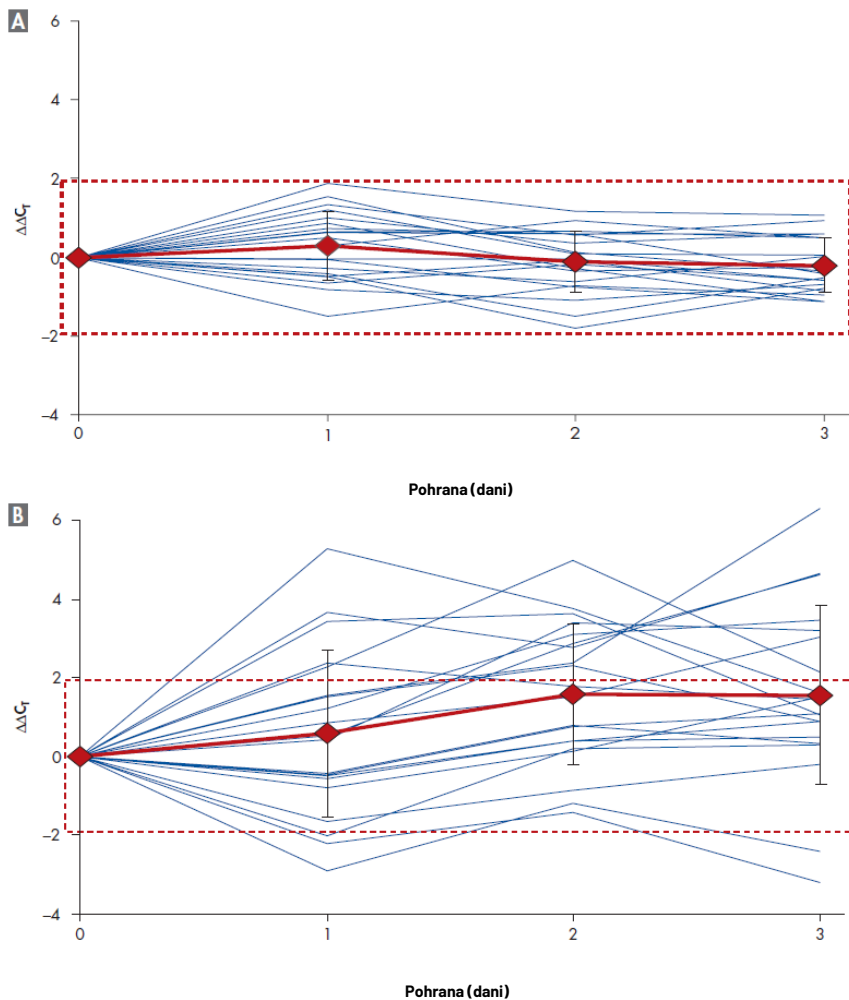
Epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) sadržavaju vlasnički reagens za stabilizaciju RNK. Taj aditiv štiti molekule RNK od degradacije RNazama i umanjuje *ex vivo* promjene u ekspresiji gena. Epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) namijenjene su za prikupljanje ljudske pune krvi i stabilizaciju stanične RNK do 3 dana pri 18 – 25 °C (slika 4 i slika 5, stranice 41 i 42) ili do 5 dana pri 2 – 8 °C (slika 6 i slika 7, stranice 43 i 44). Osim toga, stabilizirana krv može se pohraniti zamrznuta. Trenutačno dostupni podaci pokazuju stabilizaciju stanične RNK tijekom najmanje 11 godina pri –20 °C ili –70 °C*. Više informacija iz aktualnih ispitivanja kojima se procjenjuje stabilnost tijekom dužih razdoblja možete pronaći na stranici www.preanalytix.com ili se možete obratiti tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.

Stvarno trajanje stabilizacije RNK može varirati ovisno o vrsti stanične RNK i upotrijebljenom postupku daljnje obrade. Zbog ograničenog broja transkripata potvrđenih za specifikacije stabilizacije (genski transkripti FOS i IL1B), značajke radnog učinka nisu utvrđene za sve transkripte. Korisnici trebaju pregledati podatke proizvođača i svoje vlastite podatke kako bi odredili je li potrebno potvrđivanje za druge transkripte.

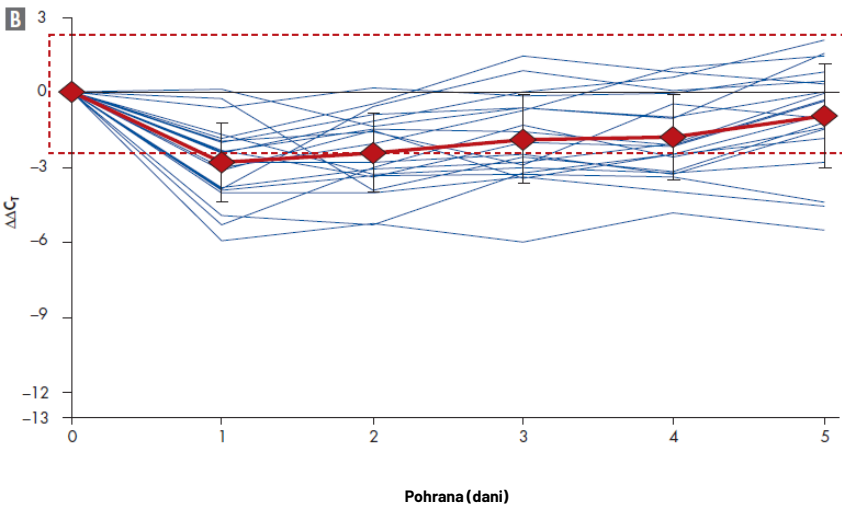
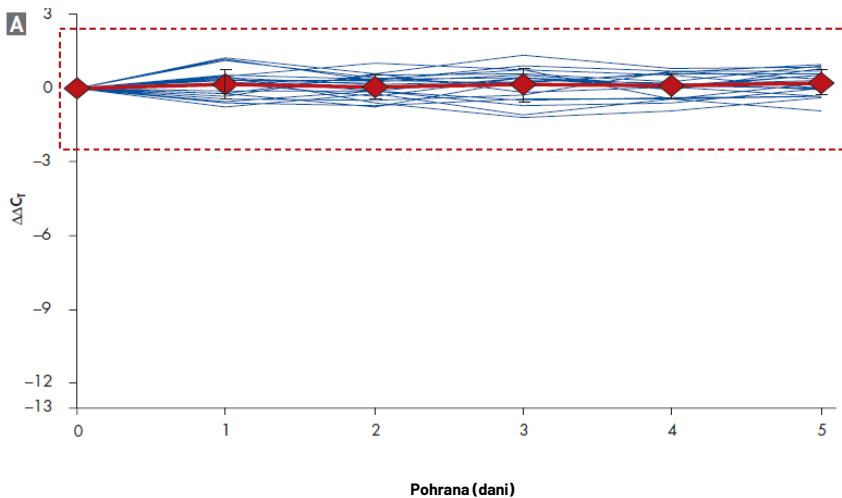
* U tijeku je dugoročno ispitivanje pohrane krvi u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes.



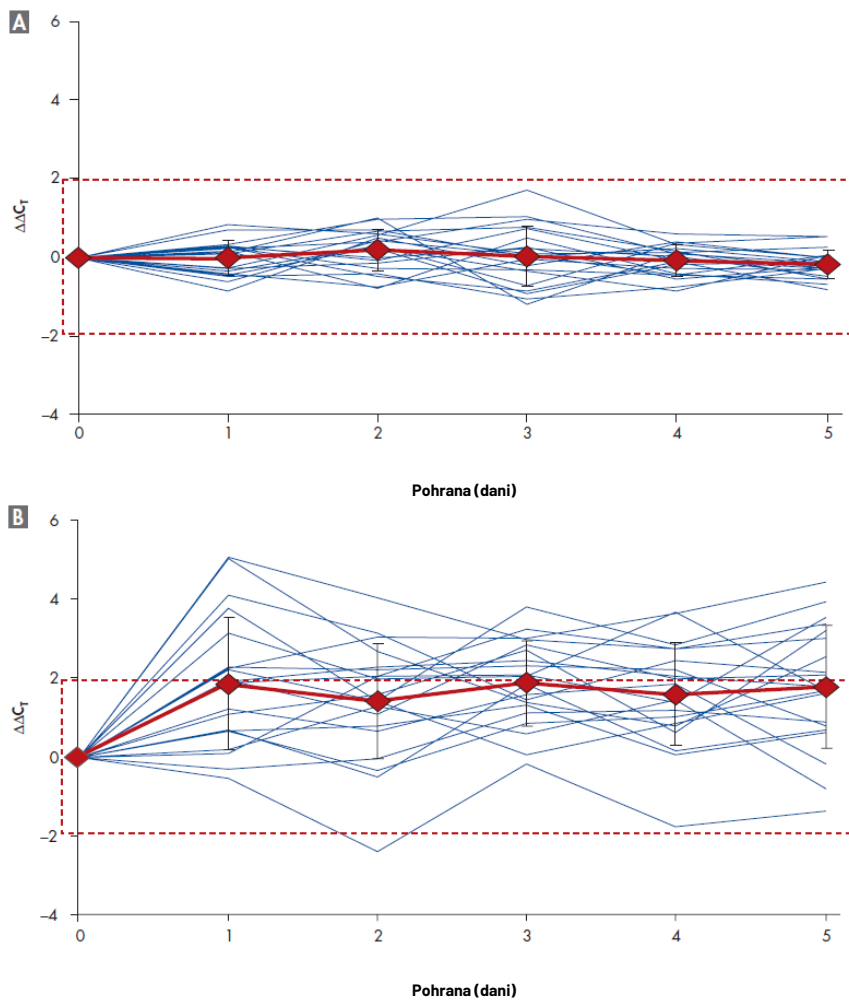
Slika 4: Stabilnost RNK u uzorcima krvi pri 18 – 25 °C: FOS. Krv je prikupljena od 10 naizgled zdravih davatelja, uz duplikate uzoraka, te pohranjena na 18 – 25 °C tijekom navedenog broja dana, nakon čega je slijedila izolacija ukupne RNK. **[A]** Krv je prikupljena i pohranjena u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), a ukupna RNK pročišćena je s pomoću kompleta PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Krv je prikupljena i pohranjena u standardne epruvete za prikupljanje krvi s etilendiamintetraocetnom kiselinom (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) kao antikoagulansom, a ukupna je RNK pročišćena s pomoću standardne metode organske izolacije s čišćenjem RNK na bazi membrane od silika-gela. Relativne razine transkripta gena FOS određene su dvostrukom real-time RT-PCR reakcijom, uz uporabu 18S rRNK kao internog standarda. Ucrtane su vrijednosti svih uzoraka, s prikazanim srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama svih uzoraka. Isprekidane linije označavaju ukupnu preciznost ispitivanja od $\pm 3 \times (2,34 C_T)$.



