

Február 2023

# Súprava PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA Kit (príručka) Návod na použitie



Verzia 3 (V3)

IVD

Na diagnostické použitie in vitro



REF

762174



PreAnalytiX<sup>®</sup> GmbH  
Garstligweg 8, 8634 Hombrechtikon, Švajčiarsko

Vyrobila spoločnosť QIAGEN<sup>®</sup> GmbH pre PreAnalytiX GmbH

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NEMECKO

R2

MAT

1130774SK

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

PreAnalytiX GmbH, 8634 Hombrechtikon, CH.

© 2023 PreAnalytiX GmbH. Ak nie je uvedené inak, PreAnalytiX, logo PreAnalytiX a všetky ostatné ochranné známky sú majetkom spoločnosti PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, Švajčiarsko.

### Obmedzená licenčná zmluva vzťahujúca sa na súpravu PAXgene Blood RNA Kit

Použitie tohto produktu predstavuje súhlas kupujúceho alebo používateľa tohto produktu s nasledovnými podmienkami:

1. Produkt sa môže používať výlučne v súlade s protokolmi poskytovanými spolu s produktom a touto príručkou, a môže sa používať výlučne s komponentmi obsiahnutými v tomto paneli. Spoločnosť PreAnalytiX® neudeľuje žiadnu licenciu v rámci žiadneho zo svojich práv na ochranu duševného vlastníctva na používanie alebo spájanie komponentov tohto panelu so žiadnymi komponentmi, ktoré netvoria súčasť tohto panelu s výnimkou ustanovení uvádzaných v protokoloch dodávaných spolu s produktom, tejto príručke a v ďalších protokoloch, ktoré sú dostupné na adrese [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) a [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).
2. Iné než výslovne uvedené licencie – spoločnosť PreAnalytiX neposkytuje žiadnu záruku na to, že táto súprava a/alebo jej použitie neporuší práva tretích strán.
3. Táto súprava je licencovaná na jednorazové použitie a nesmie sa opätovne používať, renovovať ani predávať.
4. Spoločnosť PreAnalytiX sa špecificky zrieka všetkých ostatných výslovných alebo implicitných licencií okrem tých, ktoré sú tu výslovne uvedené.
5. Kupujúci a používateľ tejto súpravy súhlasia s tým, že iným osobám neumožnia ani nepovolia vykonať žiadne kroky, ktoré by mohli viesť k akýmkoľvek činnostiam, ktoré sú zakázané vyššie, alebo k nim napomáhať.
6. Spoločnosť PreAnalytiX môže uplatňovať príslušné zákazy uvádzané v tejto obmedzenej licenčnej zmluve pred akýmkoľvek súdom a bude požadovať všetky náklady na vyšetrovanie a súdne konania (vrátane nákladov na právne zastupovanie) pri každom takomto kroku s cieľom uplatniť ustanovenia tejto obmedzenej licenčnej zmluvy alebo práv duševného vlastníctva súvisiacich so súpravou a/alebo jej komponentmi.

Aktualizované licenčné podmienky nájdete na adrese [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) a [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

HB-3009-002 BD-8945 1130774SK © 2023 PreAnalytiX GmbH, všetky práva vyhradené.

## Distribútori PreAnalytiX

Produkty PreAnalytiX vyrába a distribuuje spoločnosť QIAGEN a BD pre PreAnalytiX.

# Obsah

Obsah.....	3
Zamýšľané použitie .....	6
Zamýšľaný používateľ.....	6
Popis a princíp.....	7
Úvod .....	7
Princíp a postup .....	7
Odber a stabilizácia vzoriek .....	8
Izolovanie RNA .....	8
Manuálne izolovanie RNA.....	9
Automatické izolovanie RNA .....	11
Dodávané materiály.....	14
Obsah súpravy.....	14
Súčasti súpravy.....	15
Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú.....	16
Pre všetky protokoly.....	16
Manuálny protokol .....	16
Automatizovaný protokol .....	17
Varovania a preventívne opatrenia.....	18
Bezpečnostné informácie .....	18
Núdzové informácie .....	18
Preventívne opatrenia.....	19
Skladovanie a manipulácia s reagensiami .....	22

Stabilita pri používaní .....	22
Odber, skladovanie vzoriek a manipulácia s nimi .....	23
Protokol: Manuálna izolácia celkovej RNA z celej ľudskej krvi odobratej do skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes .....	24
Protokol: Automatizovaná izolácia celkovej RNA z ľudskej plnej krvi odobratej do skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	31
Obmedzenia používania produktu .....	38
Kontrola kvality .....	38
Charakteristiky účinnosti .....	39
Odber a stabilizácia vzoriek .....	39
Manuálne izolovanie RNA.....	44
Automatické izolovanie RNA .....	52
Stabilita izolovanej RNA .....	55
Dôležité poznámky .....	56
Použitie QIAcube Connect MDx .....	56
Spustenie QIAcube Connect MDx.....	56
Inštalácia protokolov na QIAcube Connect MDx.....	58
Načítanie QIAcube Connect MDx.....	59
Spinové kolóny (PSC, PRC), MCT a plastový riad QIAcube Connect MDx.....	62
Likvidácia.....	68
Referenčná literatúra .....	69
Sprievodca riešením problémov.....	70
Symboly .....	72
Kontaktné informácie.....	74

Príloha A: Všeobecné poznámky k manipulácii s RNA .....	75
Príloha B: Kvantifikácia a určenie kvality celkovej RNA .....	76
Príloha C: Manipulácia so skúmavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	78
Informácie o objednávaní .....	80
História revízie dokumentu .....	82

# Zamýšľané použitie

Na diagnostické použitie in-vitro.

Systém PAXgene Blood RNA System sa skladá zo skúmavky na odber krvi (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) a súpravy na purifikáciu nukleovej kyseliny (PAXgene Blood RNA Kit). Je určený na odber, skladovanie a prepravu krvi a stabilizáciu vnútrobunkovej RNA v uzatvorenej skúmavke a následne izoláciu a purifikáciu hostiteľskej RNA z plnej krvi na test RT-PCR používaný pri molekulárnom diagnostickom testovaní.

C systému PAXgene Blood RNA System boli stanovené len s génovými transkripciami FOS a IL1B. Používateľ je zodpovedný za určenie vhodných charakteristík účinnosti systému PAXgene Blood RNA System pre ostatné cieľové transkripcie.

## Indikácie na použitie

Súprava PAXgene Blood RNA Kit je určená na purifikáciu vnútrobunkovej RNA z plnej krvi odobratej do skúmavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Ak sa súprava používa spolu so skúmavkou PAXgene Blood RNA Tube (BRT), poskytuje systém purifikovanú vnútrobunkovú RNA z plnej krvi na RT-PCR používané v molekulárnom diagnostickom testovaní.

## Zamýšľaný používateľ

Tento produkt je určený na použitie profesionálnymi používateľmi, ako napr. technici a lekári vyškolení v postupoch in vitro diagnostiky.

Táto súprava je určená na profesionálne použitie.

# Popis a princíp

## Úvod

Odber plnej krvi je prvý krok mnohých molekulárnych testov v rámci študovania bunkovej RNA. Hlavným problémom v týchto experimentoch je ale nestabilita bunkového RNA profilu in vitro. Štúdie v spoločnosti PreAnalytiX ukázali, že počet kópií jednotlivých druhov mRNA v celej vzorke krvi sa môže počas skladovania alebo prepravy pri izbovej teplote zmeniť viac ako 1000-krát (Rainen a kol., 2002). To je spôsobené rýchlou degradáciou RNA ale aj vyvolanou expresiou určitých génov po odobratí krvi. Takéto zmeny v profile expresie RNA znemožňujú spoľahlivé štúdie génovej expresie. Spôsob, ktorým sa zachová profil expresie RNA počas a po flebotómii je preto nevyhnutný pre presnú analýzu génovej expresie v ľudskej plnej krvi.

## Princíp a postup

Spoločnosť PreAnalytiX vyvinula systém, ktorý umožňuje odber, stabilizovanie, skladovanie a prepravu vzoriek ľudskej krvi spolu s rýchlým a efektívnym protokolom na izoláciu vnútrobunkovej RNA. Systém vyžaduje použitie skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) na odber krvi a stabilizáciu RNA, po ktorej nasleduje manuálna alebo automatická izolácia RNA pomocou súpravy PAXgene Blood RNA Kit. Manuálne aj automatizované protokoly poskytujú značne ekvivalentnú účinnosť s ohľadom na získanie a kvalitu RNA. Údaje o účinnosti pre manuálny protokol (od strany 44) a automatizovaný protokol (od strany 52) sú uvedené v tejto príručke.

Systém PAXgene Blood RNA System umožňuje štandardizáciu predanalytických pracovných krokov od odberu vzorky krvi až po izoláciu bunkovej RNA podľa normy ISO 20186-1:2019, Molekulárne diagnostické vyšetrenia in vitro – Špecifikácie pre procesy pred vyšetrením celej venóznej krvi – Časť 1: Izolovaná bunková RNA.

## Odber a stabilizácia vzoriek

Skúmavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) obsahujú patentovanú reagensiu na stabilizáciu RNA. Táto prísada chráni molekuly RNA pred degradáciou RNázami a minimalizuje zmeny expresie génov ex vivo. Výkonnostné charakteristiky systému PAXgene Blood RNA System boli stanovené s transkriptami génov FOS a IL1B, ktoré si môžete pozrieť od strany 39.

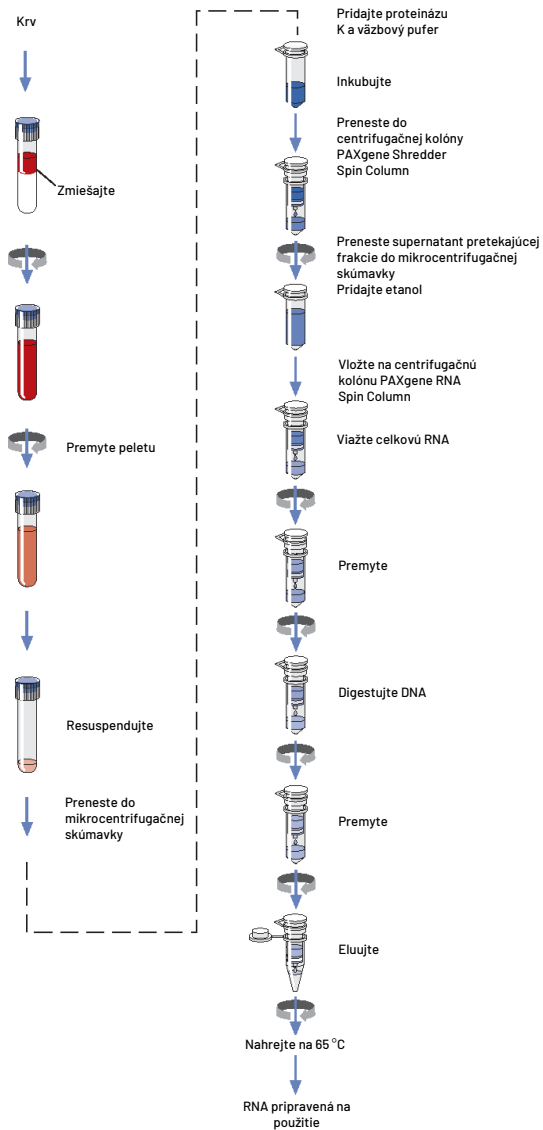
## Izolovanie RNA

Súprava PAXgene Blood RNA Kit je určená na izoláciu celkovej RNA z 2,5 ml objemu ľudskej krvi, ktorá je zozbieraná do skúmavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Postup je jednoduchý a možno ho vykonať manuálnym alebo automatizovaným postupom (pozri obrázok 1 alebo obrázok 3, strana 10 alebo 12). V oboch protokoloch začína izolácia centrifugáciou, pri ktorej sa nukleové kyseliny peletujú v skúmavke PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Pelet sa premyje a resuspenduje, po čom nasleduje manuálna alebo automatická izolácia RNA. V princípe prebiehajú obidva protokoly v rovnakých krokoch s rovnakými komponentmi súpravy.



## Manuálne izolovanie RNA

Resuspendovaná peleta sa dôkladne inkubuje v optimalizovaných pufoch spolu s proteínázou K (PK), aby sa dosiahlo strávenie proteínu. Vykonáva sa ďalšia centrifugácia pomocou odstredivky PAXgene Shredder (PSC) s cieľom homogenizovať bunkový lyzát a odstrániť zvyšky buniek, a supernatant pretekajúcej frakcie sa preniesie do čistej mikrocentrifugačnej skúmavky (MCT). Na upravenie väzobných podmienok sa pridá etanol a lyzát sa vloží do centrifugačnej kolóny PAXgene RNA (PRC). Počas krátkej centrifugácie sa RNA selektívne naviaže na membránu oxidu kremičitého PAXgene počas prechodu kontaminantov. Zvyšné kontaminanty sa odstránia počas niekoľkých efektívnych premývaní. Medzi prvým a druhým premývaním sa membrána ošetrí DNázou I (RNFD), aby sa odstránili stopové množstvá naviazanej DNA. Po premývaní sa RNA eluuje v elučnom pufri (BR5) a denaturuje teplom. Výkonnostné charakteristiky manuálnej izolácie RNA pomocou systému PAXgene Blood RNA System si môžete pozrieť na strane 44.



Obrázok 1: Manuálny postup s PAXgene Blood RNA.

## Automatické izolovanie RNA

Izolácia krvnej RNA je automatizovaná na zariadení QIAGEN QIAcube Connect MDx. Inovatívny prístroj využíva pokročilú technológiu na spracovanie spinových stĺpcov QIAGEN, čo umožňuje bezproblémovú integráciu automatizovanej prípravy vzoriek s nízkou priepustnosťou v rámci laboratórneho pracovného postupu. Príprava vzorky pomocou QIAcube Connect MDx prebieha v rovnakých krokoch ako manuálny postup (t. j. lýza, naviazanie, premytie a elúcia) a môže sa vykonať pomocou rovnakej súpravy PAXgene Blood RNA Kit.

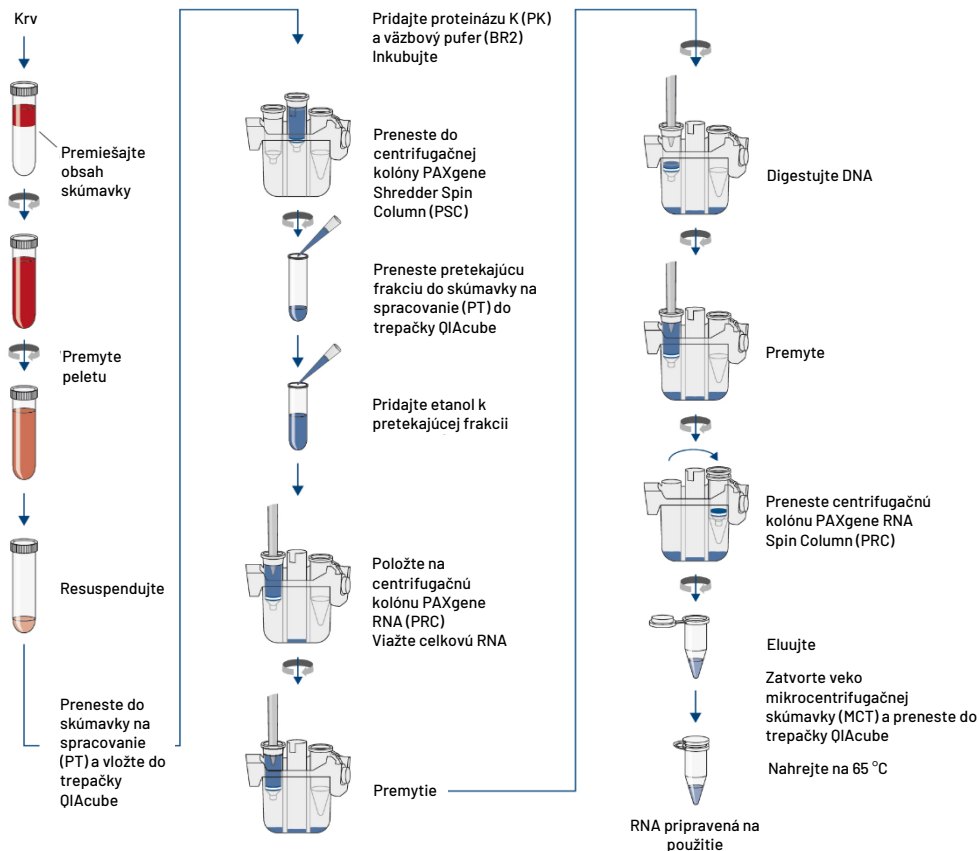


Obrázok 2: QIAcube Connect MDx.



Prístroj QIAGEN QIAcube Connect MDx nie je dostupný vo všetkých krajinách. Ďalšie podrobnosti vám poskytne technický servis spoločnosti QIAGEN.

Automatizovaný protokol izolácie RNA pozostáva z 2 častí (alebo protokolov): „PAXgene Blood RNA časť A“ (z krvi v skúmavke PAXgene Blood RNA Tube na elúciu) a „PAXgene Blood RNA časť B“ (po elúcii na RNA, pripravenú na použitie), pričom medzi týmito dvoma časťami je potrebný krátky manuálny zásah (pozri obrázok 3).




Obrázok 3: Automatizovaný postup s PAXgene Blood RNA.

Centrifugovaná, premytá a resuspendovaná peleta nukleovej kyseliny (pozri „Izolovanie RNA“, strana 8) sa preniesie zo skúmavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) do skúmaviek na spracovanie (PT), ktoré sa umiestnia do jednotky termo šľahača na pracovnom stole QIAcube Connect MDx. Operátor vyberie a spustí z menu časť protokolu „PAXgene Blood RNA Part A“. Termo šľahač QIAcube Connect MDx vykonáva kroky protokolu až po elúciu RNA v elučnom pufri (BR5). Operátor preniesie MCT obsahujúce purifikovanú RNA do jednotky termo šľahača QIAcube Connect MDx. Operátor vyberie a spustí protokol „PAXgene Blood RNA časť B“ z ponuky a tepelná denaturácia sa vykoná pomocou QIAcube Connect MDx. Výkonnostné charakteristiky automatizovanej izolácie RNA pomocou systému PAXgene Blood RNA System na QIAcube Connect MDx si môžete pozrieť na strane 52.

