

2023. február

# PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA Kit (kézikönyv) Használati utasítás



3. verzió (V3)

IVD

In vitro diagnosztikai használatra



REF

762174



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

Gyártotta a QIAGEN GmbH<sup>®</sup> a PreAnalytiX GmbH részére

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NÉMETORSZÁG

R2

MAT

1130774HU

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

PreAnalytiX GmbH, 8634 Hombrechtikon, CH.

© 2023 PreAnalytiX GmbH. Ha azt másképp nem jelöljük, a PreAnalytiX, a PreAnalytiX logó és minden más védjegy a PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH tulajdonát képezi.

### Korlátozott licencszerződés a PAXgene Blood RNA Kit használatához

A termék használatával a termék vásárlója vagy felhasználója elfogadja a következő feltételeket:

1. A terméket kizárólag a hozzá tartozó protokollok és a jelen kézikönyv szerint, valamint a panelhez tartozó összetevőkkel együtt szabad használni. A PreAnalytiX® a szellemi tulajdonát képező termékek egyikének esetében sem engedélyezi, hogy a panelhez tartozó komponenseket a termékhez mellékelt protokollokban, a jelen kézikönyvben és a [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) és a [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) webhelyen elérhető további protokollokban leírtak kivételével más, nem a panelhez tartozó komponensekbe beépítsék vagy azokkal együtt használják.
2. A kifejezett licencceken kívül a PreAnalytiX nem vállal garanciát arra, hogy a kit és/vagy használata nem sérti harmadik fél jogait.
3. A kit licence csak egyszeri használatra jogosít; újrafelhasználása, felújítása vagy újraértékesítése tilos.
4. A PreAnalytiX a kifejezett licencceken kívül különösen kizár minden más konkrét vagy vélelmezett jogot.
5. A kit vásárlója és felhasználója elfogadja, hogy semmilyen olyan lépést nem tesz, és másnak sem engedélyezi semmilyen olyan lépés megtételét, amely a fentiekben előírtak megszegéséhez vezet vagy azt elősegíti.
6. A PreAnalytiX jogosult a jelen korlátozott licencszerződésben foglalt tilalmak bármely bíróságon keresztüli érvényesítésére és a korlátozott licencre vonatkozó jelen szerződés vagy a kittel és/vagy összetevőivel kapcsolatos bármilyen szellemi tulajdonjog érvényesítése céljából indított peres eljárással kapcsolatban felmerülő összes vizsgálati és perköltség követelésére, beleértve az ügyvédi költségeket is.

A legfrissebb licencfeltételekért látogasson el a [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) és a [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) webhelyre.

HB-3009-002 BD-8945 1130774HU © 2023 PreAnalytiX GmbH, minden jog fenntartva.

## PreAnalytiX forgalmazók

A PreAnalytiX termékek gyártását és forgalmazását a QIAGEN és a BD vállalat végzi a PreAnalytiX részére.

# Tartalom

Tartalom .....	3
Alkalmazási terület .....	6
Felhasználói célcsoport .....	6
Leírás és működési elv .....	7
Bevezetés .....	7
Alapelvek és eljárás .....	7
Mintavétel és -stabilizálás .....	8
RNS-izolálás .....	8
Manuális RNS-izolálás .....	9
Automatizált RNS-izolálás .....	11
Szállított anyagok .....	14
A kit tartalma .....	14
A kit összetevői .....	15
Szükséges, de nem biztosított anyagok .....	16
Mindkét protokollhoz szükséges .....	16
A manuális protokollhoz szükséges .....	16
Az automatizált protokollhoz szükséges .....	17
Figyelmeztetések és óvintézkedések .....	18
Biztonsági információk .....	18
Vészhelyzeti információk .....	18
Óvintézkedések .....	19

A reagensek tárolása és kezelése .....	22
Felbontás utáni stabilitás .....	22
Mintavétel, -tárolás és -kezelés .....	23
Protokoll: Teljes RNS manuális izolálása PAXgene Blood RNA Tubes mintacsövekbe gyűjtött humán teljes vérből .....	24
Protokoll: Teljes RNS automatizált izolálása PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekbe gyűjtött humán teljes vérből .....	32
A termék használatának korlátai .....	40
Minőség-ellenőrzés .....	40
Teljesítményjellemzők .....	41
Mintavétel és -stabilizálás .....	41
Manuális RNS-izolálás .....	46
Automatizált RNS-izolálás .....	54
Az izolált RNS stabilitása .....	57
Fontos megjegyzések.....	58
A QIAcube Connect MDx készülék használata .....	58
A QIAcube Connect MDx készülék elindítása .....	58
Protokollok telepítése a QIAcube Connect MDx készülékre .....	60
A QIAcube Connect MDx készülék betöltése .....	61
Spin oszlopok (PSC, PRC), MCT és QIAcube Connect MDx műanyag eszközök .....	64
Ártalmatlanítás.....	70
Irodalomjegyzék .....	71
Hibaelhárítási útmutató .....	72
Szimbólumok .....	74

Kapcsolatfelvételi adatok .....	76
„A” függelék: Általános megjegyzések az RNS kezeléséről .....	77
„B” függelék: A teljes RNS mennyiségi és minőségi meghatározása .....	78
„C” függelék: A PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek kezelése .....	80
Rendelési információk .....	82
Dokumentum átdolgozási előzményei .....	84

# Alkalmazási terület

In vitro diagnosztikai használatra.