Slika 5: Stabilnost RNK u uzorcima krvi pri 18 – 25 °C: IL1B. Krv je prikupljena i ukupna RNK pročišćena, nakon pohrane pri 18 – 25 °C, kako je opisano na slici 4. Relativne razine transkripta gena IL1B određene su dvostrukom real-time RT-PCR reakcijom, uz uporabu 18S rRNK kao internog standarda. U crtane su vrijednosti svih uzoraka, s prikazanim srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama svih uzoraka. Isprekidane linije označavaju ukupnu preciznost ispitivanja od $\pm 3 \times (1,93 C_t)$.



Slika 6: Stabilnost RNK u uzorcima krvi pri 2 – 8 °C: FOS. Krv je prikupljena od 10 davatelja, uz duplikate uzoraka, te pohranjena na 2 – 8 °C tijekom navedenog broja dana, nakon čega je slijedila izolacija ukupne RNK. **[A]** Krv je prikupljena i pohranjena u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), a ukupna RNK pročišćena je s pomoću kompleta PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Krv je prikupljena i pohranjena u standardne epruvete za prikupljanje krvi s etilendiamintetraocetnom kiselinom (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) kao antikoagulansom, a ukupna je RNK pročišćena s pomoću standardne metode organske izolacije s čišćenjem RNK na bazi membrane od silika-gela. Relativne razine transkripta gena FOS određene su dvostrukom real-time RT-PCR reakcijom, uz uporabu 18S rRNK kao internog standarda. Ucrtane su vrijednosti svih uzoraka, s prikazanim srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama svih uzoraka. Isprekidane linije označavaju ukupnu preciznost ispitivanja od $\pm 3 \times (2,34 C_T)$.



Slika 7: Stabilnost RNK u uzorcima krvi pri 2 – 8 °C: IL1B. Krv je prikupljena i ukupna RNK pročišćena, nakon pohrane pri 2 – 8 °C, kako je opisano na slici 6. Relativne razine transkripta gena IL1B određene su dvostrukom real-time RT-PCR reakcijom, uz uporabu 18S rRNK kao internog standarda. Ucartane su vrijednosti svih uzoraka, s prikazanim srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama svih uzoraka. Isprekidane linije označavaju ukupnu preciznost ispitivanja od $\pm 3 \times (1,93 C_t)$.

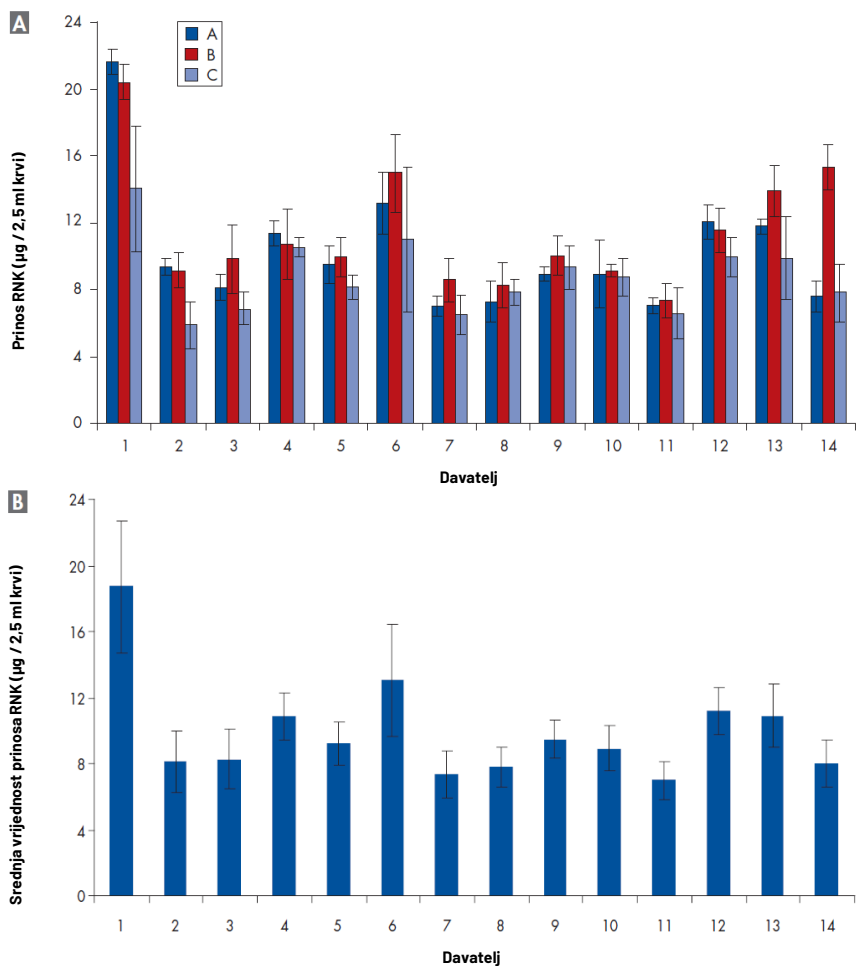
Ručna izolacija RNK

Ukupna RNK izolirana sustavom PAXgene Blood RNA System je čista. Prilikom uporabe ručnog protokola vrijednosti A_{260}/A_{280} su između 1,8 i 2,2, a $\leq 1\%$ (w/w) genomske DNK prisutno je u $\geq 95\%$ svih uzoraka, što je izmjereno kvantitativnom real-time PCR reakcijom sekvence gena beta-aktin. Barem 95 % uzoraka ne pokazuje inhibiciju u reakciji RT-PCR kada eluat čini do 30 % volumena reakcije RT-PCR.

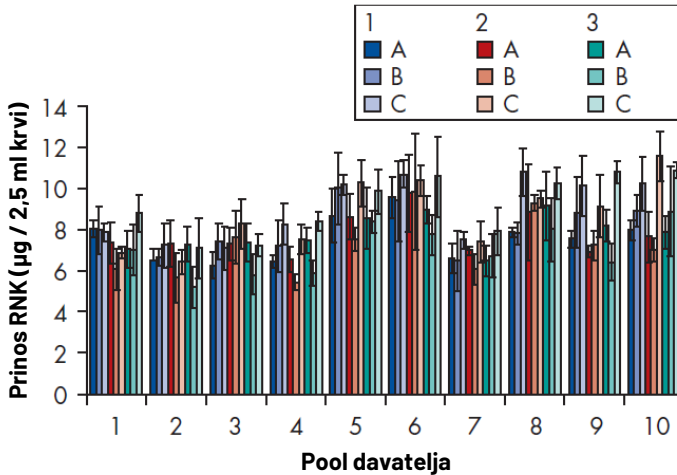
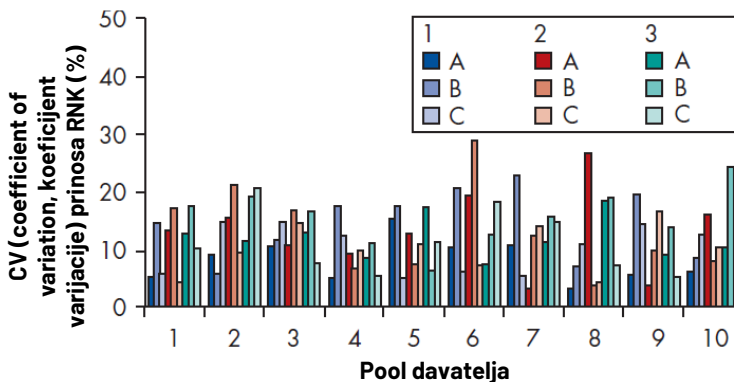
Za uporabu ručnog protokola prosječno je vrijeme pripreme uzoraka (na temelju podataka iz 12 procesa pripreme uzoraka) otprilike 90 min*, sa samo 40 min vremena rada rukama. Prinosi RNK iz 2,5 ml zdrave ljudske pune krvi su $\geq 3\ \mu\text{g}$ za $\geq 95\%$ obrađenih uzoraka. Budući da prinosi u velikoj mjeri ovise o davatelju, individualni prinosi mogu varirati. Za pojedinačne davatelje sustav PAXgene Blood RNA System pruža visoko obnovljive i ponovljive prinose (slika 8 i slika 9, stranice 46 i 47) te obnovljivu i ponovljivu reakciju RT-PCR (slika 10 i slika 11, stranice 51 i 52), što ga čini vrlo učinkovitim za klinička dijagnostička ispitivanja.