# Dodávané materiály

## Obsah súpravy

Súprava PAXgene Blood RNA Kit Katalógové č. Počet odberových pomôcok			(50) 762174 50
Názov súčasti	Popis	Symbol	Množstvo
BR1	Resuspension Buffer (resuspenzný pufer)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer* (väzbový pufer)	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1* (premyváci pufer)	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (premyváci pufer 2) (koncentrát) <sup>†</sup>	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (elučný pufer)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (voda bez RNázy) (fľaša)	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (proteínáza K) (zelený uzáver)	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (červené) <sup>‡</sup>	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (Skúmavky na spracovanie) (2 ml) <sup>§</sup>	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard™	Secondary BD Hemogard Closures (sekundárne uzávery BD Hemogard)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (Mikrocentrifugačné skúmavky) (1,5 ml) <sup>§</sup>	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (DNáza I, bez RNázy) (lyofylizovaná)	DNA REM	1500 jednotiek Kunitz <sup>¶</sup>
RDD	DNA Digestion Buffer (digestívny pufer) (biely uzáver)	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (resuspenzný pufer DNázy) (skúmavka, svetlofialový uzáver)	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (svetlofialové) <sup>‡</sup>	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Príručka	Príručka súpravy PAXgene Blood RNA Kit (verzia 3)		1

\* Nekompatibilný s dezinfekčnými reagensmi obsahujúcimi bielidlo. Obsahuje guanidínovú soľ. Pozri stranu 18 pre Bezpečnostné informácie.

<sup>†</sup> Premývací pufer 2 (BR4) sa dodáva ako koncentrát. Pred prvým použitím pridajte 4 objemy etanolu (96 – 100 % v/v, stupeň čistoty p.a.), ako je uvedené na fľaši, aby ste získali pracovný roztok.

<sup>‡</sup> Každá kolóna je zabalená v blistri, ktorý je určený len na jedno použitie. Pokyny na likvidáciu nájdete v bezpečnostných informáciách.

<sup>§</sup> Skúmavky sú k dispozícii v plastových vreckách a každá skúmavka je určená len na jedno použitie. Pokyny na likvidáciu nájdete v bezpečnostných informáciách.

<sup>¶</sup> Kunitzove jednotky sú bežne používané jednotky na meranie DNázy I, definované ako množstvo DNázy I, ktoré spôsobí zvýšenie  $A_{260}$  o 0,001 za minútu na mililiter pri 25 °C, pH 5,0, s vysoko polymerizovanou DNA ako substrátom (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* 33, 349 a 363).

## Súčasti súpravy

Názov súčasti	Popis	Aktívna zložka	Koncentrácia
BR1	Resuspension Buffer (resuspenzný pufer)	Žiadny	-
BR2	Binding Buffer (väzbový pufer)	Tiokyanatan guanidínu	≥ 30 do < 50 % w/w
BR3	Wash Buffer 1 (premyvací pufer 1)	Tiokyanatan guanidínu Etanol	≥ 10 do < 20 % w/w ≥ 3 do < 10 % w/w
BR4	Wash Buffer 2 (premyvací pufer 2) (koncentrát)	Žiadny	-
BR5	Elution Buffer (elučný pufer)	Žiadny	-
RNFW	RNase-Free Water (voda bez RNázy) (fľaša)	Žiadny	-
PK	Proteinase K (proteínáza K) (zelený uzáver)	Proteínáza K	≥ 1 do < 3 % w/w
RNFD	DNase I, RNase-free (DNáza I, bez RNázy) (lyofylizovaná)	DNáza	≥ 90 do ≤ 100 % w/w
RDD	DNA Digestion Buffer (digestívny pufer) (biely uzáver)	Žiadny	-
DRB	DNase Resuspension Buffer (resuspenzný pufer DNázy) (skúmavka, svetlofialový uzáver)	Žiadny	-

# Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

## Pre všetky protokoly

- Skúmavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; kat. č. 762165)
- Etanol (96 – 100 % v/v, stupeň čistoty p.a.)
- Pipety\* (10 µl – 4 ml)
- Sterilné, špičky na pipety bez RNázy s bariérou proti aerosólu<sup>†</sup>
- Odmerný valec<sup>‡</sup>
- Centrifúga\* schopná dosiahnuť 3 000 – 5 000 × g a vybavená rotorom s výkyvným vedrom na umiestnenie skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Vírivý mixér\*
- Ľadová triešť
- Permanentný popisovač na označenie

## Manuálny protokol

- Mikrocentrifúga s premenlivými otáčkami\* schopná dosiahnuť rozsah aspoň 1 000 – 8 000 × g, hoci sú použiteľné aj nižšie a vyššie hodnoty g (podrobnosti nájdete v krokoch protokolu), vybavená rotorom pre 2 ml MCT

\* Uistite sa, že pomôcky a prístroje boli skontrolované, bola na nich vykonaná údržba a pravidelne sa kalibrujú podľa odporúčani výrobcu.

<sup>†</sup> Určite sa oboznámte s odporúčaniami k manipulácii s RNA (príloha A, strana 75).

<sup>‡</sup> Na pridanie etanolu do koncentráту pufru Buffer BR4.



- Trepačí inkubátor\* schopný inkubácie pri teplote 55 °C a 65 °C a rýchlosť trepania ≥ 400 ot/min pričom sa nepresiahne rýchlosť 1 400 ot/min (napr. Eppendorf® Thermomixer Compact alebo podobný)

## Automatizovaný protokol

- Nožnice
- QIAcube Connect MDx\* (QIAGEN, kat. č. 9003070)

### QIAcube Connect MDx spotrebný materiál:

- Filter-Tips, 1 000 µl (1024) (QIAGEN, kat. č. 990352)†
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, kat. č. 990393)†
- Rotor Adapters (10 × 24) (QIAGEN, kat. č. 990394)†

### QIAcube Connect MDx príslušenstvo:

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

### Servisné balíky prístroja QIAcube Connect MDx:

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

\* Uistite sa, že zariadenie a prístroj boli pravidelne kontrolované, udržiavané a kalibrované podľa odporúčani výrobcu.

† Sú tiež súčasťou balíka Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, kat. č. 990395).

# Varovania a preventívne opatrenia

Zákazníci v Európskej únii si musia uvedomiť, že sú povinní nahlásiť akýkoľvek závažný incident, ku ktorému došlo v súvislosti s pomôckou, a to výrobcovi a príslušnému orgánu členského štátu, v ktorom má používateľ a/alebo pacient sídlo.

Zákazníkov mimo Európskej únie upozorňujeme, že sa od nich môže vyžadovať, aby sa oboznámili s miestnymi predpismi o hlásení závažných incidentov, ktoré sa vyskytli v súvislosti s pomôckou, a to výrobcovi a/alebo jeho splnomocnenému zástupcovi a regulačnému orgánu, v ktorom má používateľ a/alebo pacient sídlo.

## Bezpečnostné informácie

Pri práci s chemikáliami a biologicky nebezpečnými materiálmi vždy noste vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Ďalšie informácie nájdete v príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ). Tieto materiály sú k dispozícii online v praktickom a kompaktnom formáte PDF na adrese **[www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)**. Na tejto adrese môžete vyhľadať, zobrazíť a vytlačiť kartu bezpečnostných údajov (KBÚ) pre každú súpravu QIAGEN a jej súčasti.

- Všetky chemikálie a biologické materiály sú potenciálne nebezpečné. Vzorky krvi a vzorky sú potenciálne infekčné a musí sa s nimi zaobchádzať ako s biologicky nebezpečným materiálom.
- Biologický odpad a odpad zo súpravy zlikvidujte podľa miestnych bezpečnostných postupov.

## Núdzové informácie

CHEMTREC

Mimo USA a Kanady +1 703-527-3887

## Preventívne opatrenia

Pri práci s krvou, dodržiavajte univerzálne bezpečnostné opatrenia, aby ste sa vyhli riziku nožnej expozície patogénom prenášaným krvou (napr. HIV, hepatitíde B a iným vírusom prenášaným krvou). Na ochranu pred expozíciou krvi používajte rukavice, plášte, ochranné okuliare, iné osobné ochranné prostriedky a technické prostriedky. Ďalšie informácie nájdete v príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ). Tieto materiály sú k dispozícii on-line v praktickom a kompaktnom formáte PDF na adrese **[www.prealalytix.com](http://www.prealalytix.com)**, kde môžete vyhľadať, zobraziť a vytlačiť kartu bezpečnostných údajov (KBÚ) pre každú súpravu a jej súčasti.

### UPOZORNENIE



NEPRIDÁVAJTE bieliace alebo kyslé roztoky priamo do odpadu z prípravy vzoriek.

Väzbový pufer (BR2) a premývací pufer 1 (BR3) obsahujú guanidín tiokyanát, ktorý môže v kombinácii s bielidlom vytvárať vysoko reaktívne zlúčeniny. Ak sa väzbový pufer (BR2) alebo premývací pufer 1 (BR3) rozlejú, vyčistíte ich pomocou vhodného laboratórneho čistiaceho prostriedku a vody. Ak dôjde k rozliatiu kvapaliny obsahujúcej infekčné činidlá, vyčistíte postihnuté miesto najskôr laboratórnym čistiacim prostriedkom a vodou a potom 1 % (v/v) chlórnanom sodným (bielidlo).

Zmes stabilizačného roztoku RNA a krvi zo skúmavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) sa môže dezinfikovať pomocou 1 objemu bežne dostupného roztoku bielidla (5 % chlórnan sodný) na 9 objemov zmesi stabilizačného roztoku RNA a krvi.

Odpad z prípravy vzoriek, napríklad supernatanty z centrifugačných krokov pri izolácii RNA, sa považuje za potenciálne infekčný. Na likvidáciu biologických materiálov používajte kontajnery na biologický odpad. Likvidácia sa musí vykonať v súlade s miestnymi predpismi a postupmi vášho zariadenia.

Špecifické komponenty súpravy PAXgene Blood RNA Kit sú určené len na jednorazové použitie. Informácie o jednotlivých komponentoch nájdete v časti Obsah súpravy na strane 14.

Na súčasti súpravy PAXgene Blood RNA Kit sa vzťahujú nasledujúce bezpečnostné vyhlásenia a preventívne opatrenia. Pozri príručku pre skúmavku PAXgene Blood RNA Tube s bezpečnostnými informáciami o skúmavkách PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

#### Pufer BR2



Obsahuje: guanidín tiokyanát. Nebezpečenstvo! Škodlivý po požití. Môže byť škodlivý pri kontakte s pokožkou alebo pri vdýchnutí. Spôsobuje závažné poškodenie očí. Škodlivý pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami. Pri kontakte s kyselinami uvoľňuje vysoko toxický plyn. Zabráňte uvoľneniu do životného prostredia. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre. PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Opatrne niekoľko minút oplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní. Po expozícii alebo podozrení z nej: Okamžite volajte NÁRODNÉ TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM alebo lekára. Obsah/obal zlikvidujte v schválenom zariadení na zber a likvidáciu odpadov.

### Pufer BR3



Obsahuje: etanol; guanidín tiokyanát. Nebezpečenstvo! Horľavá kvapalina a výpary. Spôsobuje závažné poškodenie očí. Pri kontakte s kyselinami uvoľňuje vysoko toxický plyn. Uchovávajte mimo dosahu tepla/iskier/otvoreného ohňa/horúcich povrchov. Nefajčte. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre. PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Opatrne niekoľko minút oplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní. Okamžite volajte NÁRODNÉ TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM alebo lekára.

### DNáza I



Obsahuje: DNázu. Nebezpečenstvo! Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu. Pri vdýchnutí môže vyvolať alergiu alebo príznaky astmy alebo dýchacie ťažkosti. Vyhnite sa vdychovaniu prachu. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre. Používajte respiračnú ochranu. Po expozícii alebo podozrení z nej: Volajte NÁRODNÉ TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM alebo lekára. Premiestnite osobu na čerstvý vzduch a nechajte ju pohodlne dýchať. Kontaminovaný odev pred ďalším použitím vyperte.

# Skladovanie a manipulácia s reagensiami

Spinovacie kolóny PAXgene RNA (PRC), spinovacie kolóny PAXgene Shredder (PSC), proteínáza K (PK) a pufré (BR1, BR2, BR3, BR4 a BR5) by sa mali skladovať v suchu pri teplote uvedenej na označení súpravy.

Súprava DNázy bez RNázy, ktorá obsahuje DNázu (RNFD), digestívny pufer (RDD) a resuspenzný pufer DNázy (DRB) sa expedujú pri okolitej teplote. Všetky komponenty súpravy RNase-Free DNase Set uskladnite ihneď po prijatí pri teplote uvedenej na štítku. Pri správnom skladovaní je súprava stabilná až do dátumu expirácie uvedeného na škatuli súpravy.

Pozornosť by sa mala venovať dátumom expirácie a podmienkam skladovania vytlačeným na škatuli a štítkoch všetkých komponentov. Nepoužívajte expirované alebo nesprávne skladované komponenty.

## Stabilita pri používaní

Po prvom použití súpravy sú reagenty stabilné v pôvodných fľašiach, pri teplotách a do dátumu expirácie uvedeného na štítku súpravy.

Reagenty naplnené do reagenčných fľaštičiek QIAcube Connect MDx sú stabilné počas 3 mesiacov skladovania pri izbovej teplote (15 – 25 °C).

Rekonštituovaná DNáza I (RNFD) je stabilná pri teplote 2 – 8 °C počas 6 týždňov v pôvodnej sklenenej fľaštičke (zásobný roztok).

Jednorazové alikvóty základného roztoku v 1,5 ml MCT (dodávané so súpravou) sú stabilné počas 9 mesiacov skladovania pri -20 °C. Po rozmrazení sú jednorazové alikvóty stabilné počas 6 týždňov skladovania pri teplote 2 – 8 °C.

## Odber, skladovanie vzoriek a manipulácia s nimi

Súprava PAXgene Blood RNA Kit je určená na použitie s krvou odobratou do skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes. Krv sa musí odobrať do skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) podľa pokynov v príručke pre skúmavku PAXgene Blood RNA Tube. V prípade potreby pozri prílohu C (strana 78) s odporúčaniami k manipulácii so skúmavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Všetky vzorky by sa mali považovať za potenciálne nebezpečné. Výkonnostné charakteristiky systému PAXgene Blood RNA System boli stanovené s transkriptami génov FOS a IL1B, ktoré si môžete pozrieť na stranách 40–43.

# Protokol: Manuálna izolácia celkovej RNA z celej ľudskej krvi odobratej do skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes

## Dôležité body pred začatím činnosti

- Skontrolujte či je balenie súpravy nedotknuté a nepoškodené a či nedošlo k úniku pufrov. Ak je súprava poškodená, nepoužívajte ju.
- Pri použití pipety zaistite, aby bola nastavená na správny objem a aby sa kvapalina dôkladne a úplne nasala a nadávkovala.
- Aby ste predišli prenosu vzoriek do nesprávnej skúmavky alebo centrifugačnej kolóny, skontrolujte, či sú všetky skúmavky a kolóny správne označené pomocou permanentného označovača. Uzáver a telo každej skúmavky označte (PT, MCT). Pri spinových stĺpcoch označte telo ich PT. Po prenesení kvapaliny zatvorte každú skúmavku alebo centrifugačnú kolónu.
- Úniky vzoriek a pufrov počas procesu môžu znížiť výťažok a čistotu RNA.
- Ak nie je uvedené inak, mali by sa všetky kroky tohto protokolu, vrátane centrifugácie, vykonávať pri izbovej teplote (15 – 25 °C).

Z dôvodu senzitivity amplifikačných technológií nukleovej kyseliny sú pri manipulácii potrebné tieto preventívne opatrenia na zabránenie krížovej kontaminácii:

- Opatrne pipetujte vzorku do odstredivej kolóny (PSC, PRC) bez navlhčenia okraja kolóny.
- Medzi prenosmi kvapaliny vždy vymeňte špičky pipety. Použite špičky na pipetu s bariérou proti aerosólu.
- Vyhnite sa dotyku membrány spinovej kolóny (PSC, PRC) špičkou pipety.
- Po vírení alebo zahriatí MCT krátko odstredte, aby ste odstránili kvapky z vnútornej strany viečka.



- Počas celého procesu noste rukavice. V prípade kontaktu medzi rukavicami a vzorkou ich ihneď vymeňte.
- Pred vložením spinovej kolóny (PSC, PRC) do mikrocentrifúgy ju uzavrite. Odstredenie vykonajte podľa popisu procesu.
- Otvorte vždy len jednu odstredivú kolónu (PSC, PRC) a dbajte na to, aby ste zabránili vzniku aerosólov.
- Na efektívne paralelné spracovanie viacerých vzoriek naplňte stojan s PT, do ktorého možno po centrifugácii preniesť spinové kolóny (PSC, PRC). Pred prenesením späť do mikrocentrifúgy zlikvidujte použité PT s prietokom a spinové kolóny (PSC, PRC) vložte do nových PT.

### Postup, ktorý sa má vykonať pred začatím

- Krv sa musí odobrať do skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) podľa pokynov v *príručke pre skúmavku PAXgene Blood RNA Tube*. V prípade potreby pozri prílohu C (strana 78) s odporúčaniami k manipulácii so skúmavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Zabezpečte, aby sa skúmavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) po odbere krvi inkubovali aspoň 2 hodiny pri izbovej teplote, aby sa zabezpečila úplná lýza krvných buniek a precipitácia RNA. Inkubácie skúmavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) cez noc môže zvýšiť výťažky. Ak sa počiatočná inkubácia krvi pri izbovej teplote počas 2 h neuskutočnila pred uskladnením pri 2 – 8 °C, –20 °C alebo –70 °C, potom najprv vyrovajte skúmavku PAXgene Blood RNA Tube (BRT) na izbovú teplotu a potom ju pri tejto teplote inkubujte 2 h pred začatím postupu.
- Prečítajte si bezpečnostné informácie na strane 18.
- Prečítajte si odporúčania k manipulácii s RNA (príloha A, strana 75).
- Zabezpečte, aby boli nástroje, ako napríklad pipety a trepací inkubátor, skontrolované a pravidelne kalibrované podľa odporúčaní výrobcu.
- Trepací inkubátor je potrebný v kroku 5 a 20. Teplotu trepacieho inkubátora nastavte na 55 °C.