A PAXgene Blood RNA System egy vérvételi csőből (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) és nukleinsav-tisztító kitből (PAXgene Blood RNA Kit) áll. Lehetővé teszi a vér zárt csőben történő gyűjtését, tárolását és szállítását, az intracelluláris RNS stabilizálását, majd az eredeti RNS teljes vérből történő, molekuláris diagnosztikai vizsgálatok során végzett RT-PCR eljáráshoz szükséges izolálását és tisztítását.

A PAXgene Blood RNA System teljesítményjellemzőit csak FOS és IL1B gének transzkriptjeivel állapították meg. A felhasználó felelős a PAXgene Blood RNA System megfelelő teljesítményjellemzőinek megállapításáért más célgének transzkriptjei esetében.

## Rendeltetés

A PAXgene Blood RNA Kit a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsövekbe gyűjtött teljes vérből az intracelluláris RNS tisztítására szolgál. Amikor a kitet a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsövekkel együtt használják, a rendszer a teljesvérmintából tisztított intracelluláris RNS-t biztosít a molekuláris diagnosztikai vizsgálatok során használt RT-PCR-hez.

## Felhasználói célcsoport

A terméket csak az in vitro diagnosztikai eljárásokban képzett szakemberek, pl. szaktechnikusok és orvosok használhatják.

A kit szakemberek általi használatra készült.

# Leírás és működési elv

## Bevezetés

A celluláris RNS tanulmányozásához használt számos molekuláris assay első lépése a teljes vér gyűjtése. Az ilyen kísérleteknél azonban komoly probléma a celluláris RNS profil in vitro instabilitása. A PreAnalytiX által elvégzett vizsgálatok kimutatták, hogy az egyedi mRNS fajták kópiaszáma a teljes vérben több mint 1000-szeresen változhat szoba-hőmérsékletű tárolás vagy szállítás során (Rainen és mtsai., 2002). Ennek oka egyrészt a gyors RNS-lebomlás, másrészt bizonyos gének indukált expressziója a vérvételt követően. Az RNS expressziós profiljának ilyen mértékű változások lehetetlenné teszik a génexpresszió megbízható vizsgálatát. Ezért elengedhetetlen egy olyan módszer használata a humán teljes vérben a génexpresszió pontos analiziséhez, amely megőrzi az RNS expressziós profilt vérvétel közben és után is.

## Alapelvek és eljárás

A PreAnalytiX kifejlesztett egy rendszert, amely lehetővé teszi a humán teljesvérminták gyűjtését, stabilizálását, tárolását és szállítását, valamint gyors és hatékony protokollt biztosít az intracelluláris RNS izolálására. Ez a rendszer megkívánja a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek használatát a vérvételhez és az RNS stabilizálásához, amelyet manuális vagy automatizált RNS-izolálás követ a PAXgene Blood RNA Kit segítségével. A manuális és automatizált protokoll alapján véve azonos teljesítményt nyújt a kinyert RNS minőségét és hozamát illetően. A manuális protokoll (kezdet: 46. oldal) és az automatizált protokoll (kezdet: 54. oldal) teljesítményadatai megtalálhatók a jelen kézikönyvben.

A PAXgene Blood RNA System lehetővé teszi a preanalitikus munkafolyamat-lépések standardizálását, a vérmintavételtől a sejt RNS izolálásáig az „ISO 20186-1:2019, Molekuláris in vitro diagnosztikai vizsgálatok. Teljes vénás vérre vonatkozó elővizsgálati folyamatok előírásai. 1. rész: Izolált celluláris RNS” szabványnak megfelelően.

## Mintavétel és -stabilizálás

A PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek egy szabadalmazott RNS-stabilizálási reagenst tartalmaznak. Ez az adalékanyag megvédi az RNS molekulákat az RNázok általi lebomlástól, és minimalizálja a génexpresszió ex vivo változásait. A PAXgene Blood RNA System teljesítményjellemzőit a FOS és IL1B gének transzkriptjeivel állapították meg. Ezek a 41. oldaltól kezdve tekinthetők meg.