Slika 8 (stranica 46) označava sveukupnu ponovljivost i obnovljivost rezultata sustava PAXgene Blood RNA System. Provedena su dodatna ispitivanja kako bi se prikazao utjecaj različitih serija kompleta PAXgene Blood RNA Kit i različitih rukovatelja na obnovljivost prinosa RNK i radnog učinka reakcije RT-PCR u stvarnom vremenu. Budući da su za ta ispitivanja upotrebljavani uzorci krvi iz poola umjesto pojedinačnih uzoraka iz epruveta PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), rezultati ne odražavaju ponovljivost sustava, uključujući promjene između pojedinačnih prikupljanja krvi, nego samo ponovljivost pripreme uzoraka (pogledajte sliku 9, stranica 47).

* Ukupno vrijeme trajanja protokola, uključujući unaprijed obavljeno rukovanje epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugiranje, ispiranje taloga i resuspendiranje taloga).



Slika 8: Obnovljiva i ponovljiva izolacija RNK. Učetverostručene uzorke krvi od 14 davatelja ručno je obradio svaki od 3 tehničara pojedinačno (A, B, C). Upotrijebljena su tri kompleta opreme te su svi uzorci koje je pripremio jedan tehničar obrađeni s pomoću iste opreme. [A] Prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije prinosa RNK po replikatima uzoraka istih davatelja, koje su obradili različiti tehničari. [B] 3 različita tehničara obradila su dvanaest replikata uzoraka krvi od svakoga od 14 davatelja. Prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije prinosa RNK po uzorcima od istih davatelja, koje su obradili svi tehničari. Za sve RNK uzorke, omjeri A_{260}/A_{280} imali su raspon od 1,8 do 2,2.

A**B**

Slika 9: Ponovljivost i obnovljivost prinosa RNK za različite rukovatelje i serije kompleta PAXgene Blood RNA Kit uz uporabu uzoraka krvi iz poola. Uzorci krvi od 30 različitih davatelja prikupljeni su u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 epruveta po davatelju, ukupno 360 epruveta). Sadržaj epruveta od 3 davatelja uključen je u pool i potom ponovno alikvotiran u 36 uzoraka. Tih 36 uzoraka po poolu od 3 davatelja ručno su obradila 3 različita rukovatelja. Svaki je rukovatelj upotrijebio 3 različite serije kompleta PAXgene Blood RNA Kit za izolaciju RNK i obradio četverostručene uzorke iz svakog od 10 poolova davatelja. **[A]** Prinos RNK i standardna devijacija za svaku kombinaciju rukovatelj – serija. Učetverostručene uzorke krvi iz 10 poolova davatelja obradila su 3 različita rukovatelja (A, B, C) koristeći svaku od 3 serija kompleta (1, 2, 3). Prikazane su srednje vrijednosti (stupci) i standardne devijacije (trake s pogreškama) po učtetverostručenom uzorku od istog davatelja za različite rukovatelje i različite serije kompleta. **[B]** CV prinosa RNK po poolu davatelja za sve kombinacije rukovatelj – serija (A, B, C; 1, 2, 3), izračunat iz srednje vrijednosti prinosa i standardne devijacije prinosa prikazan je na slici 9A.

Tablica 1A: Obnovljivost unutar svake serije i svakog korisnika za odabrane poolove davatelja (1, 6, 9, 10)

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

Tablica 1B: Obnovljivost unutar svakog korisnika i između svih serija za odabrane poolove davatelja (1, 6, 9, 10)

Kombinacija podataka	Pool davatelja 1 ($5,1 \times 10^6$ stanica/ml)			Pool davatelja 6 ($6,5 \times 10^6$ stanica/ml)		
	Srednji prinos (μg)	SD (μg)	CV (%)	Srednji prinos (μg)	SD (μg)	CV (%)
Korisnik A, sve serije	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Korisnik B, sve serije	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Korisnik C, sve serije	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
	Pool davatelja 9 ($8,4 \times 10^6$ stanica/ml)			Pool davatelja 10 ($10,2 \times 10^6$ stanica/ml)		
	Srednji prinos (μg)	SD (μg)	CV (%)	Srednji prinos (μg)	SD (μg)	CV (%)
Korisnik A, sve serije	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Korisnik B, sve serije	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Korisnik C, sve serije	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

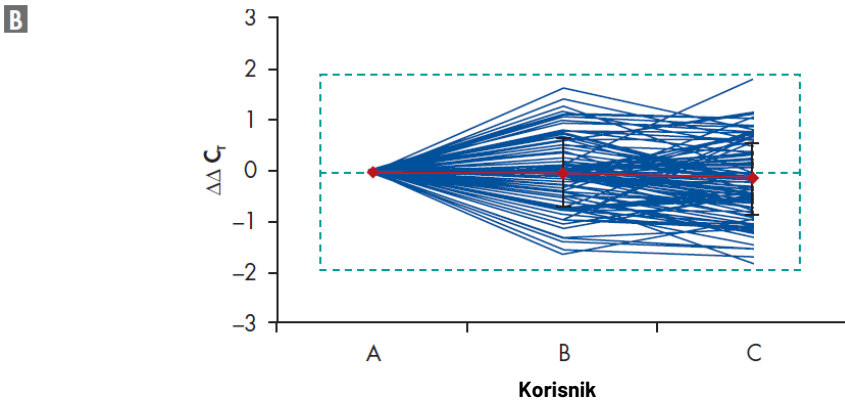
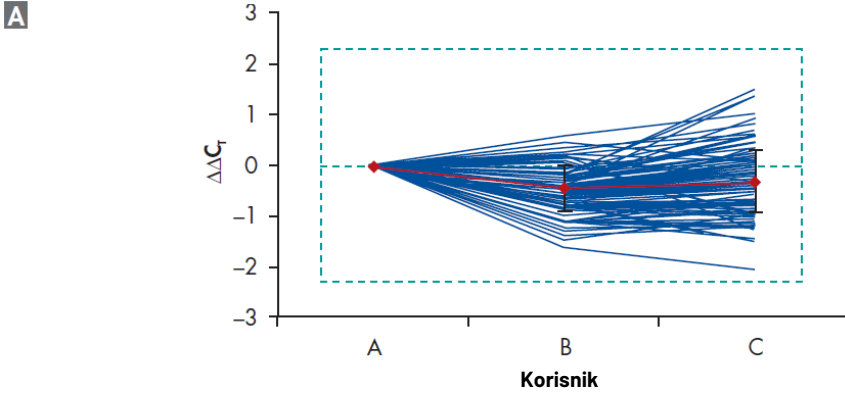
Tablica 1C: Obnovljivost unutar svake serije i između svih korisnika za odabrane poolove davatelja (1, 6, 9, 10)

Kombinacija podataka	Pool davatelja 1 ($5,1 \times 10^6$ stanica/ml)			Pool davatelja 6 ($6,5 \times 10^6$ stanica/ml)		
	Srednji prinos (μg)	SD (μg)	CV (%)	Srednji prinos (μg)	SD (μg)	CV (%)
Serija 1, svi korisnici	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Serija 2, svi korisnici	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Serija 3, svi korisnici	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
	Pool davatelja 9 ($8,4 \times 10^6$ stanica/ml)			Pool davatelja 10 ($10,2 \times 10^6$ stanica/ml)		
	Srednji prinos (μg)	SD (μg)	CV (%)	Srednji prinos (μg)	SD (μg)	CV (%)
Serija 1, svi korisnici	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Serija 2, svi korisnici	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Serija 3, svi korisnici	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

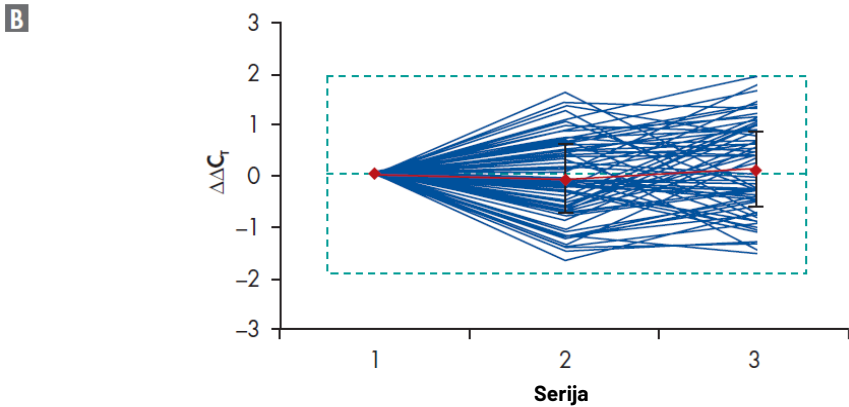
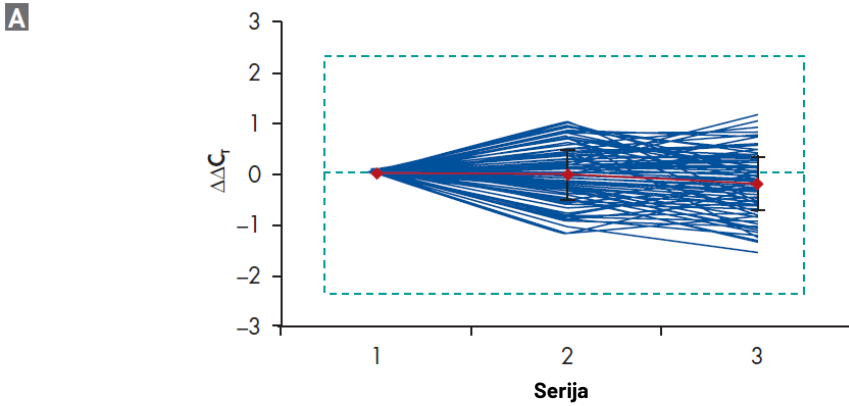
Tablica 1D: Obnovljivost između svih serija i svih korisnika za odabrane poolove davatelja (1, 6, 9, 10)

Kombinacija podataka	Pool davatelja 1 ($5,1 \times 10^6$ stanica/ml)			Pool davatelja 6 ($6,5 \times 10^6$ stanica/ml)		
	Srednji prinos (μg)	SD (μg)	CV (%)	Srednji prinos (μg)	SD (μg)	CV (%)
Serija 1, svi korisnici	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
	Pool davatelja 9 ($8,4 \times 10^6$ stanica/ml)			Pool davatelja 10 ($10,2 \times 10^6$ stanica/ml)		
	Srednji prinos (μg)	SD (μg)	CV (%)	Srednji prinos (μg)	SD (μg)	CV (%)
Serija 1, svi korisnici	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Detaljna analiza 4 reprezentativna poola davatelja. Poolovi su odabrani prema broju bijelih krvnih stanica i odražavaju visoke, srednje i niske vrijednosti normalnog raspona broja bijelih krvnih stanica ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocita/ml). Broj bijelih krvnih stanica predstavlja srednju vrijednost od 3 broja bijelih krvnih stanica od 3 davatelja po poolu davatelja.