- Väzbový pufer (BR2) môže pri skladovaní tvoriť precipitát. V prípade potreby ho ohrejte na 37 °C, aby sa rozpustil.
- Premývací pufer 2 (BR4) sa dodáva ako koncentrát. Pred prvým použitím pridajte 4 objemy etanolu (96 – 100 % v/v, stupeň čistoty p.a.), ako je uvedené na fľaši, aby ste získali pracovný roztok.
- Ak sa používa súprava RNase-Free DNase Set po prvýkrát, pripravte zásobný roztok DNázy. Rozpusťte pevnú DNázu I (RNFD; 1 500 jednotiek Kunitz)\* v 550 µl resuspenzného pufru (DRB) DNázy dodaného so súpravou. Dávajte pozor, aby pri otváraní liekovky nedošlo k strate DNázy I (RNFD). DNázu I (RNFD) pripravenú pomocou vody nemiešajte vo vortexe. DNáza I je mimoriadne citlivá na fyzickú denaturáciu. Miešanie je možné len jemným otáčaním liekovke.
- Rekonštituovaná DNáza I (RNFD) sa môže skladovať pri teplote 2 – 8 °C v pôvodnej sklenenej fľaštičke (zásobný roztok) alebo pri teplote -20 °C po vybratí zásobného roztoku zo sklenenej fľaštičky a jeho rozdelení do alikvotných dávok na jedno použitie (použite 1,5 ml MCT dodanú so súpravou; stačí na 5 alikvotných dávok). Rozmrazené alikvóty sa môžu skladovať pri teplote 2 – 8 °C. Po rozmrazení alikvóty znovu nezmrazujte.
- Pri príprave DNázy I (RNFD) pomocou vody a jej alikvótovaní postupujte podľa odporúčaní na manipuláciu s RNA (príloha A, strana 75).

## Postup

1. Centrifugujte skúmavku PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 10 minút pri 3 000 – 5 000 ×g pomocou rotora s otočným vedrom.



Uistite sa, že vzorka krvi bola inkubovaná v skúmavke PAXgene Blood RNA Tube (BRT) minimálne 2 hodiny pri izbovej teplote (15 – 25 °C), aby sa dosiahla úplná lýza krvných buniek a precipitácia RNA.

\* Jednotky Kunitz sú bežne používané jednotky na meranie DNázy I, ktoré sú definované ako množstvo DNázy I, ktoré spôsobí zvýšenie  $A_{260}$  v množstve 0,001 na minútu na mililiter pri teplote 25 °C, pH 5,0, s vysoko polymerizovanou DNA ako substrát (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 a 363).



Rotor musí zahŕňať adaptéri na skúmavky s okrúhlym dnom. Ak sa používa iný typ adaptéra na skúmavky, môže dôjsť počas centrifugácie k ich prasknutiu.

- Supernatant odstráňte preliatím alebo pipetovaním. Do pelety pridajte 4 ml vody bez RNázy (RNFW) a skúmavku zatvorte čistým sekundárnym uzáverom BD Hemogard (dodáva sa so súpravou).

Ak je supernatant preliaty, dávajte pozor, aby ste peletu nenarušili a okraj skúmavky osušte čistou papierovou utierkou.

- Vortexujte, kým sa peleta viditeľne nerozpustí, a odstredujte 10 minút pri  $3\,000 - 5\,000 \times g$  pomocou rotora s otočným vedrom. Celý supernatant vylejte a zlikvidujte.

Malý debris, ktorý zostane v supernatante po vortexovaní ale pred centrifugáciou nemá na proces žiadny vplyv.



Nedokonalé vyliatie supernatantu spomalí lýzu a rozriedi lyzát, a preto má vplyv na podmienky naviazania RNA na membránu PAXgene.

- Pridajte 350  $\mu$ l resuspenzného pufru (BR1) a vortexujte, kým sa peleta viditeľne nerozpustí.
- Vzorku odpipetujte do MCT s objemom 1,5 ml. Pridajte 300  $\mu$ l väzbového pufru (BR2) a 40  $\mu$ l proteinázy K (PK). Zamiešajte vortexovaním na 5 sekúnd a inkubujte na 10 min pri teplote  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  pomocou trepacieho inkubátora pri rýchlosti 400 – 1 400 ot/min. Po inkubácii nastavte teplotu trepacieho inkubátora na  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  (pre krok 20).



Nemiešajte väzbový pufer (BR2) a proteinázu K (PK) dokopy pred ich pridaním do vzorky.

- Pipetujte lyzát priamo do PSC (bledofialová) umiestneného v 2 ml PT a odstredujte 3 min pri maximálnej rýchlosti (ale nie viac ako  $20\,000 \times g$ ).



Opatrne napipetujte lyzát do centrifugačnej kolóny (PSC) a vizuálne skontrolujte, či sa úplne preniesol do kolóny (PSC).

Aby ste predišli poškodeniu kolón (PSC) a skúmaviek (PT), neprekračujte rýchlosť  $20\,000 \times g$ .



Niektoré vzorky môžu pretekať cez PSC bez odstredovania. To je spôsobené nízkou viskozitou niektorých vzoriek a nemalo by sa to brať ako znak zlyhania produktu.

7. Opatrne preneste celý supernatant prietokovej frakcie do čerstvej 1,5 ml MCT bez toho, aby ste narušili peletu v PT.
8. Pridajte 350  $\mu$ l etanolu (96 – 100 % v/v, stupeň čistoty p.a.). Zamiešajte vortexovaním a krátko centrifúgujte (1 – 2 sekundy pri rýchlosti 500 – 1 000  $\times g$ ), aby ste z vnútra uzáveru skúmavky odstránili kvapky.



Dĺžka centrifugácie nesmie presiahnuť 1 – 2 sekundy, pretože to môže mať za následok peletovanie nukleových kyselín a zníženie výťažkov celkovej RNA.

9. Pipetujte 700  $\mu$ l vzorky do PRC (červenej) umiestnenej v 2 ml PT a odstredujte 1 min pri 8 000 – 20 000  $\times g$ . Vložte odstredivú kolónu (PRC) do novej 2 ml PT a starú PT s prietokom vyhodte.
10. Zvyšnú vzorku pipetujte do PRC a odstredujte 1 min pri 8 000 – 20 000  $\times g$ . Vložte odstredivú kolónu (PRC) do novej 2 ml PT a starú PT s prietokom zlikvidujte.



Opatrne napipetujte vzorku do centrifugačnej kolóny (PRC) a vizuálne skontrolujte, či sa úplne preniesla do centrifugačnej kolóny (PRC).

11. Do PRC napipetujte 350  $\mu$ l premývacieho pufru 1 (BR3). Centrifugujte 1 min pri 8 000 – 20 000  $\times g$ . Vložte odstredivú kolónu (PRC) do novej 2 ml PT a starú PT s prietokom zlikvidujte.
12. Pridajte 10  $\mu$ l zásobného roztoku DNázy I (RNFD) do 70  $\mu$ l pufru na štiepenie DNA (RDD) v 1,5 ml MCT. Jemne zamiešajte trasením skúmavky a krátko centrifúgujte, aby sa zo strán skúmavky nahromadila zvyšková kvapalina.

Ak spracúvate napríklad 10 vzoriek, pridajte 100  $\mu$ l zásobného roztoku DNázy I (RNFD) do 700  $\mu$ l digestívneho pufru (RDD) DNA. Použite 1,5 ml MCT dodaných so súpravou.



DNáza I je mimoriadne citlivá na fyzickú denaturáciu. Miešanie je možné len jemným trepaním skúmavky. Nemiešajte vo vortexe.

13. Pipetujte inkubačnú zmes DNázy I (RNFD)(80 µl) priamo na membránu PRC a umiestnite ju na pracovnú dosku (20 – 30 °C) na 15 minút.



Zaistite, aby sa inkubačná zmes DNázy I (RNFD) umiestnila priamo na membránu. Digescia DNázy nebude úplná, ak sa časť zmesi naniesie a zostane na stenách alebo O-kružku centrifugačnej kolóny (PCR).

14. Do PRC napipetujte 350 µl premývacieho tlmivého roztoku 1 (BR3) a odstredíte 1 min pri 8 000 – 20 000 × g. Vložte odstredivú kolónu (PRC) do novej 2 ml PT a starú PT s prietokom vyhodte.

15. Do PRC napipetujte 500 µl premývacieho tlmivého roztoku 2 (BR4) a odstredíte 1 min pri 8 000 – 20 000 × g. Vložte odstredivú kolónu (PRC) do novej 2 ml PT a starú PT s prietokom vyhodte.



Premývací pufer 2 (BR4) sa dodáva ako koncentrát. Zaistite, aby sa etanol pridal do premývacieho pufru 2 (BR4) pred použitím (pozri „Postup, ktorý sa má vykonať pred začatím“, strana 25).

16. Do PRC pridajte ďalších 500 µl premývacieho pufru 2 (BR4). Odstredíte 3 min pri 8 000 – 20 000 × g.
17. Zlikvidujte PT s prietokom a vložte PRC do novej 2 ml PT. Odstredíte 1 min pri 8 000 – 20 000 × g.
18. Vyhodte nádobu PT s prietokom. Umiestnite PRC do 1,5 ml MCT a napipetujte 40 µl elučného pufru (BR5) priamo na membránu PRC. Na elúciu RNA odstredíte 1 min pri 8 000 – 20 000 × g.
- Je dôležité celú membránu navlhčiť elučným pufrom (BR5), aby sa dosiahla maximálna účinnosť elúcie.
19. Elučný krok (krok 18) zopakujte podľa popisu pomocou 40 µl elučného pufru (BR5) a rovnakej MCT.

20. Eluát inkubujte na 5 min pri teplote 65 °C v trepacom inkubátore (z kroku 5) bez trepania. Po inkubácii ho okamžite schladíte na ľade.



Táto inkubácia vzoriek pri teplote 65 °C denaturuje RNA pre následné aplikácie. Aj keď následný postup zahŕňa denaturáciu teplom, nepreskočte ho. Dostatočná denaturácia RNA v tomto bode je nevyhnutná na dosiahnutie maximálnej účinnosti pri následných aplikáciách.

Neprekračujte inkubačnú dobu ani teplotu.

21. Ak sa vzorky RNA nepoužijú hneď, uskladnite ich pri teplote -20°C alebo -70°C.

Keďže RNA zostáva po opakovanom zmrazení a rozmrazení denaturovaná, nie je potrebné opakovať inkubáciu pri teplote 65 °C. Ak používate vzorky RNA v diagnostickom teste, postupujte podľa pokynov od výrobcu.

Na presnú kvantifikáciu RNA podľa absorbancie pri 260 nm odporúčame vzorky zriediť v pufrí 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.\* Riedenie vzorky vo vode bez RNázy môže viesť k nesprávne nízkym hodnotám.

Spektrofotometer vynulujte pomocou prázdnej vzorky, ktorá sa skladá z rovnakého pomeru elučného pufru (BR5) a pufru Tris-HCl ako vo vzorkách, ktoré sa majú merať. Elučný pufer (BR5) má vysokú absorbanciu na hodnote 220 nm, ktorá môže viesť k vysokým základným úrovniám absorbancie, ak sa spektrofotometer poriadne nevynuluje.



Na kvantifikáciu v pufrí Tris HCl použijete vzťah  $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ . Pozri prílohu B, strana 76.

22. Opätovne uzavrite všetky fľaše obsahujúce pufre a vodu bez RNáz, fľaštičky a skúmavky obsahujúce enzýmy a enzýmové pufre a vrecká obsahujúce plastové materiály zo súpravy použitej na protokol. Zvyšný obsah súpravy skladujte podľa opisu v časti „Skladovanie a manipulácia s reagensiami“ (strana 22) a „Stabilita pri používaní“ (strana 22) na ďalšie použitie.

\* Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

# Protokol: Automatizovaná izolácia celkovej RNA z ľudskej plnej krvi odobratej do skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

## Dôležité body pred začatím činnosti

- Skontrolujte či je balenie súpravy nedotknuté a nepoškodené a či nedošlo k úniku pufrov. Ak je súprava poškodená, nepoužívajte ju.
- Pri použití pipety zaistite, aby bola nastavená na správny objem a aby sa kvapalina dôkladne a úplne nasala a nadávkovala.
- Aby ste zabránili prenosu vzoriek do nesprávnych skúmaviek a plastových spotrebných materiálov, uistite sa, že všetky PT, MCT a adaptéry rotora sú riadne označené pomocou permanentného pera. Označte veko a telo každej MCT, telo každej PT a vonkajšiu stenu každého rotorového adaptéra.
- Úniky vzoriek a pufrov počas procesu môžu znížiť výťažok a čistotu RNA.
- Ak nie je uvedené inak, mali by sa všetky kroky tohto protokolu, vrátane centrifugácie, vykonávať pri izbovej teplote (15 – 25 °C).

Z dôvodu senzitivity amplifikačných technológií nukleovej kyseliny sú pri manipulácii potrebné tieto preventívne opatrenia na zabránenie krížovej kontaminácii:

- Opatrne napipetujte vzorku do skúmavky PT na dno skúmavky bez toho, aby ste navlhčili okraj skúmavky.
- Medzi prenosmi kvapaliny vždy vymeňte špičky pipety. Použite špičky na pipetu s bariérou proti aerosólu.
- Vyhnite sa dotyku membrány spinovej kolóny (PSC, PRC) špičkou pipety.
- Po vírení alebo zahriatí MCT krátko odstredte, aby ste odstránili kvapky z vnútornej strany viečka.

- Počas celého procesu noste rukavice. V prípade kontaktu medzi rukavicami a vzorkou ich ihneď vymeňte.

## Postup, ktorý sa má vykonať pred začatím

- Krv sa musí odobrať do skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) podľa pokynov v príručke pre skúmavku PAXgene Blood RNA Tube. V prípade potreby pozri prílohu C (strana 78) s odporúčaniami k manipulácii so skúmavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Zabezpečte, aby sa skúmavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) po odbere krvi inkubovali aspoň 2 hodiny pri izbovej teplote, aby sa zabezpečila úplná lýza krvných buniek a precipitácia RNA. Inkubácie skúmavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) cez noc môže zvýšiť výťažky. Ak sa skúmavka PAXgene Blood RNA Tube (BRT) po odbere krvi skladuje pri teplote 2 – 8 °C, -20 °C alebo -70 °C, najprv vyrovnajte jej teplotu na izbovú teplotu a potom ju uskladnite pri izbovej teplote na 2 hodiny pred začatím procesu.
- Prečítajte si bezpečnostné informácie na strane 18.
- Prečítajte si „Dôležité poznámky“, strana 56.
- Prečítajte si odporúčania k manipulácii s RNA (príloha A, strana 75).
- Prečítajte si príslušnú používateľskú príručku prístroja QIAcube Connect MDx a všetky dodatočné informácie dodané s prístrojom a venujte mimoriadnu pozornosť bezpečnostným informáciám.
- Zabezpečte, aby boli pomôcky a prístroje, ako napríklad pipety a prístroj QIAcube Connect MDx, skontrolované a pravidelne kalibrované podľa odporúčaní výrobcu.
- Väzbový pufer (BR2) môže pri skladovaní tvoriť precipitát. V prípade potreby ho ohrejte na 37 °C, aby sa rozpustil.
- Premývací pufer 2 (BR4) sa dodáva ako koncentrát. Pred prvým použitím pridajte príslušné miesta objemy etanolu (stupeň čistoty 96 – 100 % v/v p.a.) ako je uvedené na fľaši, aby ste dosiahli pracovný roztok.



- Ak sa používa súprava RNase-Free DNase Set po prvýkrát, pripravte zásobný roztok DNázy. Rozpusťte pevnú DNázu I (RNFD; 1 500 jednotiek Kunitz)\* v 550 µl resuspenzného pufru (DRB) DNázy dodaného so súpravou. Dávajte pozor, aby pri otváraní liekovky nedošlo k strate DNázy I (RNFD). DNázu I (RNFD) pripravenú pomocou vody nemiešajte vo vortexe. DNáza I je mimoriadne citlivá na fyzickú denaturáciu. Miešanie je možné len jemným otáčaním liekovke.
- Rekonštituovaná DNáza I (RNFD) sa môže skladovať pri teplote 2 – 8 °C v pôvodnej sklenenej fľaštičke (zásobný roztok) alebo pri teplote -20 °C po vybratí zásobného roztoku zo sklenenej fľaštičky a jeho rozdelení do alikvotných dávok na jedno použitie (použijete 1,5 ml MCT dodanú so súpravou; stačí na 5 alikvotných dávok). Rozmrazené alikvóty sa môžu skladovať pri teplote 2 – 8 °C. Po rozmrazení alikvóty znovu nezmrazujte.
- Pri príprave DNázy I (RNFD) pomocou vody a jej alikvótovaní postupujte podľa odporúčaní na manipuláciu s RNA (príloha A, strana 75).
- Nainštalujte správny adaptér trepačky (dodáva sa s prístrojmi QIAcube Connect MDx; použijete adaptér na skúmavky safe-lock s objemom 2 ml označené ako „2“) a stojan trepačky položte na vrch adaptéra.
- Skontrolujte zásuvku na odpad a v prípade potreby ju vyprázdňte.
- Nainštalujte všetky súvisiace protokoly, ak ste tak nespravili pri predchádzajúcich cykloch. Prístroj QIAcube Connect MDx vyžaduje stiahnutie všetkých protokolov nachádzajúcich sa v súvisiacom zip súbore. Pozri časť „Inštalácia protokolov na QIAcube Connect MDx“, strana 58.

## Postup

1. Zatvorte dvierka prístroja QIAcube Connect MDx a zapnite ho pomocou vypínača (pozri obrázok 15, strana 57).

\* Jednotky Kunitz sú bežne používané jednotky na meranie DNázy I, ktoré sú definované ako množstvo DNázy I, ktoré spôsobí zvýšenie  $A_{260}$  v množstve 0,001 na minútu na mililitr pri teplote 25 °C, pH 5,0, s vysoko polymerizovanou DNA ako substrát (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 a 363).

Zaznie zvukový signál a zobrazí sa obrazovka spustenia. Nástroj automaticky vykoná inicializačné testy.

2. Otvorte dvierka prístroja QIAcube Connect MDx a naložte potrebné reagensie a plastový materiál do prístroja. Pozri časť „Načítanie QIAcube Connect MDx“, strana 59.

Aby ste ušetrili čas, môže naloženie prebehnúť počas jedného alebo oboch týchto krokov centrifugácie, ktoré trvajú 10 min (kroky 3 a 5).

3. Centrifugujte skúmavku PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 10 minút pri 3 000 – 5 000 × g pomocou rotora s otočným vedrom.



Uistite sa, že vzorka krvi bola inkubovaná v skúmavke PAXgene Blood RNA Tube (BRT) minimálne 2 hodiny pri izbovej teplote (15 – 25 °C), aby sa dosiahla úplná lýza krvných buniek a precipitácia RNA.



Rotor musí zahŕňať adaptéri na skúmavky s okrúhlym dnom. Ak sa používa iný typ adaptéra na skúmavky, môže dôjsť počas centrifugácie k ich prasknutiu.

4. Supernatant odstráňte preliatím alebo pipetovaním. Ak je supernatant preliaty, dávajte pozor, aby ste peletu nenarušili a okraj skúmavky osušte čistou papierovou utierkou. Do pelety pridajte 4 ml vody bez RNázy (RNFV) a skúmavku zatvorte čistým sekundárnym uzáverom BD Hemogard (dodáva sa so súpravou).
5. Vortexujte, kým sa peleta viditeľne nerozpustí, a odstredujte 10 minút pri 3 000 – 5 000 × g pomocou rotora s otočným vedrom. Celý supernatant vylejte a zlikvidujte.

Malý debris, ktorý zostane v supernatante po vortexovaní ale pred centrifugáciou nemá na proces žiadny vplyv.



Nedokonalé vylitie supernatantu spomalí lýzu a rozriedi lyzát, a preto má vplyv na podmienky naviazania RNA na membránu PAXgene.

6. Pridajte 350 µl resuspenzného pufru (BR1) a vortexujte, kým sa peleta viditeľne nerozpustí.

7. Vzorku odpipetujte do PT s objemom 2 ml.



Použite 2 ml PT, ktoré sú súčasťou súpravy PAXgene Blood RNA Kit.

8. Vložte otvorené PT so vzorkou do trepačky QIAcube Connect MDx (pozri obrázok 18, strana 61). Polohy vzorky sú očíslované, aby bolo naloženie jednoduché. Do otvorov na okraji stojana na trepačky vedľa každého PT zasunúť zástrčky do stojana na trepačky (sú súčasťou balenia QIAcube Connect MDx). Tak bude možná detekcia vzoriek počas kontroly naloženia.



Zaistite, aby bol nainštalovaný správny adaptér trepačky (Shaker Adapter, 2 ml, skúmavky safe-lock, označené číslom „2“, dodávané s prístrojmi QIAcube Connect MDx).



Ak spracúvate menej ako 12 vzoriek, uistite sa, že stojan trepačky naložíte podľa obrázku 22, strana 65. Nie je možné spracovať jednu (1) vzorku alebo 11 vzoriek. Čísla pozícií v stojane trepačky zodpovedajú číslam pozícií v centrifúge.

9. Zatvorte dvierka nástroja QIAcube Connect MDx (pozri obrázok 15, strana 57).

10. Vyberte protokol „PAXgene Blood RNA Part A“ a spustite ho.

Postupujte podľa pokynov uvedených na dotykovej obrazovke prístroja QIAcube Connect MDx.



Uistite sa, že obidve časti programu (časť A aj B) sú nainštalované na prístroji QIAcube Connect MDx (pozri „Inštalácia protokolov na QIAcube Connect MDx“, strana 58).



Prístroj vykoná kontrolu zaťaženia vzoriek, špičiek, adaptérov rotora a fľaš s reagentami.

11. Po dokončení protokolu „PAXgene Blood RNA Part A“ otvorte dvierka prístroja QIAcube Connect MDx (pozri obrázok 15, strana 57). Vyberte a zlikvidujte PRC z rotorových adaptérov a prázdne PT z trepačky.



Počas cyklu prenesie prístroj centrifugačné kolóny z pozície v adaptéri rotora 1 (poloha uzáveru L1) do pozície v adaptéri rotora 3 (poloha uzáveru L2) (pozri obrázok 20, strana 63).

12. Zatvorte viečka všetkých 1,5 ml MCT obsahujúcich purifikovanú RNA v adaptéroch rotora (pozícia 3, poloha viečka L3, pozri obrázok 20, strana 63). Preneste 1,5 ml MCT na adaptér QIAcube Connect MDx trepačky (pozri obrázok 18, strana 61).
13. Zatvorte dvierka nástroja QIAcube Connect MDx (pozri obrázok 15, strana 57).
14. Vyberte protokol „PAXgene Blood RNA Part B“ a spustite ho.

Postupujte podľa pokynov uvedených na dotykovej obrazovke QIAcube Connect MDx.



Tento program inkubuje vzorky pri teplote 65 °C a denaturuje RNA pre následné aplikácie. Aj keď následný postup zahŕňa denaturáciu teplom, nepreskočte ho. Dostatočná denaturácia RNA v tomto bode je nevyhnutná na dosiahnutie maximálnej účinnosti pri následných aplikáciách.

15. Po dokončení programu „PAXgene Blood RNA Part B“ otvorte dvierka QIAcube Connect MDx (pozri obrázok 15, strana 57). Okamžite položte MCT obsahujúce purifikovanú RNA na ľad.



**VAROVANIE:** Horúci povrch. Trepačka môže dosiahnuť teploty až do 70 °C. Nedotýkajte sa jej, keď je horúca.



Nenechajte purifikovanú RNA v prístroji QIAcube Connect MDx. Keď sa vzorky neschladia, môže purifikovaná RNA degradovať. Preto sa neodporúča pripravovať vzorky počas cyklov prebiehajúcich v noci a bez dohľadu.

16. Ak sa vzorky RNA nepoužijú hneď, uskladnite ich pri teplote –20 °C alebo –70 °C. Keďže RNA zostane denaturovaná po opakovanom zmrazení a rozmrazení, nie je potrebné zopakovať protokol inkubácie teplom („PAXgene Blood RNA Part B“). Ak používate vzorky RNA v diagnostickom teste, postupujte podľa pokynov výrobcu.

Na presnú kvantifikáciu RNA podľa absorbancie pri 260 nm odporúčame vzorky zriediť v pufrí 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. \* Riedenie vzorky vo vode bez RNázy môže viesť k nesprávne nízkym hodnotám.

Spektrofotometer vynulujte pomocou prázdnej vzorky, ktorá sa skladá z rovnakého pomeru elučného pufru (BR5) a pufru Tris-HCl ako vo vzorkách, ktoré sa majú merať. Elučný pufer (BR5) má vysokú absorbanciu na hodnote 220 nm, ktorá môže viesť k vysokým základným úrovniám absorbancie, ak sa spektrofotometer poriadne nevynuluje.



Na kvantifikáciu v pufrí Tris-HCl použite vzťah

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ . Pozri prílohu B, strana 76.

17. Vyberte stojan na fľašky na reagentie z pracovného stola QIAcube Connect MDx (pozri obrázok 18, strana 61) a zatvorte všetky fľašky vhodne označeným uzáverom. Opätovne uzavrite všetky fľaše obsahujúce pufré a vodu bez RNáz, fľaštičky a skúmavky obsahujúce enzýmy a enzýmové pufré a vrecká obsahujúce plastové materiály zo súpravy použitej na protokol. Zvyšný obsah súpravy a fľaštičky s reagentiami skladujte podľa opisu v časti „Skladovanie a manipulácia s reagentiami“ (strana 22) a „Stabilita pri používaní“ (strana 22) na ďalšie použitie.

Odstráňte a zlikvidujte zvyšné reagentie v PT v otvoroch QIAcube Connect MDx MCT. Vyberte adaptéry rotora z odstredivky a zlikvidujte ich. Vyprázdňte zásuvku na odpad prístroja QIAcube Connect MDx (pozri obrázok 15, strana 57). Zatvorte dvierka prístroja a vypnite prístroj vypínačom.

\* Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

## Obmedzenia používania produktu

Súprava PAXgene Blood RNA Kit je určená na purifikáciu medzibunkovej RNA z ľudskej plnej krvi ( $4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$  leukocytov/ml) v rámci použitia v in vitro diagnostike. Nie je určená na izoláciu genómovej DNA alebo vírusových nukleových kyselín z ľudskej krvi. Z dôvodu limitovaného počtu transkripcií validovaných pre stabilizačné špecifikácie (génové transkripcie FOS a IL1B) neboli charakteristiky účinnosti stanovené pre všetky transkripcie. Používatelia laboratória by mal posúdiť údaje výrobcu a svoje vlastné údaje a určiť, či je validácia pre ostatné transkripcie potrebná. Komponenty súpravy sú určené len na použitie v manuálnom a automatizovanom protokole opísanom v tomto návode na použitie.

Pozri *príručku pre skúmavku PAXgene Blood RNA Tube* s informáciami o použití skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

## Kontrola kvality

V súlade so certifikovaným systémom riadenia kvality QIAGEN ISO je každá šarža súpravy PAXgene Blood RNA Kit testovaná na základe vopred určených špecifikácií, aby bola zaistená konzistentná kvalita produktu.

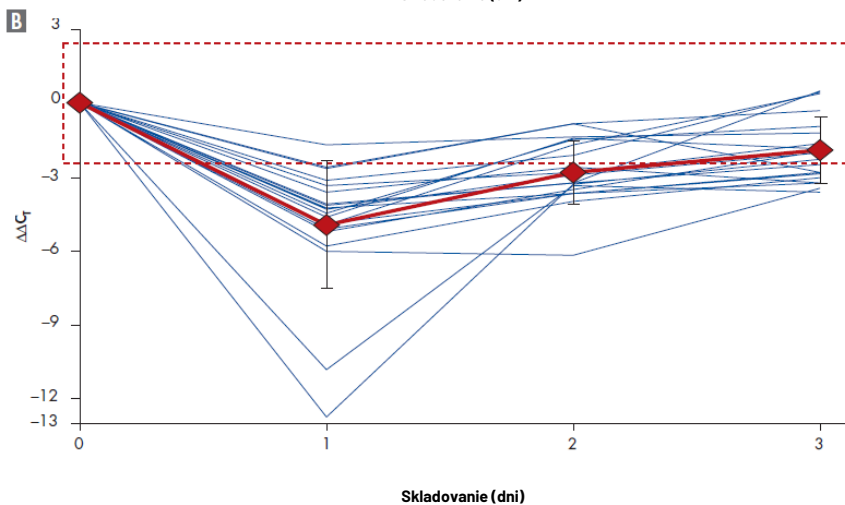
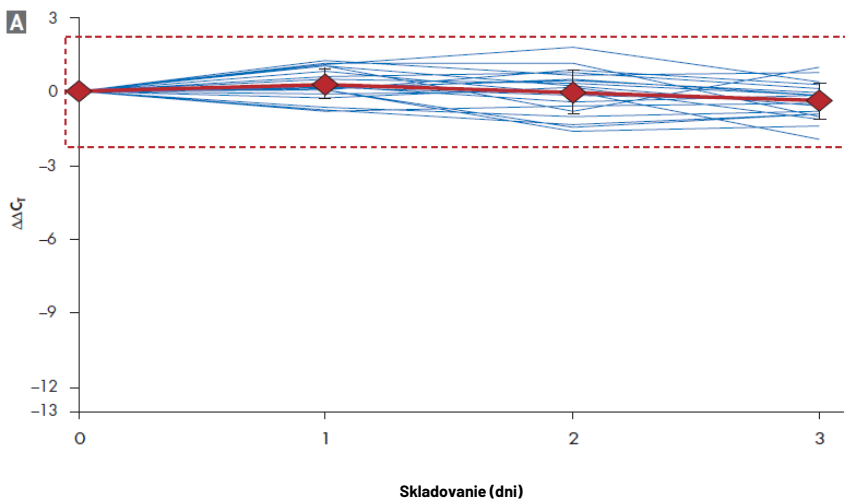
# Charakteristiky účinnosti

## Odber a stabilizácia vzoriek

Skúmavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) obsahujú patentovanú reagensiu na stabilizáciu RNA. Táto prísada chráni molekuly RNA pred degradáciou RNázami a minimalizuje zmeny expresie génov ex vivo. Skúmavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) sú určené na odber ľudskej plnej krvi a stabilizovanie bunkovej RNA na 3 dni pri teplote 18 – 25 °C (obrázky 4 a obrázky 5, strany 40 a 41, respektívne) do 5 dní pri teplote 2 – 8 °C (obrázky 6 a obrázky 7, strany 42 a 43). Okrem toho sa stabilizovaná krv môže skladovať zmrazená. V súčasnosti dostupné údaje ukazujú stabilizáciu bunkovej RNA najmenej 11 rokov pri –20 °C alebo –70 °C\*. Ďalšie informácie z prebiehajúcich štúdií hodnotiacich stabilitu počas dlhšieho časového obdobia nájdete na stránke [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) alebo kontaktujte technické služby spoločnosti QIAGEN.

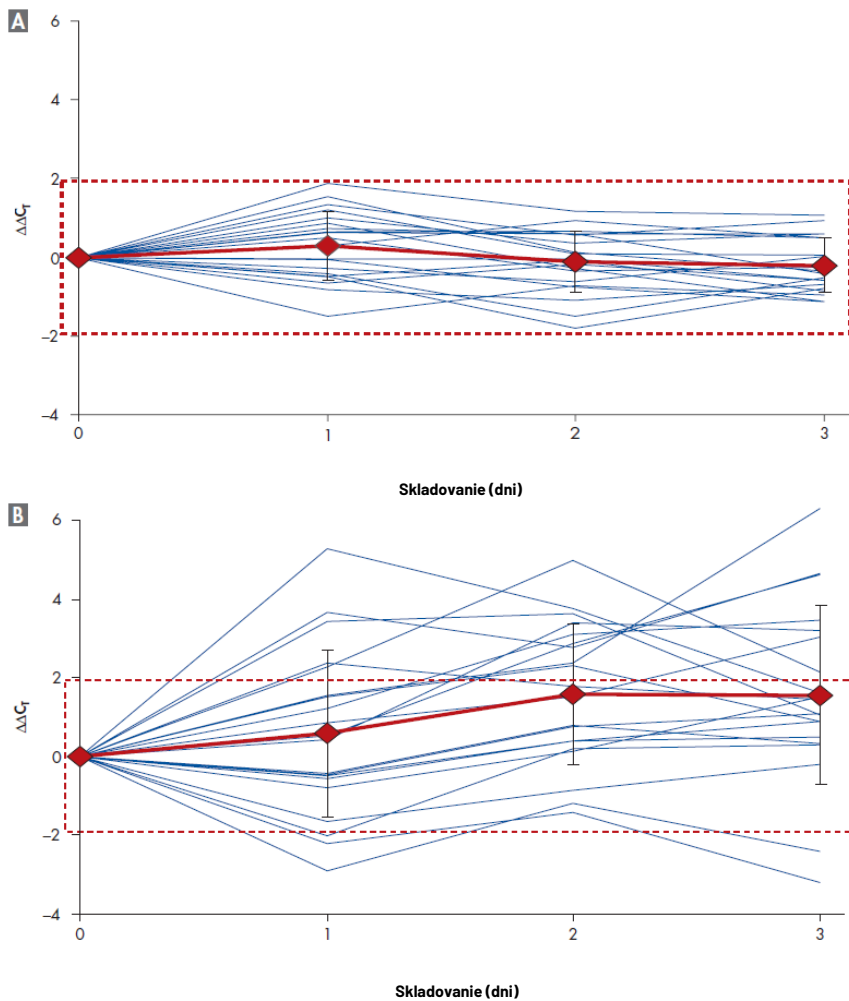
Skutočné trvanie stabilizácie RNA sa môže líšiť v závislosti od druhov bunkovej RNA a použitej následnej aplikácie. Z dôvodu limitovaného počtu transkripcií validovaných pre stabilizačné špecifikácie (génové transkripcie FOS a IL1B) neboli charakteristiky účinnosti stanovené pre všetky transkripcie. Používatelia laboratória by mal posúdiť údaje výrobcu a svoje vlastné údaje a určiť, či je validácia pre ostatné transkripcie potrebná.

\* Dlhodobá štúdia krvi uskladnenej v skúmavkách PAXgene Blood RNA Tubes prebieha.