Slika 10: Obnovljivost reakcije RT-PCR: između korisnika. Za real-time RT-PCR reakciju upotrijebljena je RNK pročišćena u eksperimentu opisanom na slici 9. Relativne razine transkripta gena [A] FOS i [B] IL1B određene su dvostrukom real-time RT-PCR reakcijom, uz uporabu 18S rRNK kao internog standarda. Ucrtane su vrijednosti za sve uzorke, u odnosu na vrijednosti za korisnika A (10 poolova davatelja x 3 serije kompleta x 4 replikata uzoraka = 120 skupova podataka za svaki gen), sa srednjim vrijednostima (crvene linije) i standardnim devijacijama (crne trake) za sve prikazane uzorke. Isprekidane linije označavaju ukupnu preciznost ispitivanja od $\pm 3 \times$ (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).



Slika 11: Obnovljivost reakcije RT-PCR: između serija kompleta. Za real-time RT-PCR reakciju upotrijebljena je RNK pročišćena u eksperimentu opisanom na slici 9. Relativne razine transkripta gena **[A] FOS** i **[B] IL1B** određene su dvostrukom real-time RT-PCR reakcijom, uz uporabu 18S rRNK kao internog standarda. Ucrtane su vrijednosti za sve uzorke, u odnosu na vrijednosti za seriju kompleta 1 (10 poolova davatelja x 3 korisnika x 4 replikata uzoraka = 120 skupova podataka za svaki gen), sa srednjim vrijednostima (crvene linije) i standardnim devijacijama (crne trake) za sve prikazane uzorke. Isprekidane linije označavaju ukupnu preciznost ispitivanja od $\pm 3 \times$ (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

Tablica 2: Sažetak podataka o reakciji RT-PCR sa slike 10 i slike 11 **Fig11**

Sustav testa	Ispitivanje FOS/18S rRNK		Ispitivanje IL1B/18S rRNK	
Usporedba podataka	Srednja vrijednost ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Srednja vrijednost ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Obnovljivost unutar svakog korisnika i između svih serija				
Svi korisnici, serija 1 – serija 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Svi korisnici, serija 1 – serija 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Svi korisnici, serija 1 – serija 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Obnovljivost unutar svakog korisnika i između svih serija				
Sve serije, korisnik A – korisnik A	0,00	0,00	0,00	0,00
Sve serije, korisnik A – korisnik B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Sve serije, korisnik A – korisnik C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Korisnik: tehničar koji je proveo ispitivanje.

Serija: broj serije kompleta koji se koristi u ovom ispitivanju.

SD: standardna devijacija.

Srednje vrijednosti $\Delta\Delta C_T$ (N = 120) i standardne devijacije prikazane su za podatke prikazane na slici 10 i slici 11.

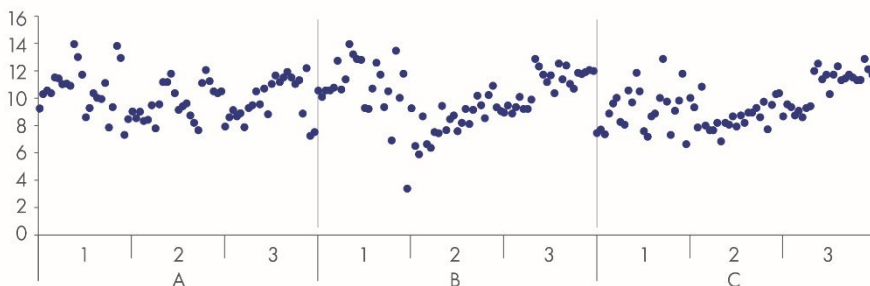
Automatizirana izolacija RNK

Prinosi RNK iz 2,5 ml zdrave ljudske pune krvi su $\geq 3 \mu\text{g}$ za $\geq 95\%$ obrađenih uzoraka. Slika 12 (stranica 54) prikazuje prinose RNK iz ukupno 216 uzoraka pripremljenih s pomoću automatiziranog protokola s 3 serije kompleta koje su obradila 3 rukovatelja. Budući da su za ta ispitivanja upotrebljavani uzorci krvi iz poola umjesto pojedinačnih uzoraka iz epruveta PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), rezultati ne odražavaju prinos RNK očekivan iz uzoraka dobivenih jednostrukim pojedinačnim prikupljanjem krvi. Budući da prinosi u velikoj mjeri ovise o davatelju, pojedinačni prinosi mogu varirati (slika 12, stranica 54).

Barem 95 % uzoraka ne pokazuje inhibiciju u reakciji RT-PCR kada eluat čini do 30 % volumena reakcije RT-PCR. Prilikom uporabe automatiziranog protokola križna kontaminacija između uzoraka ne može se detektirati, što je izmjereno kvantitativnom real-time RT-PCR reakcijom sekvenci transkripata gena ABL1 i FOS u uzorcima negativnima na RNK (voda) u usporedbi s uzorcima pozitivnima na RNK (ljudska puna krv) u istom procesu.

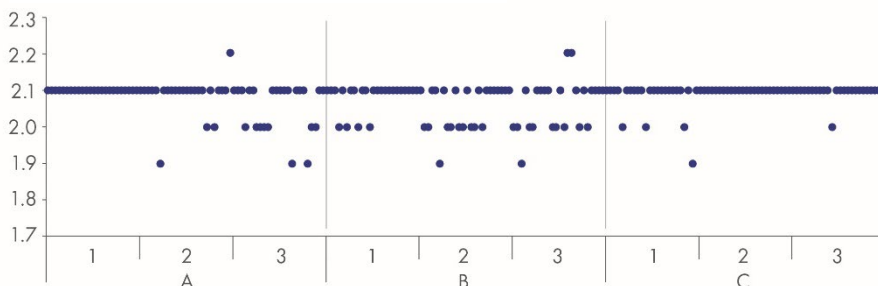
RNA izolirana sustavom PAXgene Blood RNA System i automatiziranim protokolom je čista, što je dokazano nedostatkom inhibicije reakcije RT-PCR i vrijednostima A_{260}/A_{280} između 1,8 i 2,2. Genomska DNK je prisutna u količini od $\leq 1\%$ (w/w) u $\geq 95\%$ svih uzoraka, što je izmjereno kvantitativnom real-time PCR reakcijom sekvence gena beta-aktin. Slika 13 i Slika 14 (stranica 55) pokazuju vrijednosti A_{260}/A_{280} i relativnu genomsku DNK iz ukupno 216 uzoraka pripremljenih s pomoću automatiziranog protokola s 3 serije kompleta koje su obradila 3 rukovatelja.

Prinos RNK ($\mu\text{g}/2,5\text{ ml}$ krvi) QIAcube Connect MDx



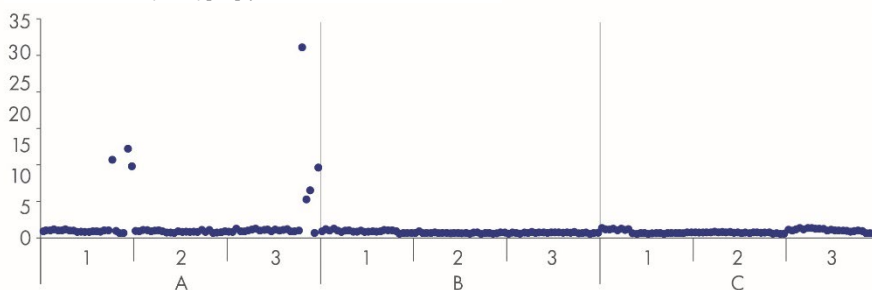
Slika 12: Prinos RNK – automatizirana obrada na instrumentu QIAcube Connect MDx. Krvni uzorci pojedinačnih davatelja prikupljeni su u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Sadržaj epruveta uključen je u 6 poolova davatelja i naknadno ponovno alikvotiran. Ukupno 216 epruveta (odnosno 36 po poolu) obradila su 3 različita rukovatelja (A, B, C). Svaki je rukovatelj upotrijebio 3 različite serije (1, 2, 3) kompleta PAXgene Blood RNA Kit za automatiziranu izolaciju na instrumentu QIAcube Connect MDx i obradio učetverostručene uzorke iz svakog od 6 poolova davatelja. Za svaku kombinaciju rukovatelj – serija prikazani su prinosi RNK svih pojedinačnih uzoraka.

Čistoća RNK (A_{260}/A_{280}) QIAcube Connect MDx



Slika 13: Čistoća RNK (vrijednosti A_{260}/A_{280}) – automatizirana obrada na instrumentu QIAcube Connect MDx. RNK su pročitila 3 različita rukovatelja (A, B, C) koristeći 3 različite serije (1, 2, 3) kompleta PAXgene Blood RNA Kit na instrumentu QIAcube Connect MDx u eksperimentu opisanom na slici 12. Za svaku kombinaciju rukovatelj – serija prikazane su vrijednosti A_{260}/A_{280} za sve pojedinačne uzorke.

Genomska DNK (w/w) [%] QIAcube Connect MDx



Slika 14: Čistoća RNK (% kontaminacije genomskom DNK) – automatizirana obrada na instrumentu QIAcube Connect MDx. RNK su pročitila 3 različita rukovatelja (A, B, C) koristeći 3 različite serije (1, 2, 3) kompleta PAXgene Blood RNA Kit na instrumentu QIAcube Connect MDx u eksperimentu opisanom na slici 12. Za svaku kombinaciju rukovatelj – serija prikazane su količine genomske DNK (w/w) u svim pojedinačnim uzorcima.

Automatizirani protokol izolacije RNK s pomoću sustava PAXgene Blood RNA System pruža visoko obnovljive i ponovljive rezultate reakcije RT-PCR, što ga čini vrlo učinkovitim za klinička dijagnostička ispitivanja.

Stabilnost izolirane RNK

Uzorci RNK izolirani iz epruveta PAXgene Blood RNA Tubes napunjenih krvlju s pomoću kompleta PAXgene Blood RNA Kit stabilni su 5 godina u slučaju pohrane pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 7 godina u slučaju pohrane pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (krajnja točka ispitivanja).

Važne napomene

Uporaba instrumenta QIAcube Connect MDx

Upoznajte se s radom instrumenta QIAcube Connect MDx. Prije početka automatiziranog protokola PAXgene Blood RNA pročitajte korisnički priručnik instrumenta i sve dodatne informacije isporučene s instrumentom, obraćajući posebnu pozornost na sigurnosne informacije.

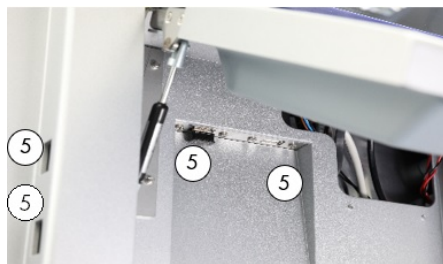
Pokretanje instrumenta QIAcube Connect MDx

Zatvorite vratašca instrumenta QIAcube Connect MDx i uključite instrument prekidačem za napajanje (pogledajte sliku 15, stranica 58).

Oglašava se zvučni signal i pojavljuje se zaslon pokretanja. Instrument automatski izvodi početna testiranja.



Pogled sprijeda na instrument QIAcube Connect MDx



Izvučeni dodirni zaslon



Pogled straga na instrument QIAcube Connect MDx (lijeva strana)



Pogled straga na instrument QIAcube Connect MDx (desna strana)

Slika 15: Vanjske značajke instrumenta QIAcube Connect MDx.

- | | |
|---|--|
| <p>1 Dodirni zaslon</p> <p>2 Vratašca</p> <p>3 Ladica za otpad</p> <p>4 Prekidač za napajanje</p> | <p>5 2 USB priključka s lijeve strane dodirnog zaslona; 2 USB priključka iza dodirnog zaslona (Wi-Fi modul ukopčan je u 1 USB priključak)</p> <p>6 Ethernet priključak RJ-45</p> <p>7 Utičnica za kabel napajanja</p> <p>8 Otvori za izlaz zraka za hlađenje</p> |
|---|--|

Dodirni zaslon

Instrumentom QIAcube Connect MDx upravlja se s pomoću dodirnog zaslona. Dodirni zaslon korisniku omogućuje rukovanje instrumentom i vodi ga kroz postavljanje radne površine. Tijekom obrade uzorka na dodirnom zaslonu prikazuje se status protokola i preostalo vrijeme.





Slika 16: Izvučeni dodirni zaslon instrumenta QIAcube Connect MDx.

Instaliranje protokola na instrument QIAcube Connect MDx

Prvotno instaliranje protokola može biti potrebno prije nego što se može izvesti prvi proces pripreme RNK na instrumentu QIAcube Connect MDx. Instalirajte oba protokola „PAXgene Blood RNA Part A” i „PAXgene Blood RNA Part B”.

Protokoli za instrument QIAcube Connect MDx dostupni su na stranici **www.qiagen.com** i moraju se preuzeti na USB štapić isporučen s instrumentom. Ti se protokoli prenose na instrument putem USB priključka.

USB priključak (koji se nalazi s bočne strane dodirnog zaslona, pogledajte sliku 15, stranica 58) omogućuje povezivanje instrumenta QIAcube Connect MDx s USB štapićem isporučenim s instrumentom. Podatkovne datoteke, primjerice datoteke zapisa ili datoteke izvješća, također se mogu prenositi s instrumenta na USB štapić putem USB priključka.

-  USB priključak namijenjen je samo za uporabu uz USB štapić koji isporučuje društvo QIAGEN. Ne priključujte druge uređaje na ovaj priključak.
-  Ne uklanjajte USB štapić dok je u tijeku preuzimanje protokola ili prijenos podatkovnih datoteka ili tijekom izvođenja protokola.



Dodatne podatke o postupku prijenosa protokola na instrument QIAcube Connect MDx potražite u korisničkom priručniku instrumenta.

Punjenje instrumenta QIAcube Connect MDx

Radi uštede vremena punjenje se može izvesti tijekom jednog ili oba koraka centrifuge u trajanju od 10 min (koraci 3 i 5) u „Protokol: automatizirana izolacija ukupne RNK iz ljudske pune krvi prikupljene u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)“, stranica 31.

Bočice za reagense

Prije svakog procesa na instrumentu QIAcube Connect MDx pažljivo napunite 4 bočice za reagense reagensima navedenima u tablici 3 (stranica 61) do maksimalne razine indikatora ili, ako to nije moguće, do razine koju dopuštaju volumeni pufera isporučeni u kompletu PAXgene Blood RNA Kit. Jasno označite bočice i poklopce nazivima pufera i postavite napunjene bočice za reagense u odgovarajuće položaje na nosaču za bočice za reagense. Postavite nosač na radnu površinu instrumenta kako je prikazano (slika 17 i slika 18, stranice 61 i 62).

-  Isporučeni volumen pufera BR2 neće napuniti bočicu za reagense do razine indikatora. Puferi BR3 i BR4 možda neće napuniti bočicu do razine indikatora nakon obrade više uzoraka u prethodnim procesima.
-  Pobrinite se da ste uklonili poklopce s bočica prije postavljanja na radnu površinu.



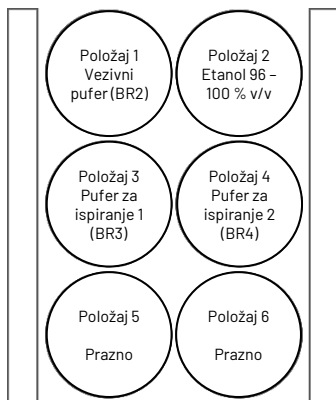
Volumeni pufera isporučeni u kompletu PAXgene Blood RNA Kit (50) dovoljni su za najviše 7 procesa pripreme RNK na instrumentu QIAcube Connect MDx, s 2 do 12 uzoraka po procesu. U pravilu bi se procesi s malim brojem uzoraka po procesu trebali izbjegavati kako bi se obradilo ukupno 50 uzoraka po kompletu. Više od 7 procesa pripreme RNK može dovesti do nedovoljnih volumena pufera za obradu posljednjih uzoraka.

Tablica 3: Položaji na nosaču za bočice za reagense

Položaj	Reagens
1	Veživni pufer (BR2)
2	Etanol (96 – 100 % v/v)
3	Pufer za ispiranje 1 (BR3)
4	Pufer za ispiranje 2 (BR4)*
5	– (ostaviti prazno)
6	– (ostaviti prazno)

* Pufer za ispiranje 2 (BR4) isporučuje se kao koncentrat. Prije prve uporabe dodajte 4 volumena etanola (96 – 100 % v/v, razred čistoće p.a.), kako je naznačeno na bočici, za dobivanje radne otopine.