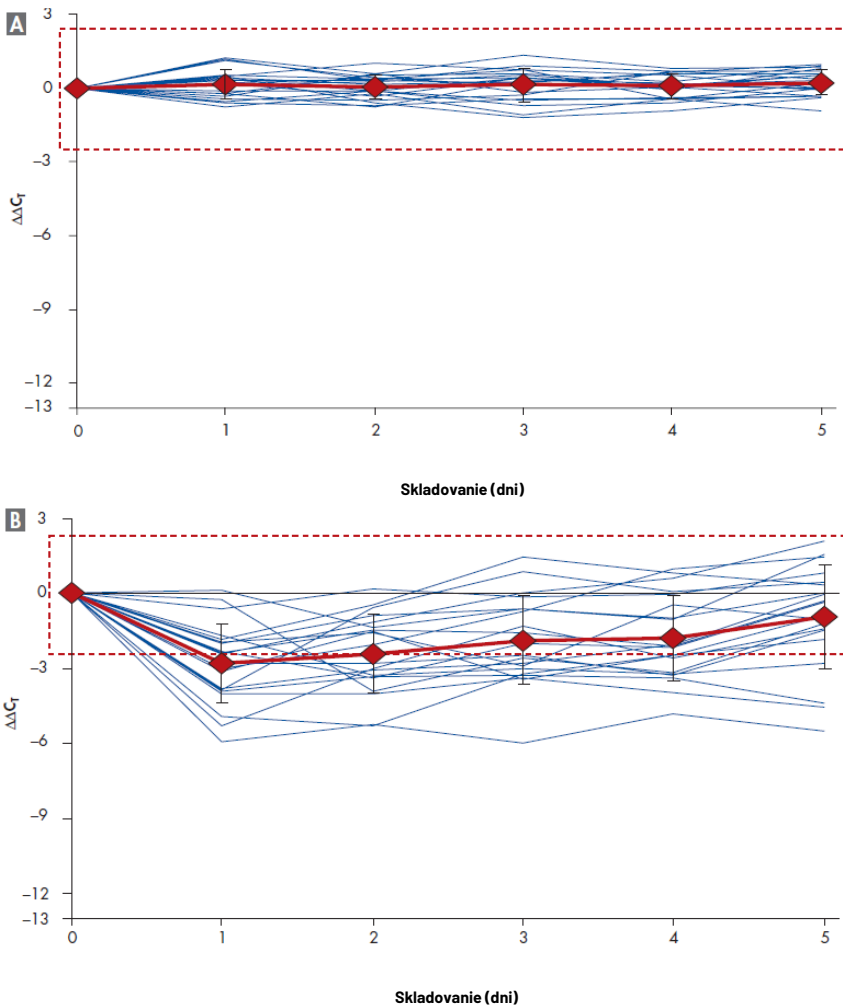


**Obrázok 4: Stabilita RNA vo vzorkách krvi pri teplote 18 – 25 °C: FOS.** Krv bola odobratá 10 dorcom v zdvojených vzorkách, ktoré sa uskladnili pri teplote 18 – 25 °C na uvedený počet dní, po ktorých nasledovala izolácia RNA. **[A]** Krv sa odoberala a uskladnila v skúmavkách PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) a celková RNA sa purifikovala pomocou súpravy PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Krv sa odoberala a uskladnila v štandardných skúmavkách na odber krvi s EDTA ako antikoagulant a celková RNA sa purifikovala pomocou štandardnej metódy organickej extrakcie s čistením RNA. Relatívne úrovne transkripcie FOS sa určili pomocou real-time RT-PCR s použitím 18S rRNA ako interného štandardu. Hodnoty pre všetky vzorky sa zakreslia s priemerami a štandardnými odchýlkami všetkých zobrazených vzoriek. Prerušované čiary znamenajú celkovú presnosť testu  $\pm 3 \times (2,34 C_T)$ .

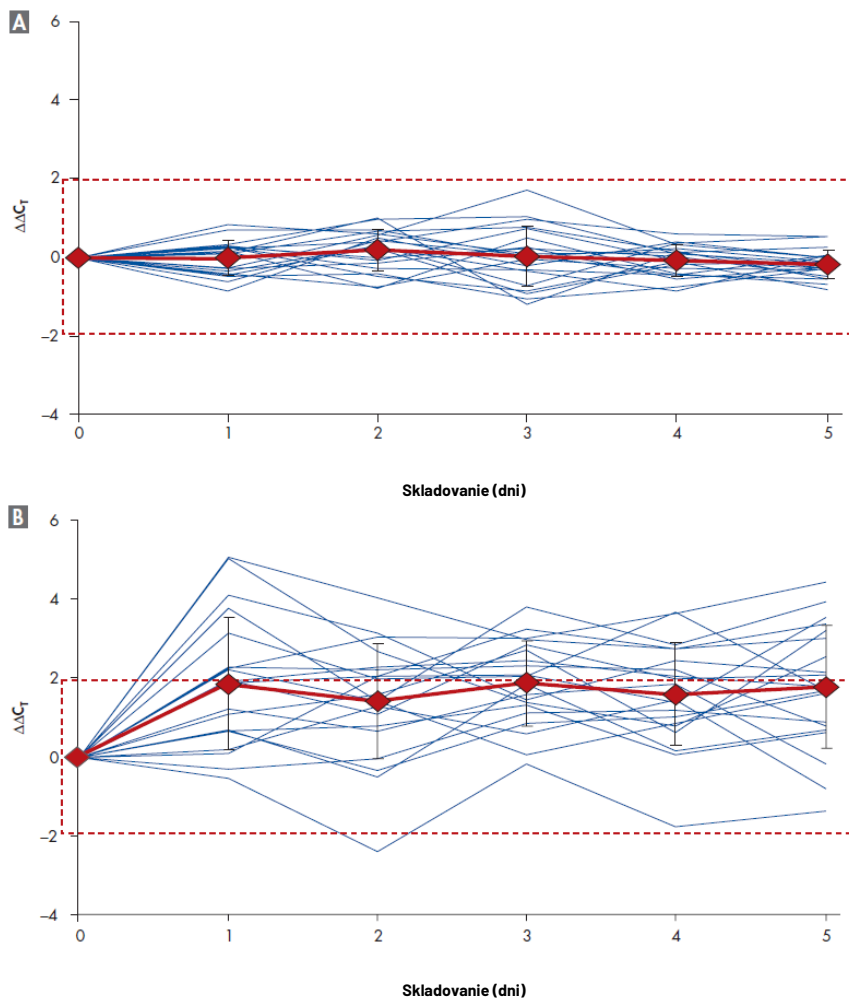




**Obrázok 5: Stabilita RNA vo vzorkách krvi pri teplote 18 – 25 °C: IL1B.** Krv sa odobrala a celková RNA sa purifikovala po skladovaní pri teplote 18 – 25 °C podľa popisu na obrázku 4. Relatívne úrovne transkripcie IL1B sa určili pomocou real-time, duplex RT-PCR s použitím 18S rRNA ako interného štandardu. Hodnoty pre všetky vzorky sa zakreslia s priemerní a štandardnými odchýlkami všetkých zobrazených vzoriek. Prerušované čiary znamenajú celkovú presnosť testu  $\pm 3 \times (1,93 C_T)$ .



**Obrazok 6: Stabilita RNA vo vzorkách krvi pri teplote 2 – 8 °C: FOS.** Krv bola odobratá 10 zjavne zdravým darcom v zdvojených vzorkách, ktoré sa uskladnili pri teplote 2 – 8 °C na uvedený počet dní, po ktorých nasledovala izolácia RNA. **[A]** Krv sa odobrala a uskladnila v skúmavkách PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) a celková RNA sa purifikovala pomocou súpravy PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Krv sa odobrala a uskladnila v štandardných skúmavkách na odber krvi s EDTA ako antikoagulant a celková RNA sa purifikovala pomocou štandardnej metódy organickej extrakcie s čistením RNA. Relatívne úrovne transkripcie FOS sa určili pomocou real-time RT-PCR s použitím 18S rRNA ako interného štandardu. Hodnoty pre všetky vzorky sa zakreslia s priemermi a štandardnými odchýlkami všetkých zobrazených vzoriek. Prerušované čiary znamenajú celkovú presnosť testu  $\pm 3 \times (2,34 C_T)$ .



**Obrázok 7: Stabilita RNA vo vzorkách krvi pri teplote 2 – 8 °C: IL1B.** Krv sa odobrala a celková RNA sa purifikovala po skladovaní pri teplote 2 – 8 °C podľa popisu na obrázku 6. Relatívne úrovne transkripcie IL1B sa určili pomocou real-time, duplex RT-PCR s použitím 18S rRNA ako interného štandardu. Hodnoty pre všetky vzorky sa zakreslia s priemerami a štandardnými odchyľkami všetkých zobrazených vzoriek. Prerušované čiary znamenajú celkovú presnosť testu  $\pm 3 \times (1,93 C_T)$ .

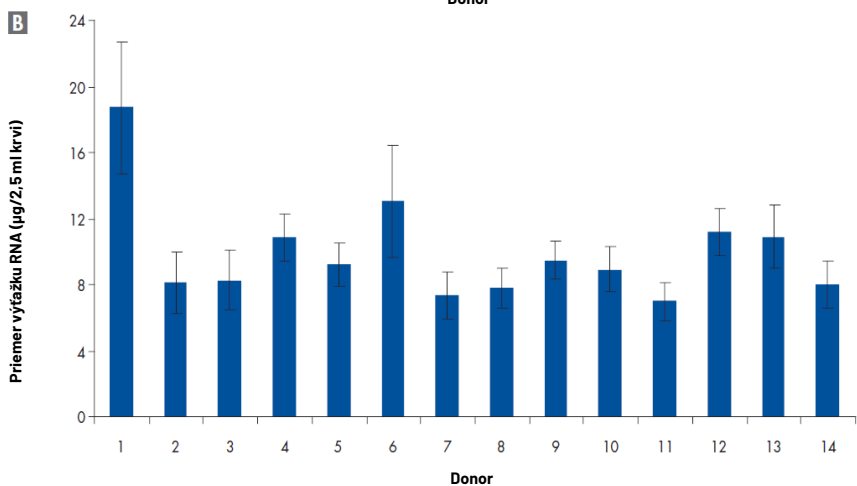
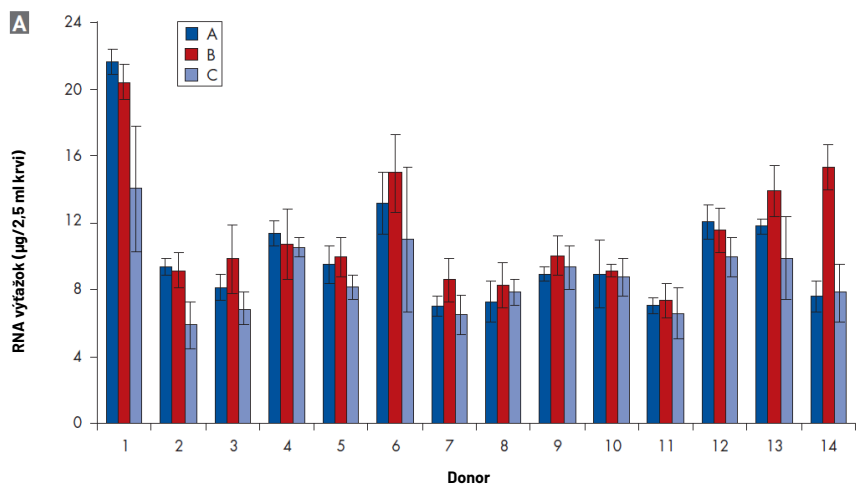
## Manuálne izolovanie RNA

Celková RNA izolovaná pomocou systému PAXgene Blood RNA System je čistá. Pomocou manuálneho protokolu sú hodnoty  $A_{260}/A_{280}$  v rozmedzí 1,8 a 2,2 a  $\leq 1\%$  (w/w) genómovej DNA je prítomné v  $\geq 95\%$  všetkých vzoriek pri meraní kvantitatívnou real-time PCR sekvencie  $\beta$ -aktín génu. Najmenej 95 % vzoriek nevykazuje žiadnu inhibíciu pri RT-PCR, keď eluát predstavuje až 30 % objemu reakcie RT-PCR.

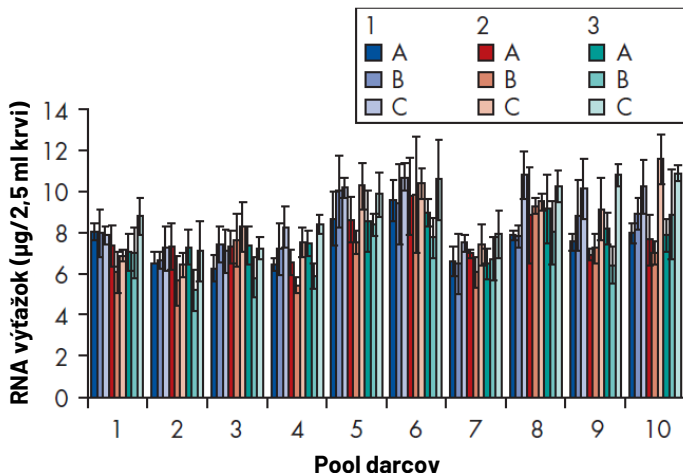
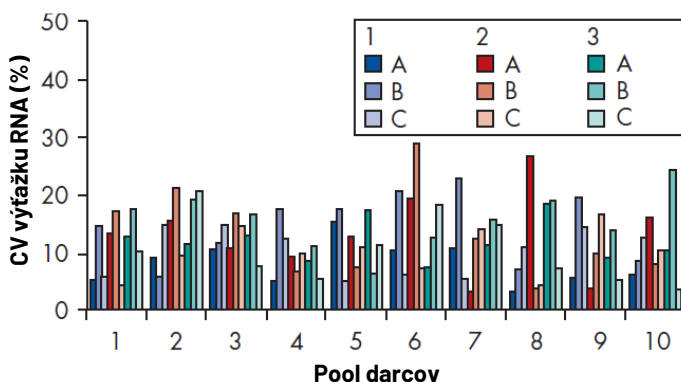
Pomocou manuálneho protokolu je priemerný čas prípravy vzorky (na základe údajov z 12 cyklov prípravy vzoriek) približne 90 min\*, pričom čas práce je len 40 min. Výťažky RNA z 2,5 ml plnej krvi zdravého človeka sú  $\geq 3 \mu\text{g}$  u  $\geq 95\%$  spracovaných vzoriek. Keďže výťažky závisia do veľkej miery od darcu, môžu sa jednotlivé výťažky líšiť. U individuálnych darcov poskytuje systém PAXgene Blood RNA System vysoko reprodukovateľné a opakovateľné výťažky (obrázky 8 a 9, strany 45 a 46) a reprodukovateľnú a opakovateľnú RT-PCR (obrázky 10 a 11, strany 50 a 51), vďaka čomu je vysoko robustná pri klinických diagnostických testoch.

Obrázok 8 (strana 45) ukazuje celkovú opakovateľnosť a reprodukovateľnosť systému PAXgene Blood RNA System. Uskutočnili sa doplnkové štúdie, ktoré ukázali vplyv rôznych šarží súpravy PAXgene Blood RNA Kit a rôznych operátorov na reprodukovateľnosť výťažku RNA a účinnosti real-time RT-PCR. Keďže sa v týchto štúdiách použili vzorky krvi z poolu namiesto jednotlivých skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), nereflektujú výsledky opakovateľnosť systému vrátane fluktuácie medzi jednotlivými odbermi krvi, ale len opakovateľnosť prípravy vzorky (pozri obrázok 9, strana 46).

\* Celkové trvanie protokolu, vrátane počiatočnej manipulácie so skúmavkami PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugácia, premývanie pelety a resuspenzia pelety).



**Obrázok 8: Reprodukateľné a opakovateľné izolovanie RNA.** Štyri kópie vzoriek krvi od 14 darcov manuálne spracoval každý z 3 technikov (A, B, C). Použili sa tri sady zariadenia a všetky vzorky pripravil jeden technik pomocou rovnakého vybavenia. [A] Sú zobrazené stredné a štandardné odchýlky výťažku RNA z každej kópie vzorky od rovnakých darcov a rôznych technikov. [B] Dvanásť kópií vzoriek krvi od každého zo 14 darcov spracovali 3 rôzni technici. Sú zobrazené stredné a štandardné odchýlky výťažku RNA z každej vzorky od rovnakých darcov a všetkých technikov. Pre všetky RNA vzorky boli pomery  $A_{260}/A_{280}$  od 1,8 do 2,2.

**A****B**

**Obrázok 9: Opakovateľnosť a reprodukovateľnosť výťažku RNA od rôznych operátorov a šarží súpravy PAXgene Blood RNA Kit pomocou vzoriek krvi z poolu.** Do skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes sa odobrali vzorky krvi od 30 rôznych darcov (BRT; 12 skúmaviek na darcu, 360 skúmaviek celkovo). Obsah skúmaviek od 3 darcov sa vložil do poolu a následne sa opakovane alikvotoval na 36 vzoriek. Týchto 36 vzoriek na pool 3 darcov manuálne spracovali 3 rôzni operátori. Každý operátor použil na izoláciu RNA 3 rôzne šarže súpravy PAXgene Blood RNA Kit a spracoval vzorky v štyroch kópiách z každého poolu s 10 darcami. **[A]** Výťažok RNA a štandardná odchýlka pre každú kombináciu operátora a šarže. Vzorky krvi v štyroch kópiách z poolov s 10 darcami spracovali 3 rôzni operátori (A, B, C) pomocou každej šarže 3 súprav (1, 2, 3). Sú zobrazené priemerné výťažky (stĺpce) a štandardné odchýlky (stĺpce chýb) na každú zo štyroch kópií vzorky z rovnakého poolu donorov pre rôzneho operátora a rôznu šaržu súpravy. **[B]** CV výťažku RNA na pool donorov pre všetky kombinácie operátora a šarže (A, B, C; 1, 2, 3) podľa výpočtu z priemerného výťažku a štandardnej odchýlky výťažku zobrazeného na obrázku 9A.