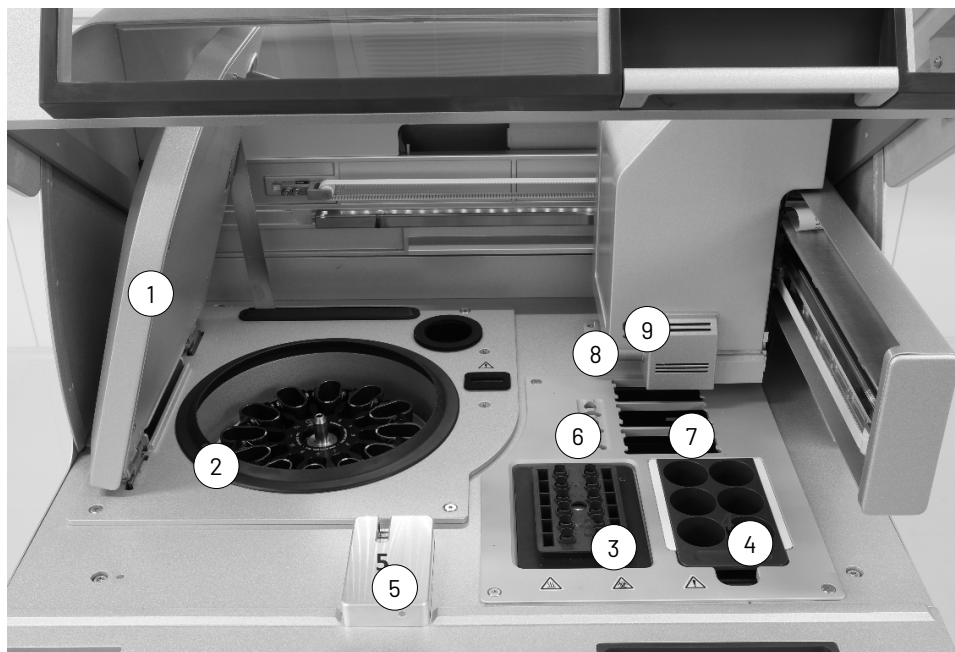
A



B



Slika 17: Punjenje nosača za bočice za reagense. [A] Shema položaja i sadržaja bočica u nosaču za bočice za reagense. [B] Postavljanje nosača u instrument QIAcube Connect MDx.



Slika 18: Unutarnji prikaz instrumenta QIAcube Connect MDx.

- | | | | |
|---|-----------------------------------|---|--|
| ① | Poklopac centrifuge | ⑥ | Utori za epruvete za mikrocentrifugu |
| ② | Centrifuga | ⑦ | 3 utora za nosače vrhova |
| ③ | Tresilica | ⑧ | Utori za zbrinjavanje za vrhove i kolone |
| ④ | Nosač za bočice za reagense | ⑨ | Robotska ruka (uključuje 1-kanalnu pipetu, hvataljku, ultrazvučni i optički senzor i UV LED) |
| ⑤ | Senzor za vrhove i brava vratašca | | |

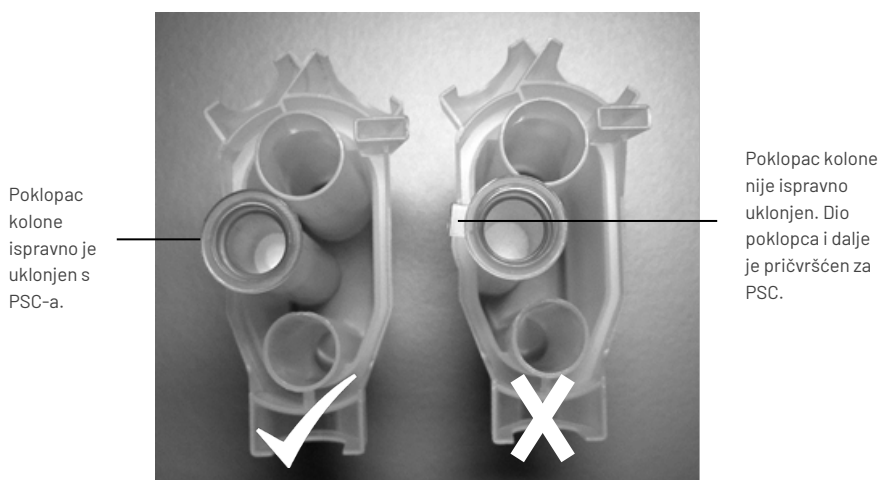
Spin kolone (PSC, PRC), epruveta za mikrocentrifugu i plastični pribor instrumenta QIAcube Connect MDx

Postavite 2 nosača vrhova ispunjena vrhovima s filtrom od 1000 µl na instrument QIAcube Connect MDx (pogledajte sliku 18, stranica 62). Ponovno napunite nosače vrhovima kada je to potrebno.

i Upotrebljavajte samo vrhove s filtrom od 1000 µl koji su namijenjeni uporabi s instrumentima QIAcube Connect MDx.

Označite adaptere rotora i epruvete za mikrocentrifugu za svaki uzorak s pomoću trajnog markera. Otvorite PSC za uporabu te potpuno odrežite poklopce škarama (pogledajte sliku 19).

i Kako biste omogućili propisan rad robotske hvataljke instrumenata QIAcube Connect MDx, potpuno odstranite (odrežite) poklopce i sve plastične dijelove koji povezuju poklopac s PSC-om (pogledajte sliku 19). U suprotnom robotska hvataljka neće moći pravilno zahvatiti PSC.



Slika 19: Postavljanje PSC-a. PSC se postavlja u srednji položaj adaptera rotora. Odrežite poklopac PSC-a prije postavljanja kolone.

Postavite PSC (bez poklopca, pogledajte sliku 19, stranica 63), PRC i označenu epruvetu za mikrocentrifugu u odgovarajuće položaje u svakom označenom adapteru rotora, kako je prikazano u tablici 4 i na slici 20.

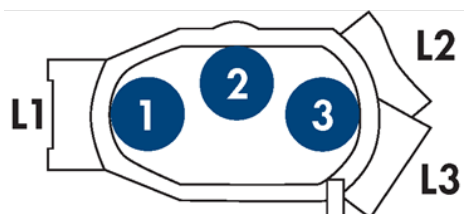


Pobrinite se da su poklopci spin kolone (PRC) i epruvete za mikrocentrifugu pogurnuti sve do dna utora na rubu adaptera rotora jer će u se u suprotnom poklopci odlomiti tijekom centrifugiranja.

Tablica 4: Plastični potrošni materijali u adapteru rotora

Položaj	Reagens	Položaj poklopca
1	Spin kolona PAXgene RNA (crvena, PRC)	L1
2	Spin kolona PAXgene Shredder (ljubičasta, PSC)(odrežite poklopac prije postavljanja u adapter rotora)	-
3	MCT*	L3

* Upotrijebite epruvetu za mikrocentrifugu (1,5 ml) uključenu u komplet PAXgene Blood RNA Kit.



Slika 20: Položaji na adapteru rotora. Adapter rotora ima 3 položaja za epruvete (1 – 3) i tri položaja za poklopce (L1 – L3).

Punjenje centrifuge

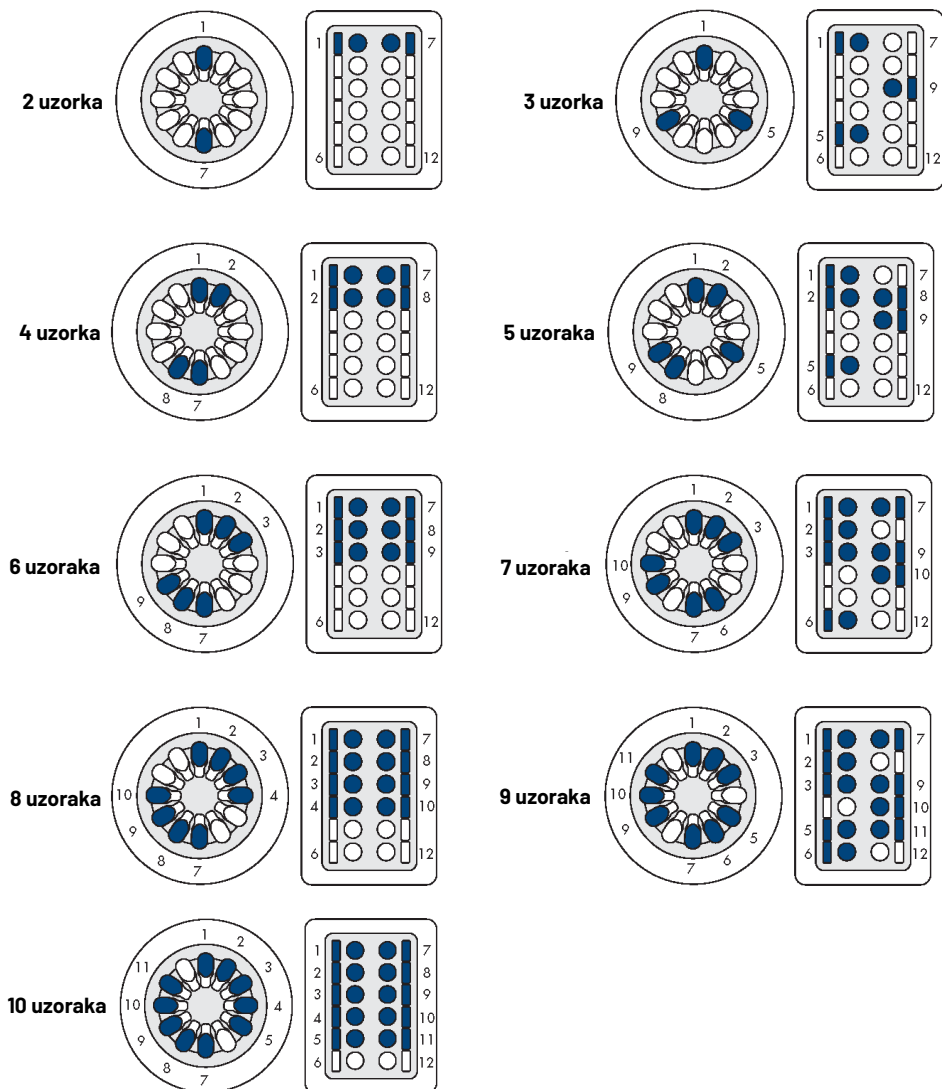
Postavite sastavljene adaptore rotora u vjedra centrifuge na instrumentu QIAcube Connect MDx kako je prikazano na slici 21 u nastavku.



Ako obrađujete manje od 12 uzoraka, pobrinite se da rasporedite uzorke kako bi rotor centrifuge bio ravnomjerno opterećen radijalno (pogledajte sliku 22, stranica 66). Sva vjedra centrifuge moraju biti montirana prije pokretanja procesa protokola, čak i u slučaju kada se obrađuje manje od 12 uzoraka. Pojedinačni (jedan) ili 11 uzoraka ne mogu se obrađivati.



Slika 21: Punjenje centrifuge na instrumentu QIAcube Connect MDx. Postavite sastavljene adaptore rotora u vjedra centrifuge.



Slika 22: Punjenje centrifuge i tresilice. Prikazani su položaji centrifuge i tresilice za obradu od dva (2) do deset (10) uzoraka. Jedan (1) ili 11 uzoraka ne mogu se obrađivati. U slučaju obrade 12 uzoraka svi su položaji centrifuge i tresilice popunjeni (slika nije prikazana).

Obrada epruveta

Uklonite epruvete za obradu preostale u utorima za epruvete za mikrocentrifugu iz prethodnih procesa (pogledajte sliku 18, stranica 62). Napunite 3 epruvete za obradu količinom reagensa navedenom u tablici 5 prema broju uzoraka u procesu.

Za mješavinu za inkubaciju DNaze I pipetirajte naznačeni volumen pufera za razgradnju DNK (RDD) u epruvetu za obradu i dodajte naznačeni volumen temeljne standardne otopine DNaze I (RNFD). Miješajte nježno pipetirajući cijelu mješavinu gore i dolje 3 puta uz uporabu vrha pipete od 1000 µl.



Upotrijebite epruvete za obradu od 2 ml uključene u komplet PAXgene Blood RNA Kit. Jasno označite epruvete nazivima reagensa i postavite ih u odgovarajući položaj u utorima za epruvete za mikrocentrifugu, kako je naznačeno u tablici 6 (stranica 68).



DNaza I (RNFD) je posebno osjetljiva na fizičku denaturaciju. Miješajte samo pipetiranjem, s pomoću širokih vrhova pipete, kako bi se smanjila fragmentacija. Ne miješajte vorteks miješalicom.

Pipetirajte samo potreban volumen, kako je naznačeno u tablici 5 u nastavku.

Tablica 5: Volumen reagensa potreban u epruветama za obradu za utore epruветa za mikrocentrifugu

Broj uzoraka	Volumen reagensa za naznačeni broj uzoraka (μl)		
	Proteinaza K (PK)	Mješavina za inkubaciju DNaze I	Pufer za eluciju (BR5)
2	126	187 (23 DNaze I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNaza I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNaze I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNaza I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNaza I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNaza I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNaza I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNaza I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNaza I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNaza I + 806 Buffer RDD)	1177

Tablica 6: Utori za epruветe za mikrocentrifugu

	Položaj		
	A	B	C
Sadržaj	Proteinaza K	Mješavina za inkubaciju DNaze I	Pufer za eluciju (BR5)
Posuda	Epruветa za obradu*	Epruветa za obradu*	Epruветa za obradu*

* Upotrijebite epruветe za obradu od 2 ml uključene u komplet PAXgene Blood RNA Kit.

Zbrinjavanje

Informacije o sigurnom zbrinjavanju nakon prikupljanja ispitaka i ručne izolacije RNK potražite u sigurnosnim informacijama i mjerama opreza na stranicama 18 i 19.

Osim toga, za automatiziranu izolaciju RNK na instrumentu QIAcube Connect MDx pogledajte sliku 21 i sliku 22, stranice 65 i 66, na kojima su naznačeni namjenski utori iskorištenih vrhova i kolona koje je potrebno zbrinuti.

Literatura

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.

Vodič za rješavanje problema

Ovaj vodič za rješavanje problema može biti koristan pri rješavanju bilo kojih problema koji mogu nastati. Za više informacija pogledajte stranicu s najčešćim pitanjima u našem centru za tehničku podršku: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Znanstvenici u tehničkoj službi društva QIAGEN uvijek će rado odgovoriti na sva pitanja koja možda imate vezano uz informacije i protokole u ovom priručniku ili tehnologije uzorkovanja i ispitivanja (informacije za kontakt potražite na posljednjoj stranici ili posjetite www.qiagen.com).

Komentari i prijedlozi	
Degradirana RNK	
a) Kontaminacija RNazom	 Pazite da ne unesete RNaze u reagense tijekom postupka ili kasnijeg rukovanja (pogledajte Dodatak A, stranica 76).
Niski prinos RNK	
b) Manje od 2,5 ml krvi prikupljeno u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT)	 Pobrinite se da je 2,5 ml krvi prikupljeno u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT; pogledajte <i>Priručnik za PAXgene Blood RNA Tube</i>)
c) Koncentracija RNK mjerena u vodi	 RNK mora biti razrijeđena u 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* za točnu kvantifikaciju (pogledajte Dodatak B, stranica 77).
d) Ostatak stanica prenesen u PRC u koracima 9 i 10 ručnog protokola	 Izbjegnite prenošenje velikih čestica prilikom pipetiranja supernatanta u koraku 7 ručnog protokola (prijenos malih ostataka neće utjecati na postupak).
e) Supernatant nije potpuno uklonjen u koraku 3	 Pobrinite se da je cijeli supernatant uklonjen. Ako je supernatant pretočen, uklonite kapljice s ruba epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT) papirnatom ručnikom. Poduzmite odgovarajuće mjere opreza kako biste spriječili križnu kontaminaciju.
f) Nakon prikupljanja u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT), krv se inkubira manje od 2 h	 Inkubirajte krv u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT) najmanje 2 h nakon prikupljanja.




* Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku katu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (STL) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

Komentari i prijedlozi	
Niska vrijednost A_{260}/A_{280}	
g) Voda upotrijebljena za razrjeđivanje RNK za mjerenje vrijednosti A_{260}/A_{280}	 <p>Upotrijebite 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 za razrjeđivanje RNK prije mjerenja čistoće* (pogledajte Dodatak B, stranica 77).</p>
h) Nulta vrijednost spektrofotometra nije propisno postavljena	 <p>Postavite nultu vrijednost spektrofotometra s pomoću prazne otopine koja se sastoji od jednakog omjera pufera za eluciju (BR5) i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, kao u uzorcima koji će se mjeriti. Pufer za eluciju (BR5) ima visoku apsorbanciju pri 220 nm, što može dovesti do visokih pozadinskih razina apsorbancije ako spektrofotometar nije propisno postavljen na nultu vrijednost.</p>
Kvar instrumenta	
i) QIAcube Connect MDx ne radi ispravno	Pročitajte <i>Korisnički priručnik za QIAcube Connect MDx</i> i obratite posebnu pažnju na odjeljak Rješavanje problema. Pobrinite se da je instrument propisno održavan, kako je opisano u korisničkom priručniku.

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

Simboli

U uputama za uporabu ili na ambalaži i naljepnicama mogu se pojaviti sljedeći simboli. Dodatni simboli objašnjeni su u odjeljku Sadržaj kompleta (stranica 6).

Simbol	Definicija simbola
V<N1>	Verzija <N1> proizvoda
 <N2>	Sadržava dovoljno reagensa za <N2> testova
	Pročitajte upute za uporabu
	Upotrijebiti do
IVD	In vitro dijagnostički medicinski proizvod
REF	Kataloški broj
LOT	Broj serije
MAT	Broj materijala
COMP	Komponente
NUM	Broj
KU	Kunitz jedinice
ADD	Dodavanje
CONT	Sadržava
RCNS	Rekonstituirano

DNase

Deoksiribonukleaza I

EtOH

Etanol

GITC

Gvanidin izotiocijanat

RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

GTIN

Globalni broj trgovačke jedinice



Ograničenja temperature



Gornja granica temperature



Proizvođač

EC REP

Ovlašteni zastupnik za Europu u skladu s Uredbom (EU) 2017/746



Važna napomena



Dodatak etanola



Oznaka CE. Ovaj proizvod ispunjava zahtjeve Uredbe (EU) 2017/746 o in vitro dijagnostičkim medicinskim proizvodima.

UDI

Jedinstveni identifikator uređaja



Opres



UPOZORENJE: vruća površina

Kontaktни podaci

Mi u društvu QIAGEN ponosni smo na kvalitetu i dostupnost svoje tehničke podrške. U našim odjelima tehničke službe rade iskusni znanstvenici s bogatim praktičnim i teorijskim znanjem iz područja molekularne biologije i uporabe proizvoda društva PreAnalytiX. Ako imate kakva pitanja u vezi kompleta PAXgene Blood RNA Kit, slobodno nas kontaktirajte.

Za tehničku pomoć i više informacija posjetite naš Centar za tehničku pomoć na **www.qiagen.com/Support**, nazovite broj 00800-22-44-6000 ili se obratite jednom od tehničkih odjela tvrtke QIAGEN ili lokalnim distributerima (pogledajte poledinu ili posjetite stranicu **www.qiagen.com**).

Dodatak A: Opće napomene o postupanju s RNK

Postupanje s RNK



Ribonukleaze (RNaze) su vrlo stabilni i aktivni enzimi koji uglavnom ne trebaju kofaktore za funkcioniranje. Budući da se RNaze teško inaktiviraju i da su i iznimno malene količine dovoljne za degradaciju RNK, ne upotrebljavajte plastični ili stakleni pribor, a da pritom niste eliminirali moguću kontaminaciju RNazama. Posebnu pažnju treba obratiti na izbjegavanje nenamjernog uvođenja RNaza u uzorak RNK tijekom ili nakon postupka izolacije. Za stvaranje i održavanje okoline bez RNaza moraju se poduzeti mjere opreza tijekom predobrade i uporabe jednokratnih i višekratnih posuda i otopina tijekom rada s RNK.