**Tabuľka 1A: Reprodukovateľnosť v každej šarži a pre každého používateľa pre vybrané pooly darcov (1, 6, 9, 10)**

Kombinácia údajov	Pool darcov 1 ( $5,1 \times 10^6$ buniek/ml)			Pool darcov 6 ( $6,5 \times 10^6$ buniek/ml)		
	Priemerný výťažok ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Priemerný výťažok ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Šarža 1, používateľ A	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
Šarža 1, používateľ B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
Šarža 1, používateľ C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
Šarža 2, používateľ A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
Šarža 2, používateľ B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
Šarža 2, používateľ C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
Šarža 3, používateľ A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
Šarža 3, používateľ B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
Šarža 3, používateľ C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
Kombinácia údajov	Pool donorov 9 ( $8,4 \times 10^6$ buniek/ml)			Pool darcov 10 ( $10,2 \times 10^6$ buniek/ml)		
	Priemerný výťažok ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Priemerný výťažok ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Šarža 1, používateľ A	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
Šarža 1, používateľ B	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Šarža 1, používateľ C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Šarža 2, používateľ A	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Šarža 2, používateľ B	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Šarža 2, používateľ C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Šarža 3, používateľ A	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Šarža 3, používateľ B	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Šarža 3, používateľ C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3

**Tabuľka 1B: Reprodukovateľnosť pre každého používateľa a medzi všetkými šaržami pre vybrané pooly darcov (1, 6, 9, 10)**

Kombinácia údajov	Pool darcov 1 ( $5,1 \times 10^6$ buniek/ml)			Pool darcov 6 ( $6,5 \times 10^6$ buniek/ml)		
	Priemerný výťažok ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Priemerný výťažok ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Používateľ A, všetky šarže	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Používateľ B, všetky šarže	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Používateľ C, všetky šarže	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Kombinácia údajov	Pool darcov 9 ( $8,4 \times 10^6$ buniek/ml)			Pool darcov 10 ( $10,2 \times 10^6$ buniek/ml)		
	Priemerný výťažok ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Priemerný výťažok ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Používateľ A, všetky šarže	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Používateľ B, všetky šarže	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Používateľ C, všetky šarže	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

**Tabuľka 1C: Reprodukovateľnosť pre každú šaržu a medzi všetkými používateľmi pre vybrané pooly darcov (1, 6, 9, 10)**

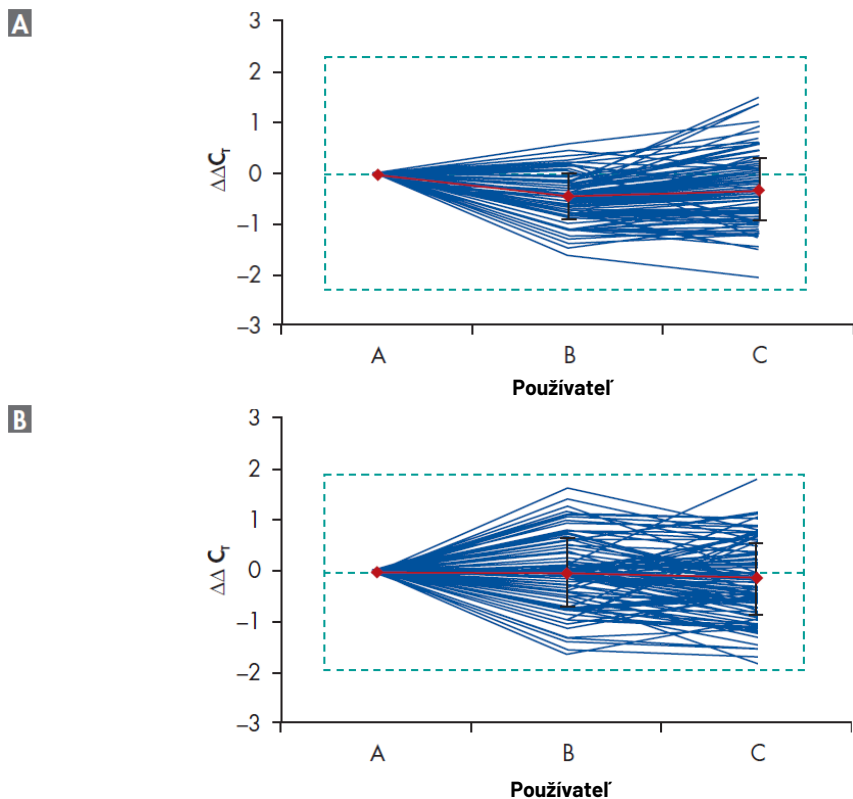
Kombinácia údajov	Pool darcov 1 ( $5,1 \times 10^6$ buniek/ml)			Pool darcov 6 ( $6,5 \times 10^6$ buniek/ml)		
	Priemerný výťažok ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Priemerný výťažok ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Šarža 1, všetci používatelia	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Šarža 2, všetci používatelia	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Šarža 3, všetci používatelia	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Kombinácia údajov	Pool darcov 9 ( $8,4 \times 10^6$ buniek/ml)			Pool darcov 10 ( $10,2 \times 10^6$ buniek/ml)		
	Priemerný výťažok ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Priemerný výťažok ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Šarža 1, všetci používatelia	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Šarža 2, všetci používatelia	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Šarža 3, všetci používatelia	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20



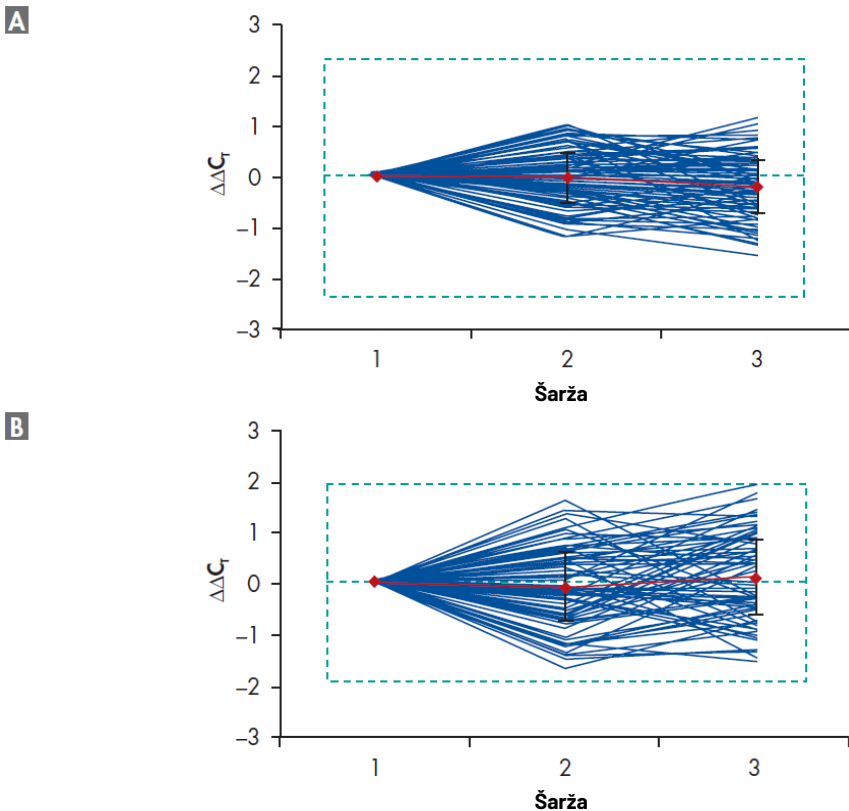
Tabuľka 1D: Reprodukovateľnosť medzi všetkými šaržami a všetkými používateľmi pre vybrané pooly darcov (1, 6, 9, 10)

Kombinácia údajov	Pool darcov 1 ( $5,1 \times 10^6$ buniek/ml)			Pool donorov 6 ( $6,5 \times 10^6$ buniek/ml)		
	Priemerný výťažok ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Priemerný výťažok ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Šarža 1, všetci používatelia	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
	Pool donorov 9 ( $8,4 \times 10^6$ buniek/ml)			Pool darcov 10 ( $10,2 \times 10^6$ buniek/ml)		
	Priemerný výťažok ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Priemerný výťažok ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Šarža 1, všetci používatelia	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Detailný analýza 4 reprezentatívnych poolov darcov. Pooly sa vybrali podľa počtu bielych krviniek a reflektujú horné, stredné a dolné hodnoty normálneho rozsahu počtu bielych krviniek ( $4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$  leukocytov/ml). Počet bielych krviniek predstavuje priemernú hodnotu 3 počtov bielych krviniek od 3 donorov z každého poolu.



**Obrázok 10: Reprodukovateľnosť RT-PCR – medzi používateľmi.** Na real-time RT-PCR sa použila RNA purifikovaná počas experimentu popísaného na obrázku 9. Relatívne úrovne transkripcie **[A]** FOS a **[B]** IL1B sa určili pomocou real-time RT-PCR s použitím 18S rRNA ako interného štandardu. Hodnoty pre všetky vzorky sa zakreslia vzhľadom na hodnoty pre používateľa A (pooly s 10 darcami  $\times$  3 šarže súpravy  $\times$  4 kópie = 120 sád údajov pre každý gén), so strednými hodnotami (červené čiary) a štandardnými odchýlkami (čierné stĺpce) pre všetky zobrazené vzorky. Prerušované čiary znamenajú celkovú presnosť testov  $\pm 3 \times$  (FOS: 2,34  $C_T$ ; IL1B: 1,93  $C_T$ ).



**Obrázok 11: Reprodukateľnosť RT-PCR – medzi šaržami súprav.** Na real-time RT-PCR sa použila RNA purifikovaná počas experimentu popísaného na obrázku 9. Relatívne úrovne transkripcie [A] FOS a [B] IL1B sa určili pomocou real-time RT-PCR s použitím 18S rRNA ako interného štandardu. Hodnoty pre všetky vzorky sa zakreslia vzhľadom na hodnoty pre šaržu súpravy 1 (pooly s 10 darcami × 3 používatelia × 4 kópie = 120 sád údajov pre každý gén), so strednými hodnotami (červené čiary) a štandardnými odchýlkami (čierné stĺpce) pre všetky zobrazené vzorky. Prerušované čiary znamenajú celkovú presnosť testov  $\pm 3 \times$  (FOS: 2,34  $C_T$ ; IL1B: 1,93  $C_T$ ).

Tabuľka 2: Súhrn údajov RT-PCR z obrázku 10 a obrázku 11

Systém testu	Test rRNA FOS/18S		Test rRNA IL1B/18S	
	Stredná hodnota ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SD ( $\Delta\Delta C_T$ )	Stredná hodnota ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SD ( $\Delta\Delta C_T$ )
<b>Reprodukovateľnosť v rámci každého používateľa a medzi všetkými šaržami</b>				
Všetci používatelia, šarža 1 – šarža 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Všetci používatelia, šarža 1 – šarža 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Všetci používatelia, šarža 1 – šarža 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
<b>Reprodukovateľnosť v rámci každého používateľa a medzi všetkými šaržami</b>				
Všetky šarže, používateľ A – používateľ A	0,00	0,00	0,00	0,00
Všetky šarže, používateľ A – používateľ B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Všetky šarže, používateľ A – používateľ C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Používateľ: Technik, vykonal štúdiu.

Šarža: Počet šarží súpravy, ktoré sa v tejto štúdii použili.

SD: Standard deviation (Štandardná odchýlka).

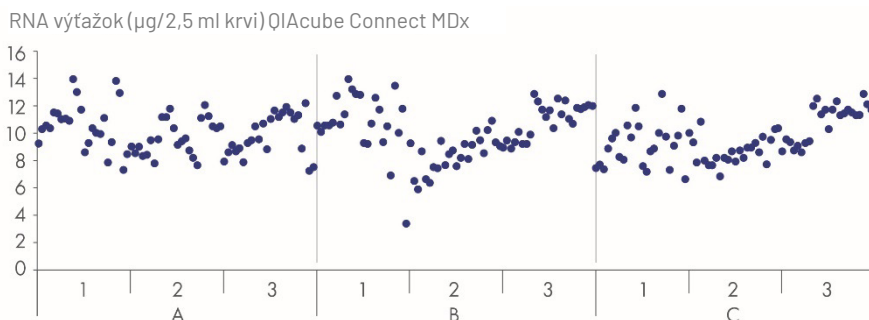
Stredné hodnoty  $\Delta\Delta C_T$  (N = 120) a štandardné odchýlky sú zobrazené pre údaje uvedené na obrázkoch 10 a 11.

## Automatické izolovanie RNA

Výťažky RNA z 2,5 ml plnej krvi zdravého človeka sú  $\geq 3 \mu\text{g}$  u  $\geq 95\%$  spracovaných vzoriek. Obrázok 12 (strana 53) zobrazuje výťažky RNA z celkovo 216 vzoriek pripravených pomocou automatizovaného protokolu s 3 šaržami súprav 3 tromi operátormi. Keďže sa v týchto štúdiách namiesto jednotlivých skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) použili vzorky z poolu, nereflektujú výsledky výťažok RNA očakávané z jednotlivých vzoriek jednotlivých odberov krvi. Keďže výťažky závisia do veľkej miery od darcu, môžu sa jednotlivé výťažky líšiť (obrázok 12, strana 53).

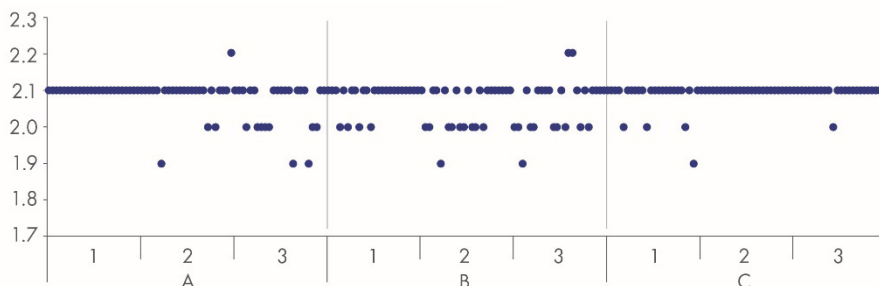
Najmenej 95 % vzoriek nevykazuje žiadnu inhibíciu pri RT-PCR, keď eluát predstavuje až 30 % objemu reakcie RT-PCR. Pri použití automatizovaného protokolu, je krížová kontaminácia medzi vzorkami nezistiteľná, čo sa meria kvantitatívnou RT-PCR analýzou v reálnom čase, pomocou sekvencií transkriptov ABL1 a FOS v RNA-negatívnych vzorkách (voda) spárovaných s RNA-pozitívnymi vzorkami (ľudská krv) v tom istom cykle.

RNA izolovaná pomocou systému PAXgene Blood RNA System a automatizovaný protokol je čistý tak, ako to udáva nedostatok inhibície RT-PCR a hodnoty  $A_{260}/A_{280}$  medzi 1,8 a 2,2. Genómová DNA je prítomná v  $\leq 1\%$  (w/w) v  $\geq 95\%$  všetkých vzoriek podľa merania kvantitatívnou real-time PCR sekvencie  $\beta$ -aktín génu. Obrázky 13 a 14 (strana 54) zobrazujú hodnoty  $A_{260}/A_{280}$  a relatívnu genómovú DNA celkovo 216 vzoriek pripravených pomocou automatizovaného protokolu s 3 šaržami súprav 3 operátormi.



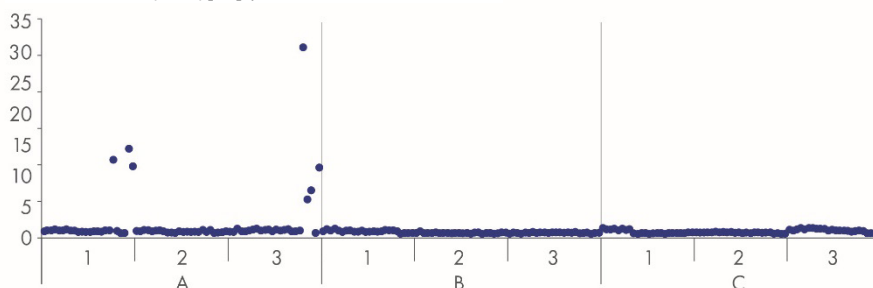
**Obrázok 12: Výťažok RNA – automatizované spracovanie pomocou QIAcube Connect MDx.** Do skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) sa odobrli vzorky krvi od rôznych darcov. Obsah skúmaviek sa vložil do poolu 6 darcov a následne sa opakovane alikvotoval. 3 rôzni operátormi (A, B, C) spracovali celkovo 216 skúmaviek (t. j. 36 na pool). Každý operátor použil 3 rôzne šarže (1, 2, 3) súpravy PAXgene Blood RNA Kit na automatizovanú izoláciu pomocou QIAcube Connect MDx a spracoval štvornásobné vzorky z každej zo 6 skupín darcov. Výťažky RNA všetkých jednotlivých vzoriek sú zobrazené pre každú kombináciu operátora a šarže.

Čistota RNA ( $A_{260}/A_{280}$ ) QIAcube Connect MDx



**Obrázok 13: Čistota RNA (hodnoty  $A_{260}/A_{280}$ ) – automatizované spracovanie s QIAcube Connect MDx.** RNA purifikovali 3 rôzni operátori (A, B, C) s použitím 3 rôznych šarží (1, 2, 3) súpravy PAXgene Blood RNA Kit s QIAcube Connect MDx v experimente opísanom v obrázku 12. Hodnoty  $A_{260}/A_{280}$  všetkých jednotlivých vzoriek sú zobrazené pre všetky kombinácie operátora a šarže.

Genómová DNA (w/w) [%] QIAcube Connect MDx



**Obrázok 14: Čistota RNA (% kontaminácie genómovou DNA) – automatizované spracovanie pomocou QIAcube Connect MDx.** RNA purifikovali 3 rôzni operátori (A, B, C) s použitím 3 rôznych šarží (1, 2, 3) súpravy PAXgene Blood RNA Kit s QIAcube Connect MDx v experimente opísanom v obrázku 12. Množstvá genómovej DNA (w/w) všetkých jednotlivých vzoriek sú zobrazené pre každú kombináciu operátora a šarže.

Automatizovaný protokol izolácie RNA pomocou systému PAXgene Blood RNA System poskytuje vysoko reprodukovateľné a opakovateľné výsledky RT-PCR, vďaka čomu je vysoko spoľahlivý pre klinické diagnostické testy.

## Stabilita izolovanej RNA

Vzorky RNA izolované z krvi naplnenej skúmavkami PAXgene Blood RNA Tubes s použitím súpravy PAXgene Blood RNA Kit sú stabilné počas 5 rokov skladovania pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 7 rokov skladovania pri  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (koncový bod štúdie).

# Dôležité poznámky

## Použitie QIAcube Connect MDx

Uistite sa, že ste oboznámení s ovládaním prístroja QIAcube Connect MDx. Pred začatím automatického protokolu PAXgene Blood RNA si prečítajte návod na použitie prístroja a všetky ďalšie informácie dodané s prístrojom a venujte zvýšenú pozornosť bezpečnostným informáciám.

## Spustenie QIAcube Connect MDx

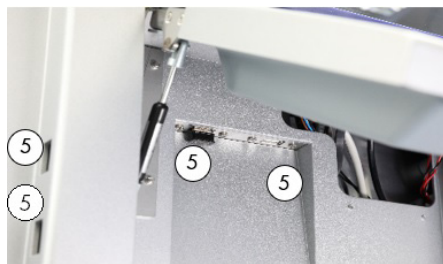
Zatvorte dvierka prístroja QIAcube Connect MDx a zapnite ho pomocou vypínača (pozri obrázok 15, strana 57).

Zaznie zvukový signál a zobrazí sa obrazovka spustenia. Nástroj automaticky vykoná inicializačné testy.





Predný pohľad na prístroj QIAcube Connect MDx



Vysunutá dotyková obrazovka



Zadný pohľad na QIAcube Connect MDx (ľavá strana)



Zadný pohľad na QIAcube Connect MDx (pravá strana)

Obrázok 15: Externé prvky prístroja QIAcube Connect MDx.

- |   |  |
|---|--|
| <p>1 Dotyková obrazovka</p> <p>2 Kryt</p> <p>3 Zásuvka Odpad</p> <p>4 Sieťový vypínač</p> | <p>5 2 USB porty na ľavej strane dotykovej obrazovky; 2 USB porty za dotykovou obrazovkou (Wi-Fi modul zapojený do 1 USB portu)</p> <p>6 Ethernetový port RJ-45</p> <p>7 Zásuvka na napájací kábel</p> <p>8 Výstup chladiaceho vzduchu</p> |
|---|--|

## Dotyková obrazovka

QIAcube Connect MDx sa ovláda pomocou dotykového obrazovky. Dotyková obrazovka umožňuje používateľovi obsluhovať prístroj a prevedie používateľov nastavením pracovného stola. Počas spracovania vzoriek zobrazuje dotyková obrazovka stav protokolu a zostávajúci čas.




Obrázok 16: Vysunutá dotyková obrazovka prístroja QIAcube Connect MDx.


## Inštalácia protokolov na QIAcube Connect MDx

Pred prvým cyklom prípravy RNA na prístrojoch QIAcube Connect MDx môže byť potrebná prvotná inštalácia protokolu. Nainštalujte protokoly „PAXgene Blood RNA Part A“ aj „PAXgene Blood RNA Part B“.

Protokoly pre QIAcube Connect MDx sú k dispozícii na stránke [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) a je potrebné ich stiahnuť na USB kľúč dodaný s prístrojom. Tieto protokoly sa prenesú do prístroja cez USB port.

USB port (ktorý sa nachádza na bočnej strane obrazovky; pozri obrázok 15, strana 57), umožňuje pripojenie zariadenia QIAcube Connect MDx k USB kľúču dodávaného so zariadením. Dátové súbory, ako napríklad súbory denníka alebo súbory správ je možné tiež prenášať cez USB port z prístrojov na USB kľúč.

 USB port je určený len na použitie s USB kľúčom dodaným spoločnosťou QIAGEN. K tomuto portu nepripájajte iné zariadenia.

 USB kľúč nevyberajte počas sťahovania protokolov alebo prenosu dátových súborov alebo počas chodu protokolu.


Ďalšie podrobnosti o procese nahrávania protokolov do QIAcube Connect MDx nájdete v používateľskej príručke prístroja.


## Načítanie QIAcube Connect MDx

Aby ste ušetrili čas, môže načítanie prebehnúť počas jedného alebo obidvoch krokov centrifugácie, ktoré trvajú 10 min (kroky 3 a 5) v „Protokol: Automatizovaná izolácia celkovej RNA z ľudskej plnej krvi odobratej do skúmaviek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)“, strana 31.

### Fľašky na reagentie

Pred každým cyklom na prístroji QIAcube Connect MDx opatrne naplňte 4 fľašky na reagentie reagentiami uvedenými v tabuľke 3 (strana 60) po maximálnu značku hladiny alebo, ak to nie je možné, po hladinu, ktorú umožňujú objemy pufru dodaných v súprave PAXgene Blood RNA Kit. Fľaštičky a uzávery označte názvom pufru a naplnené fľašky na reagentie vložte na príslušné miesta v stojane na fľašky na reagentie. Vložte stojan na pracovný stôl prístroja podľa obrázka (obrázky 17 a 18, strany 60 a 61).

 Dodaný objem pufru Buffer BR2 nie je dostatočný na naplnenie fľašky na reagentie po značku. Pufre Buffer BR3 a BR4 nemusia naplniť fľašku po značku hladiny po spracovaní niekoľkých vzoriek v predchádzajúcich cykloch.

 Dávajte pozor, aby ste z fľašiek odobrali uzávery predtým, ako ich položíte na pracovný stôl.



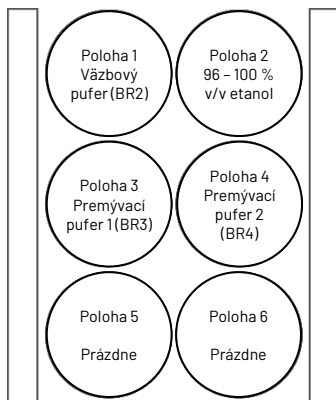
Objemy pufrů v sůprave PAXgene Blood RNA Kit (50) postačujú na maximálne 7 cyklov prípravy RNA na prístroji QIAcube Connect MDx s počtom vzoriek 2 až 12 na jeden cyklus. Vo všeobecnosti by sa malo predísť sériám s malým počtom vzoriek vzhľadom na jednu sériu, aby sa spracovalo celkovo 50 vzoriek v rámci jednej sůpravy. Viac ako 7 cyklov prípravy RNA môže viesť k nedostatočnému objemu pufrů na spracovanie posledných vzoriek.

Tabuľka 3: Polohy v stojane na fľašky na reagencie

Poloha	Reagencia
1	Väzbový pufer (BR2)
2	Etanol (96 – 100 % v/v)
3	Premývací pufer 1 (BR3)
4	Premývací pufer 2 (BR4)*
5	– (ponechajte prázdne)
6	– (ponechajte prázdne)

\* Premývací pufer 2 (BR4) sa dodáva ako koncentrát. Pred prvým použitím pridajte 4 objemy etanolu (96 – 100 % v/v, stupeň čistoty p.a.), ako je uvedené na fľaši, aby ste získali pracovný roztok.

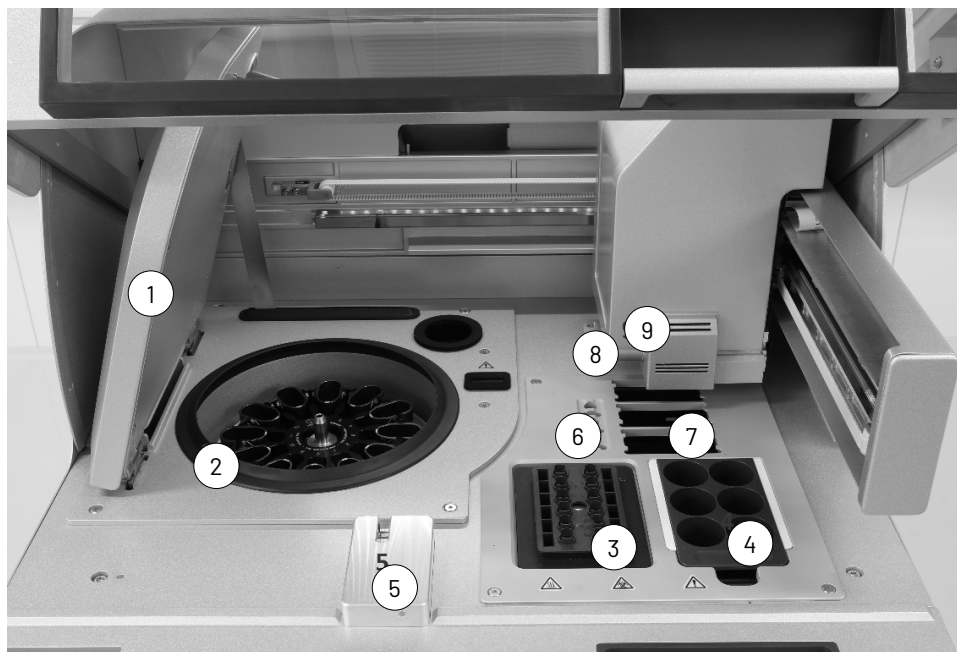
**A**



**B**



Obrazok 17: Naloženie stojana na fľašky na reagencie. **[A]** Schéma polôh a obsahu fľaš v stojane na fľašky na reagencie. **[B]** Naloženie stojanu do prístroja QIAcube Connect MDx.



Obrázok 18: Vnútrotný pohľad na prístroj QIAcube Connect MDx.

- |   |                               |   |   |
|---|-------------------------------|---|---|
| ① | Veko odstredivky              | ⑥ | MCT sloty   |
| ② | Odstredivka                   | ⑦ | 3 sloty na stojany na špičky  |
| ③ | Trepačka                      | ⑧ | Sloty na likvidáciu špičiek a kolón   |
| ④ | Stojan na fľašky na reagentie | ⑨ | Robotické rameno (zahŕňa 1 kanálový pipetovač, unášač, ultrazvukový a optický senzor a UV LED svetlo) |
| ⑤ | Snímač špičky a zámok krytu   |   |   |

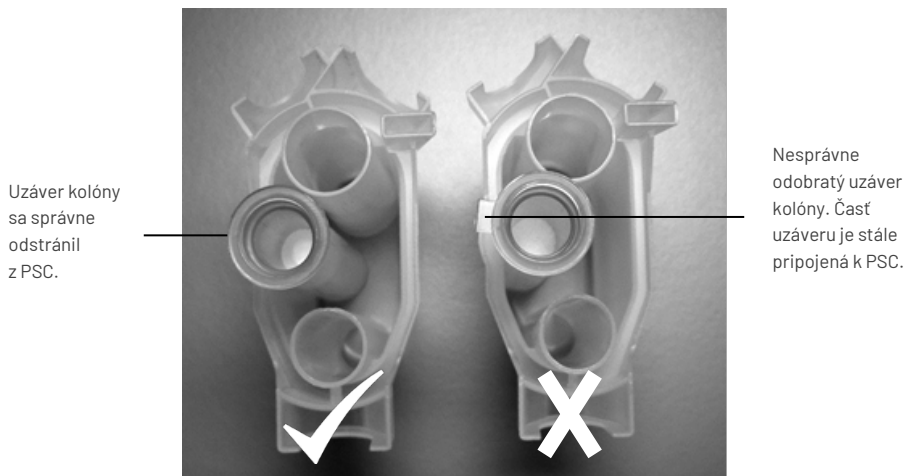
## Spinové kolóny (PSC, PRC), MCT a plastový riad QIAcube Connect MDx

Umiestnite 2 stojany na špičky naplnené filtračnými špičkami 1 000 µl na QIAcube Connect MDx (pozri obrázok 18, strana 61). Stojany v prípade potreby znova naplňte špičkami.

**i** Používajte len filtračné špičky s objemom 1 000 µl navrhnuté na použitie s prístrojmi QIAcube Connect MDx.

Označte adaptéry rotora a MCT pre každú vzorku permanentným perom. Otvorte PSC, ktorý chcete použiť, a nožnicami úplne odstrihnite veko (pozri obrázok 19).

**i** Pre správnu prevádzku robotického chápadla QIAcube Connect MDx úplne odstráňte (odrežte) viečka a všetky plastové časti spájajúce viečko s PSC (pozri obrázok 19). V opačnom prípade robotické chápadlo nemôže PSC správne uchopiť.



**Obrázok 19: Načítanie PSC.** PSC sa vloží do strednej polohy rotorového adaptéra. Pred vložením kolóny odrežte uzáver PSC.

Vložte PSC (bez uzáveru, pozri obrázok 19, strana 62), PRC a označené MCT do príslušných pozícií v každom označenom rotorovom adaptéri, ako je znázornené v tabuľke 4 a na obrázku 20.

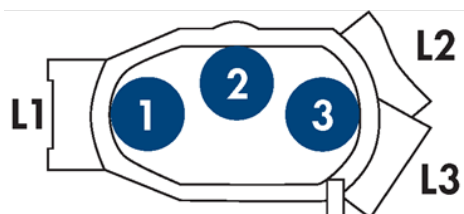


Uistite sa, že uzávery spinovej kolóny (PRC) a skúmavky do mikrocetrifúgy (MCT) sa zatlačia úplne nadol na dno slotov na okraji adaptéra rotora, v opačnom prípade dôjde k prasknutiu uzáveru počas centrifugácie.

Tabuľka 4: Plastový spotrebný materiál v adaptéri rotora

Poloha	Reagencia	Poloha uzáveru
1	Centrifugačná kolóna PAXgene RNA (červená, PRC)	L1
2	Centrifugačná kolóna PAXgene Shredder (fialová, PSC)(uzáver odrezaný pred umiestnením do adaptéra rotora)	–
3	MCT*	L3

\* Použite MCT (1,5 ml), ktoré sú súčasťou súpravy PAXgene Blood RNA Kit.



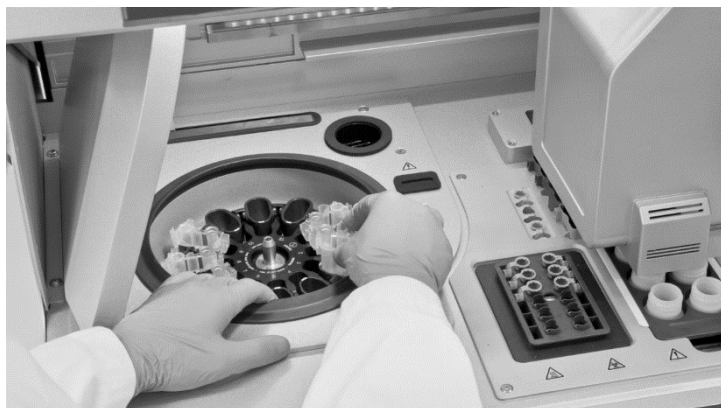
Obrázok 20: Polohy v adaptéri rotora. Adaptér rotora má tri polohy skúmaviek (1 – 3) a polohy uzáverov (L1 – L3).

## Naloženie odstredivky

Zostavené rotorové adaptéry vložte do centrifúgových vedier QIAcube Connect MDx podľa obrázku 21 nižšie.

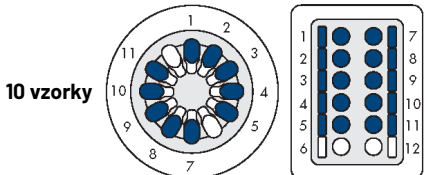
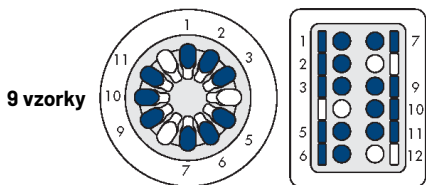
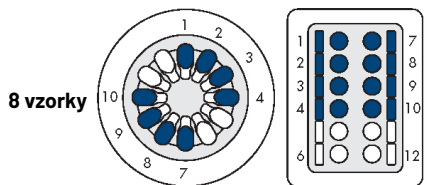
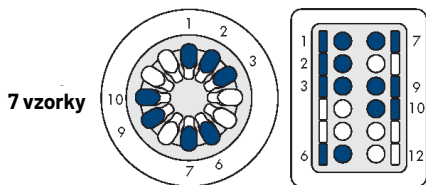
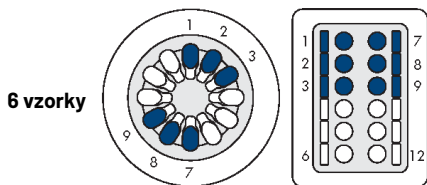
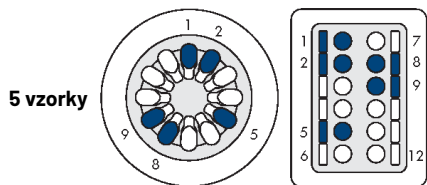
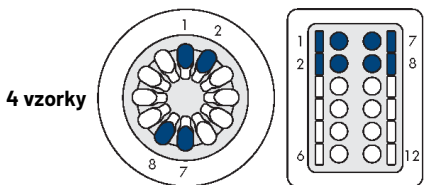
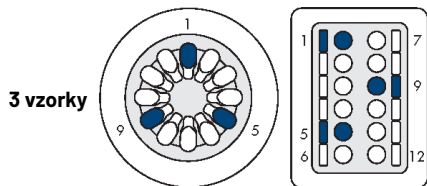
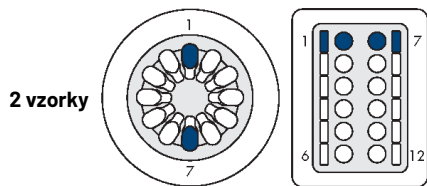


Ak spracúvate menej ako 12 vzoriek, uistite sa, že rotor odstredivky naložíte tak, aby bol radiálne vyvážený (pozri obrázok 22, strana 65). Všetky rotory centrifúgy sa musia namontovať pred spustením cyklu protokolu, dokonca aj keď sa spracuje menej ako 12 vzoriek. Nie je možné spracovať jedinú (jednu) vzorku alebo 11 vzoriek.



Obrázok 21: Načítanie centrifúgy na QIAcube Connect MDx. Kompletné adaptéry rotora vložte do rotorov odstredivky.





**Obrázok 22: Naloženie odstredivky a trepačky.** Sú zobrazené polohy v centrifúge a trepačke na spracovanie od dvoch (2) do desiatich (10) vzoriek. Nie je možné spracovať jednu (1) vzorku alebo 11 vzoriek. Na spracovanie 12 vzoriek musia byť všetky pozície v centrifúge a trepačke naložené (obrázok nie je zobrazený).

## Skúmavky na spracovanie

Odstráňte všetky PT, ktoré zostali v slotoch MCT z predchádzajúcich cyklov (pozri obrázok 18, strana 61). Naplňte 3 skúmavky na spracovanie PT množstvom reagencií, ktoré je uvedené v tabuľke 5 podľa počtu vzoriek v cykle.

Na prípravu inkubačnej zmesi DNázy I napipetujte uvedený objem digestívneho pufru (RDD) DNA do skúmavky na spracovanie PT a pridajte uvedený objem zásobného roztoku DNázy I (RNFD). Jemne zmiešajte pipetovaním celej zmesi nahor a nadol 3-krát pomocou špičky pipety s objemom 1 000 µl.



Použite 2 ml PT, ktoré sú súčasťou súpravy PAXgene Blood RNA Kit. Skúmavky viditeľne označte názvom reagencie a umiestnite ich do príslušnej polohy v MCT slotoch, podľa tabuľky 6 (strana 67).