Općenito rukovanje



Prilikom rada s RNK potrebno je uvijek upotrebljavati propisnu mikrobiološku i aseptičku tehniku. Ruke i čestice prašine prenose bakterije i plijesni te su najčešći izvori kontaminacije RNazom. Uvijek nosite rukavice od lateksa ili vinila prilikom rukovanja reagensima i uzorcima RNA kako biste spriječili kontaminaciju RNazom s površine kože ili s prašnjave laboratorijske opreme. Često mijenjajte rukavice i održavajte epruvete zatvorenima kad god je to moguće. Držite pročišćenu RNK na ledu za vrijeme pipetiranja alikvota za postupke daljnje obrade.

Protokoli za uklanjanje kontaminacije RNazom iz staklenog pribora i otopina mogu se pronaći u općim vodičima za molekularnu biologiju, kao što je Sambrook, J. i Russell, D. W. (2001.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Dodatak B: Kvantifikacija i određivanje kvalitete ukupne RNK

Kvantifikacija RNK

Koncentracija RNK treba se odrediti mjerenjem apsorbancije pri 260 nm (A_{260}) u spektrofotometru. Kako bi se osigurala valjanost rezultata, očitavanja trebaju biti unutar linearnog raspona spektrofotometra. Apsorbancija 1 jedinice pri 260 nm odgovara 44 μg RNK po ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$). Ovaj je odnos valjan samo za mjerenja u 10 mM Tris-HCl, pH 7,5*. Stoga je potrebno razrijediti uzorak RNK, a to se mora obaviti u 10 mM Tris-HCl. Kako je obrađeno u nastavku (pogledajte „Čistoća RNK“, stranica 78), omjer između vrijednosti apsorbancije pri 260 i 280 nm daje procjenu čistoće RNK. Prilikom mjerenja uzoraka RNK osigurajte da su kivete bez RNaze. Postavite nultu vrijednost spektrofotometra s pomoću prazne otopine koja se sastoji od jednakog omjera pufera za eluciju (BR5) i pufera Tris-HCl kao u uzorcima koji će se mjeriti. Pufer za eluciju (BR5) ima visoku apsorbanciju pri 220 nm, što može dovesti do visokih pozadinskih razina apsorbancije ako spektrofotometar nije propisno postavljen na nultu vrijednost. U nastavku je prikazan primjer izračuna uključenog u kvantifikaciju RNK.

Volumen uzorka RNK	=	80 μl
Razrjeđivanje (1/15)	=	10 μl uzorka RNK + 140 μl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Mjerite apsorbanciju razrijeđenog uzorka u kiveti (bez RNaze).		
A_{260}	=	0,3
Koncentracija uzorka	=	$44 \times A_{260} \times \text{faktor razrjeđivanja}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 $\mu\text{g/ml}$
Ukupni prinos	=	koncentracija x volumen uzorka u mililitrima
	=	198 $\mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ mL}$
	=	15,8 μg RNK

* Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (STL) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

Čistoća RNK

Na temelju omjera očitavanja pri 260 i 280 nm (A_{260}/A_{280}) procjenjuje se čistoća RNK u pogledu kontaminanata koji se apsorbiraju u UV spektru, kao što su proteini. Međutim, na omjer vrijednosti A_{260}/A_{280} znatno utječe pH. Niži pH dovodi do nižeg omjera A_{260}/A_{280} i smanjene osjetljivosti na kontaminaciju proteinima.* Za dobivanje točnih vrijednosti preporučujemo mjerenje apsorbancije u 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Čista RNK ima omjer vrijednosti A_{260}/A_{280} od 1,8 – 2,2 u 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Postavite nultu vrijednost spektrofotometra s pomoću prazne otopine koja se sastoji od jednakog omjera pufera za eluciju (BR5) i pufera Tris-HCl kao u uzorcima koji će se mjeriti. Pufer za eluciju (BR5) ima visoku apsorbanciju pri 220 nm, što može dovesti do visokih pozadinskih razina apsorbancije ako spektrofotometar nije propisno postavljen na nultu vrijednost.

* 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.

Dodatak C: Rukovanje epruветama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Sljedeće preporuke društva BD mogu biti korisne prilikom rukovanja epruветama PAXgene Blood RNA Tubes. Više informacija o epruветama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) potražite u *Priručniku za PAXgene Blood RNA Tube*.

Upute za uklanjanje poklopca BD Hemogard

1. Uхватite epruветu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) jednom rukom, postavljajući palac ispod poklopca BD Hemogard. (Za dodatnu stabilnost postavite ruku na čvrstu površinu.) Drugom rukom okrenite poklopac BD Hemogard dok ga istovremeno gurate palcem prve ruke prema gore samo dok se čep epruвете ne olabavi.
2. Odmaknite palac prije podizanja poklopca. Ne upotrebljavajte palac kako biste odgurnuli poklopac s epruвете PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Oprez: ako epruвета PAXgene Blood RNA Tube (BRT) sadržava krv, postoji rizik od izlaganja. Kako bi se pomogla spriječiti ozljeda prilikom uklanjanja poklopca, važno je da se palac kojim se poklopac gura prema gore odmakne od epruвете PAXgene Blood RNA Tube (BRT) čim se poklopac BD Hemogard olabavi.
3. Podignite poklopac s epruвете PAXgene Blood RNA Tube (BRT). U malo vjerojatnom slučaju da se plastična zaštita odvoji od gumenog čepa, ne sastavljajte ponovno poklopac. Pažljivo uklonite gumeni čep s epruвете PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Upute za umetanje sekundarnog poklopca BD Hemogard

1. Ponovno postavite poklopac na epruvetu PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Okrenite i pogurajte čvrsto prema dolje dok čep potpuno ne sjedne na mjesto. Potpuno ponovno umetanje čepa nužno je kako bi poklopac ostao sigurno postavljen na epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tijekom rukovanja epruvetom.

Informacije za naručivanje

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns epruvete za obradu, DNaza I bez RNaze, reagensi i puferi bez RNaze. Za uporabu uz epruvete PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 epruveta za prikupljanje krvi	762165
Povezani proizvodi koji se mogu naručiti od tvrtke QIAGEN za automatiziranu izolaciju RNK na instrumentima QIAcube		
Starter Pack, QIAcube	Paket uključuje: nosače za bočice za reagense (3); trake za označavanje nosača (8); vrhove s filtrom od 200 µl (1024); vrhove s filtrom od 1000 µl (1024); vrhove s filtrom od 1000 µl, široke (1024); bočice za reagense od 30 ml (18); adaptere rotora (240); nosač adaptera rotora	990395
Filter-Tips, 1000 µL (1024)	Sterilni, jednokratni vrhovi s filtrom, u nosaču	990352
Reagent Bottles, 30 mL (6)	Bočice za reagense (30 ml) s poklopcima; paket od 6; za uporabu s nosačem za bočice za reagense QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 × 24)	Za 240 pripremanja: 240 jednokratnih adaptera rotora; za uporabu s instrumentima QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Nosač za bočice za reagense 6 × 30 ml na radnoj površini instrumenta QIAcube	9026197
Rotor Adapter Holder	Držač za 12 jednokratnih adaptera rotora; za uporabu s instrumentima QIAcube	990392

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
Povezani proizvodi koji se mogu naručiti od tvrtke BD za prikupljanje krvi u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)*		
BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set	igla od 21 G, 0,75 inča (0,8 x 19 mm), epruveta od 12 inča (305 mm) s luer adapterom; 50 po pakiranju, 200 po kutiji	367286/367281
BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set	Igla od 21G, 0,8 x 19 mm, epruveta od 12 inča (305 mm) s luer adapterom. 50/pakiranje, 200/kutija	367344
BD Vacutainer One-Use Holder	Kutija samo za epruvete promjera 13 mm i 16 mm; 1000/kutija	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	Epruvete od 4,0 ml i 13 x 75 mm s crvenim BD Hemogard poklopcem i papirnatom oznakom; 100/pakiranje, 1000/kutija	368975/367812
BD Vacutainer EST Tube	Epruvete od 3,0 ml i 13 x 75 mm s prozirnim BD Hemogard poklopcem i prozirnom oznakom; 100/pakiranje, 1000/kutija	362725
BD Vacutainer No Additive (Z) Tube	Epruvete od 3,0 ml i 13 x 75 mm s prozirnim BD Hemogard poklopcem i papirnatom oznakom; 100/pakiranje, 1000/kutija	366703

* Ova dodatna oprema za prikupljanje krvi predstavlja tipične proizvode koji se mogu upotrebljavati s epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Kako biste saznali više o ovoj dodatnoj opremi, uključujući kako je naručiti, posjetite www.preanalytix.com.

Povijest revizija dokumenta

Datum	Izmjene
[R1] travanj 2022.	Početno izdanje u skladu s uredbom IVDR
[R2] veljača 2023.	Ulica u adresi društva PreAnalytiX GmbH promijenjena iz „Feldbachstrasse“ u „Garstligweg 8“. U odjeljak Informacije za naručivanje dodani su proizvodi tvrtke BD. Ažuriran je odjeljak Sigurnosne informacije.

Napomene



Ažurirane informacije o licenciranju i izjave specifične za proizvod pogledajte u odgovarajućem priručniku za komplet tvrtke PreAnalytiX ili QIAGEN ili priručniku za korisnika. Priručnici i korisnički priručnici za komplete PreAnalytiX i QIAGEN dostupni su na www.preanalytix.com i www.qiagen.com ili ih možete zatražiti od tehničke službe društva QIAGEN ili svojeg lokalnog distributera.

**Better samples
More to explore**



Dodatno istražite na: www.preanalytix.com

HB-3009-002 02/2023