DNáza I (RNFD) je mimoriadne citlivá na fyzickú denaturáciu. Zmiešajte len pipetovaním, použite špičky pipety so širokým otvorom, aby ste znížili deformáciu bočným tlakom. Nemiešajte vo vortexe.

Napipetujte len potrebný objem podľa tabuľky 5 nižšie.

**Tabuľka 5: Objem reagencií potrebný v PT pre MCT sloty**

Počet vzoriek	Objem reagencie pre uvedený počet vzoriek (µl)		
	Proteináza K (PK)	Inkubačná zmes DNázy I	Elučný pufer (BR5)
2	126	187 (23 DNase I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNase I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNase I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNase I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNase I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNase I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNase I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNase I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNase I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNase I + 806 Buffer RDD)	1177

**Tabuľka 6: MCT sloty**

	Poloha		
	A	B	C
Obsah	Proteináza K	Inkubačná zmes DNázy I	Elučný pufer (BR5)
Nádoba	Skúmavka na spracovanie*	Skúmavka na spracovanie*	Skúmavka na spracovanie*

\* Použite 2 ml PT, ktoré sú súčasťou súpravy PAXgene Blood RNA Kit.

# Likvidácia

Informácie o bezpečnej likvidácii po odbere vzorky a manuálnej izolácii RNA nájdete v bezpečnostných informáciách a preventívnych opatreniach na stranách 18 a 19.

Okrem toho, pokiaľ ide o automatizovanú izoláciu RNA pomocou QIAcube Connect MDx, pozrite si obrázky 21 a 22, strany 64 a 65, označenie vyhradených otvorov na použité špičky a kolóny na likvidáciu.

## Referenčná literatúra

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.

# Spríevodca riešením problémov

Tento spríevodca riešením problémov môže byť užitočný pri riešení akýchkoľvek problémov, ktoré môžu nastať. Viac informácií nájdete na stránke často kladených otázok v našom stredisku technickej podpory: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Vedci v technických službách QIAGEN vám vždy radi zodpovedajú všetky otázky týkajúce sa informácií a protokolov v tejto príručke alebo technológií vzoriek a testov (kontaktné informácie nájdete na poslednej strane alebo na stránke [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

Komentáre a návrhy	
<b>Degradovaná RNA</b>	
a) Kontaminácia RNázy	 Dávajte pozor, aby ste do reagencií počas procesu alebo neskoršie manipulácie nezaviedli RNázu (pozri prílohu A, strana 75).
<b>Nízky výťažok RNA</b>	
b) Menej ako 2,5 ml krvi odobranej v skúmavke PAXgene Blood RNA Tube (BRT)	 Zaistite, aby sa do skúmavky PAXgene Blood RNA Tube odobralo 2,5 ml krvi (BRT; pozri príručku ku skúmavke PAXgene Blood RNA Tube).
c) Koncentrácia RNA nameraná vo vode	 RNA sa musí zriediť v pufrí 10 mM Tris-HCl, pH 7,5*, aby sa dosiahla presná kvantifikácia (pozri prílohu B, strana 76).
d) Bunkové zvyšky prenesené do PRC v krokoch 9 a 10 manuálneho protokolu	 Pri pipetovaní supernatantu v kroku 7 manuálneho protokolu zabráňte prenosu veľkých častíc (prenos malého množstva zvyškov buniek a ich organel protokol neovplyvní).
e) V kroku 3 nedošlo k úplnému odstráneniu supernatantu	 Zaistite, aby sa odstránil celý supernatant. Ak sa supernatant vyleje, utrite z okraja skúmavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kvapky poklepaním papierovou utierkou po okraji skúmavky. Prijmite potrebné preventívne opatrenia, aby ste zabránili krížovej kontaminácii.
f) Po odbere do skúmavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) sa krv inkubuje na kratšie ako 2 hodiny	 Po odbere inkubujte krv v skúmavke PAXgene Blood RNA Tube (BRT) na minimálne 2 hodiny.




\* Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

Komentáre a návrhy	
<b>Nízka hodnota <math>A_{260}/A_{280}</math></b>	
g) Voda použitá na riedenie RNA na meranie $A_{260}/A_{280}$	 <p>Na riedenie RNA pred meraním čistoty použite pufer 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* (pozri prílohu B, strana 76).</p>
h) Spektrofotometer nie je riadne vynulovaný	 <p>Spektrofotometer vynulujte pomocou prázdnej vzorky, ktorá sa skladá z rovnakého pomeru elučného pufru (BR5) a pufru 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 ako vo vzorkách, ktoré sa majú merať. Elučný pufer (BR5) má vysokú absorbanciu na hodnote 220 nm, ktorá môže viesť k vysokým základným úrovniam absorbancie, ak sa spektrofotometer poriadne nevynuluje.</p>
<b>Porucha prístroja</b>	
i) QIAcube Connect MDx nepracuje správne	Prečítajte si <i>používateľskú príručku prístroja QIAcube Connect MDx</i> a mimoriadnu pozornosť venujte časti Riešenie problémov. Zabezpečte riadnu údržbu prístroja podľa pokynov v používateľskej príručke tohto prístroja.

\* 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.

# Symboly

Nasledujúce symboly sa môžu objaviť v návode na použitie alebo na balení a štítkoch. Ďalšie symboly sú vysvetlené v Obsah súpravy (strana 6).

Symbol	Definícia symbolu
V<N1>	Verzia <N1> produktu
 <N2>	Obsahuje dostatočné množstvo reagensí pre testy <N2>
	Prečítajte si návod na použitie
	Použite do
<b>IVD</b>	Zdravotnícke diagnostické zariadenie na použitie v podmienkach in vitro
<b>REF</b>	Katalógové číslo
<b>LOT</b>	Číslo šarže
<b>MAT</b>	Číslo materiálu
<b>COMP</b>	Komponenty
<b>NUM</b>	Číslo
<b>KU</b>	Jednotky Kunitz
<b>ADD</b>	Pridávanie
<b>CONT</b>	Obsahuje
<b>RCNS</b>	Pripravené pomocou vody



**DNase**

Deoxyribonukleáza I

**EtOH**

Etanol

**GITC**

Guanidín izotiokyanát

**RNase-Free DNase Set**

Súprava DNázy bez RNázy

**GTIN**

Identifikátor GTIN (Global Trade Item Number)



Teplotné obmedzenia



Horný limit teploty



Výrobca

**EC REP**

Európsky splnomocnený zástupca podľa nariadenia (EÚ) 2017/746



Dôležitá poznámka



Pridanie etanolu



CE značka. Tento výrobok spĺňa požiadavky nariadenia (EÚ) 2017/746 o diagnostických zdravotníckych pomôckach in vitro.

**UDI**

Jedinečný identifikátor zariadenia



Upozornenie



VAROVANIE: Horúci povrch

# Kontaktné informácie

V spoločnosti QIAGEN sme hrdí na kvalitu a dostupnosť našej technickej podpory. Na našich oddeleniach technického servisu pracujú skúsení vedci s rozsiahlymi praktickými a teoretickými poznatkami v oblasti molekulárnej biológie a používania výrobkov od spoločnosti PreAnalytiX. V prípade akýchkoľvek otázok týkajúcich sa súpravy PAXgene Blood RNA Kit nás neváhajte kontaktovať.

Technickú pomoc a ďalšie informácie získate v centre technickej podpory na adrese **[www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support)** alebo na telefónnom čísle 00800-22-44-6000, alebo kontaktujte niektoré z oddelení technickej podpory spoločnosti QIAGEN (pozrite zadnú stranu alebo navštívte lokalitu **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**).

# Príloha A: Všeobecné poznámky k manipulácii s RNA

## Manipulácia s RNA



Ribonukleázy (RNázy) sú veľmi stabilné a aktívne enzýmy, ktoré spravidla nevyžadujú fungovanie kofaktorov. Keďže RNázy sa ťažko inaktivujú a na degradáciu RNA stačia aj nepatrné množstvá, nepoužívajte žiadny plastový alebo sklenený riad bez toho, aby ste najprv odstránili možnú kontamináciu RNázami. Je potrebné venovať veľkú pozornosť tomu, aby sa počas postupu izolácie alebo po ňom do vzorky RNA neúmyselne nevniesli RNázy. Na vytvorenie a udržanie prostredia bez RNáz je potrebné prijať preventívne opatrenia počas predbežnej úpravy a používania nejednorazových a jednorazových nádob a roztokov pri práci s RNA.

## Všeobecná manipulácia



Počas práce s RNA by ste mali vždy používať správnu mikrobiologickú aseptickú techniku. Na rukách a v prachových časticiach sa nachádzajú baktérie a plesne a sú najčastejšími zdrojmi kontaminácie RNázy. Pri manipulácii s reagensiami a vzorkami RNA vždy noste latexové alebo vinylové rukavice, aby ste predišli kontaminácii RNázy povrchom pokožky alebo prašným laboratórnym vybavením. Rukavice si často meňte a skúmavky držte zatvorené vždy, keď je to možné. Keď pipetujete alikvóty do následných aplikácií, majte purifikovanú RNA na ľade.

Protokoly na odstránenie kontaminácie RNázy zo skleneného vybavenia a roztokov nájdete vo všeobecných molekulárnych biologických odporúčaniach, ako napríklad Sambrook, J. a Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

# Príloha B: Kvantifikácia a určenie kvality celkovej RNA

## Kvantifikácia RNA

Koncentrácia RNA by sa mala určiť meraním absorpcie pri 260 nm ( $A_{260}$ ) v spektrofotometri. Na zaistenie významnosti by mali byť údaje v lineárnom rozsahu spektrofotometra. Absorbancia 1 jednotky pri 260 nm zodpovedá 44  $\mu\text{g}$  RNA na ml ( $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ ). Tento vzťah platí len pre merania v pufrí 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.\* Ak je preto potrebné vzorku RNA zriediť, mala by sa zriediť v pufrí 10 mM Tris-HCl. Ako je uvedené nižšie (pozri „Čistota RNA“, strana 77), udáva pomer medzi hodnotami absorpcie na 260 a 280 nm odhadovanú čistotu RNA. Pri meraní vzoriek RNA sa uistite, že sú kvety bez RNázy. Spektrofotometer vynulujte pomocou prázdnej vzorky, ktorá sa skladá z rovnakého pomeru elučného pufru (BR5) a pufru Tris-HCl ako vo vzorkách, ktoré sa majú merať. Elučný pufer (BR5) má vysokú absorpciu na hodnote 220 nm, ktorá môže viesť k vysokým základným úrovniam absorpcie, ak sa spektrofotometer poriadne nevynuluje. Příklad výpočtu použitého pri kvantifikácii RNA je zobrazený nižšie.

Objem vzorky RNA	=	80 $\mu\text{l}$
Riedenie (1/15)	=	10 $\mu\text{l}$ vzorky RNA + 140 $\mu\text{l}$ 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Zmerajte absorpciu riedenej vzorky v kvete (bez RNázy).		
$A_{260}$	=	0,3
Koncentrácia vzorky	=	$44 \times A_{260} \times \text{faktor riedenia}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 $\mu\text{g/ml}$
Celkový výťažok	=	koncentrácia $\times$ objem vzorky v mililitroch
	=	198 $\mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml}$
	=	15,8 $\mu\text{g}$ RNA

\* Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

## Čistota RNA

Pomer údajov pri 260 a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) poskytuje odhad čistoty RNA s ohľadom na kontaminanty, ktoré absorbujú UV, ako napríklad proteín. Pomer  $A_{260}/A_{280}$  je ale výrazne ovplyvnený hodnotou pH. Nižšie pH má za následok nižší pomer  $A_{260}/A_{280}$  a zníženie senzitivity na kontamináciu proteínu.\* Na dosiahnutie presných hodnôt odporúčame zmerať absorbanciu v pufrí 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Čistá RNA má pomer  $A_{260}/A_{280}$  na úrovni 1,8 – 2,2 v pufrí 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Spektrofotometer vynulujte pomocou prázdnej vzorky, ktorá sa skladá z rovnakého pomeru elučného pufru (BR5) a pufru Tris-HCl ako vo vzorkách, ktoré sa majú merať. Elučný pufer (BR5) má vysokú absorbanciu na hodnote 220 nm, ktorá môže viesť k vysokým základným úrovniam absorbancie, ak sa spektrofotometer poriadne nevynuluje.

\* 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.

## Príloha C: Manipulácia so skúmavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Tieto odporúčania od spoločnosti BD môžu byť užitočné pri manipulácii so skúmavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Pozri *príručku pre skúmavku PAXgene Blood RNA Tube* s ďalšími informáciami o skúmavkách PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

### Pokyny na odobratie uzáveru BD Hemogard Closure

1. Zoberte skúmavku PAXgene Blood RNA Tube (BRT) do jednej ruky, pričom palec položíte pod uzáver BD Hemogard. (Ruku položte na pevný podklad, aby ste dosiahli lepšiu stabilitu) Druhou rukou otočte uzáver BD Hemogard a súčasne zatlačte palcom druhej ruky nahor len kým sa zátka hadičky neuvoľní.
2. Pred zdvihnutím uzáveru dajte palec preč. Nepoužívajte palec na vytlačte uzáveru skúmavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Upozornenie: Ak je v skúmavke PAXgene Blood RNA Tube (BRT) krv, vzniká riziko expozície. Aby ste pomohli predchádzať zraneniam počas odoberania uzáveru, je dôležité, aby sa palec, ktorým sa uzáver vytlačil nahor, nedostal do kontaktu so skúmavkou PAXgene Blood RNA Tube (BRT) po uvoľnení uzáveru BD Hemogard.
3. Zdvihnite uzáver skúmavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT).  
V nepravdepodobnom prípade, že sa plastový štít oddelí od gumovej zátky sa nesnažte uzáver znova zmontovať. Opatrne odoberte plastovú zátku zo skúmavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

## Pokyny na zasunutie sekundárneho uzáveru Secondary BD Hemogard Closure

1. Vymeňte uzáver skúmavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Otočte ho a silno zatlačte nadol, kým nie je zarážka znova na svojom mieste. Úplné zasunutie zátky je nevyhnutné pre to, aby bol uzáver bezpečne umiestnený na skúmavke PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

## Informácie o objednávaní

Produkt	Obsah	Kat. č.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 centrifugačných kolón PAXgene Spin Column, 50 centrifugačných kolón Shredder Spin Column, DNáza I bez RNázy, reagensie a pufre bez RNázy. Na použitie spolu so skúmavkami PAXgene Blood RNA Tube	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 skúmaviek na odber krvi	762165
<b>Súvisiace produkty, ktoré si môžete objednať od spoločnosti QIAGEN na automatizovanú izoláciu RNA na QIAcube</b>		
Starter Pack, QIAcube	Balík obsahuje: stojany na fľašky na reagensie (3), označovanie pásky stojana (8), filtračné špičky s objemom 200 µl (1024), filtračné špičky s objemom 1 000 µl (1024), filtračné špičky so širokým otvorom s objemom 1 000 µl (1024), fľašky na reagensie s objemom 30 ml (18), adaptéri rotora (240), držiak adaptéra rotora	990395
Filter-Tips, 1000 µL (1024)	Sterilné jednorazové filtračné špičky, v stojane	990352
Reagent Bottles, 30 mL (6)	Fľašky na reagensie (30 ml) s uzávermi, balenie po 6, na použitie so stojanom na fľašky na reagensie QIAcube Reagent Bottle Rack	990393
Rotor Adapters (10 × 24)	Na 240 preparátov: 240 jednorazových adaptérov rotora, na použitie s QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Stojan na uloženie 6 × 30 ml fľašiek na reagensie na pracovnom stole QIAcube	9026197
Rotor Adapter Holder	Držiak na 12 jednorazových adaptérov rotora, na použitie s QIAcube	990392



Produkt	Obsah	Kat. č.
<b>Súvisiace produkty, ktoré si môžete objednať od spoločnosti BD na odber krvi so skúmavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)*</b>		
BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set	21G, ihla 0,8 × 19 mm, hadička s dĺžkou 305 mm s adaptérom luer; 50 v boxe, 200 v obale	367286/367281
BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set	21G, ihla 0,8 × 19 mm, hadička s dĺžkou 305 mm s adaptérom luer. 50/box, 200/sada	367344
BD Vacutainer One-Use Holder	Obal len na priemer 13 mm a 16 mm; 1 000/obal	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 × 75 mm 4,0 ml s červeným uzáverom BD Hemogard a papierovým štítkom; 100/box, 1 000/sada	368975/367812
BD Vacutainer EST Tube	13 × 75 mm 3,0 ml s priehľadným uzáverom BD Hemogard a priehľadným štítkom; 100/box, 1 000/sada	362725
BD Vacutainer No Additive (Z) Tube	13 × 75 mm 3,0 ml s priehľadným uzáverom BD Hemogard a papierovým štítkom; 100/box, 1 000/sada	366703

\* Toto príslušenstvo na odber krvi predstavuje bežné výrobky, ktoré sa môžu použiť so skúmavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Viac informácií o tomto príslušenstve, vrátane spôsobu objednávky, nájdete na adrese [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

# História revízie dokumentu

Dátum	Zmeny
[R1], apríl 2022	Počiatočné vydanie IVDR
[R2], február 2023	Ulica spoločnosti PreAnalytiX GmbH zmenená z ulica „Feldbachstrasse“ na „Garstligweg 8“: Boli pridané výrobky BD do Informácií o objednávaní. Boli aktualizované Bezpečnostné informácie.

## Poznámky



Aktuálne licenčné informácie a právne informácie týkajúce sa produktu nájdete v sprievodcovi alebo používateľskej príručke k súprave PreAnalytiX alebo QIAGEN. Príručky k súpravám a používateľské príručky k súpravám PreAnalytiX a QIAGEN nájdete na lokalitách [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) a [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) alebo o ne môžete požiadať oddelenie technických služieb spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

**Better samples  
More to explore**

 **PreAnalytiX**  
A QIAGEN / BD Company

Viac informácií nájdete na: [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)

HB-3009-002 02/2023

Objednávky [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Technická podpora [www.support.qiagen.com](http://www.support.qiagen.com) | Webová lokalita [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) alebo [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)