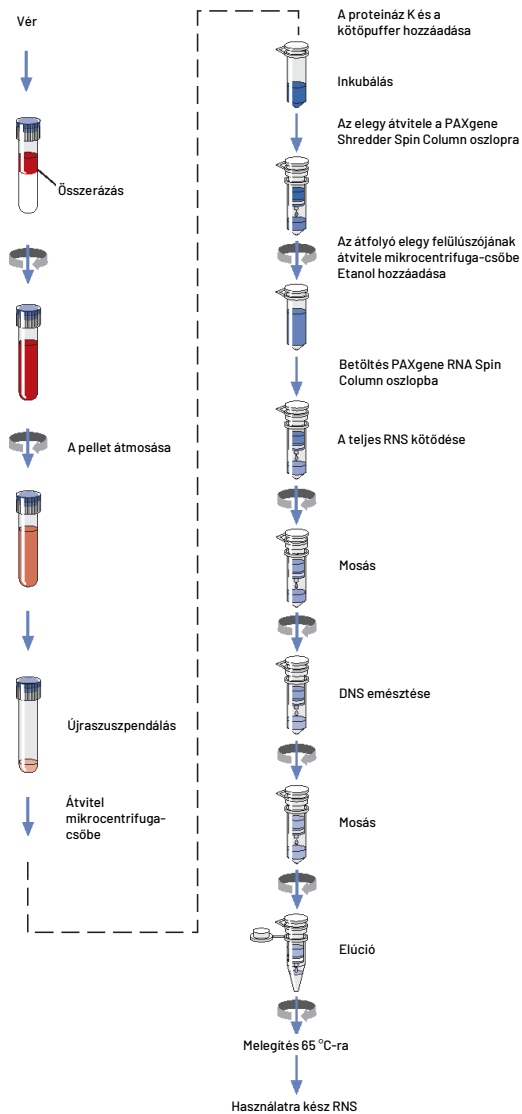
## RNS-izolálás

A PAXgene Blood RNA Kit a teljes RNS, PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsőbe gyűjtött 2,5 ml humán teljes vérből történő izolálására szolgál. Az eljárás egyszerű, és manuális vagy automatizált módon is kivitelezhető (lásd 1. ábra, 10. oldal vagy 3. ábra, 12. oldal). Az izolálási eljárás mindkét protokoll esetében egy centrifugálási lépéssel kezdődik, amely pelletet képez a nukleinsavakból a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsőben. A pellet mosását és újraszuszpendálását manuális vagy automatizált RNS-izolálás követi. Az alapelveket tekintve mindkét protokoll ugyanazokat a lépéseket követi, ugyanazokat a kiegészítőket felhasználva.



## Manuális RNS-izolálás

Az újraszuszpendált pelletet optimalizált pufferekben inkubálják proteináz K (PK) jelenlétében, hogy végbemenjen a protein megemésztése. Egy további centrifugálási lépés a PAXgene Shredder spin oszlopon (PSC) át homogenizálja a sejtlizátumot, és eltávolítja a maradék sejttörmelékét, az átfolyó frakció felülúszója pedig ezután átkerül egy új mikrocentrifuga-csőbe (microcentrifuge tube, MCT). Ehhez etanolt adnak, hogy beállítsák a kötődési feltételeket, és a lizátumot egy PAXgene RNA spin Column oszlopra (PRC) viszik. A rövid centrifugálás során az RNS szelektíven rákötődik a PAXgene szilikamembránra, miközben a szennyező anyagok áthatolnak rajta. A maradék szennyező anyagokat több hatékony mosási lépéssel távolítják el. Az első és második mosási lépés között a membránt DNáz I (RNFD) reagenssel kezelik, hogy eltávolítsák a nyomnyi mennyiségben odakötődött DNS-t. A mosási lépések után az RNS-t az eluáló pufferben (BR5) eluálják, és hődenaturálják. A PAXgene Blood RNA System segítségével végzett manuális RNS-izolálás teljesítményjellemzői a 46. oldalon tekinthetők meg.



1. ábra: A manuális PAXgene Blood RNA eljárás.

## Automatizált RNS-izolálás

A vér-RNS izolálása automatikusan történik a QIAGEN QIAcube Connect MDx készüléken. Ez az innovatív készülék fejlett technológiát alkalmaz a QIAGEN spin oszlopok feldolgozása során, ami lehetővé teszi a kis mintaszámon végzett automatizált minta-előkészítés zökkenőmentes beillesztését a laboratóriumi munkafolyamatba. QIAcube Connect MDx készülék alkalmazása esetén a minta-előkészítés lépései megegyeznek a manuális eljárás során alkalmazott lépésekkel (azaz lízálás, kötés, mosás és eluálás), és ugyanúgy a PAXgene Blood RNA Kit segítségével végezhető el.

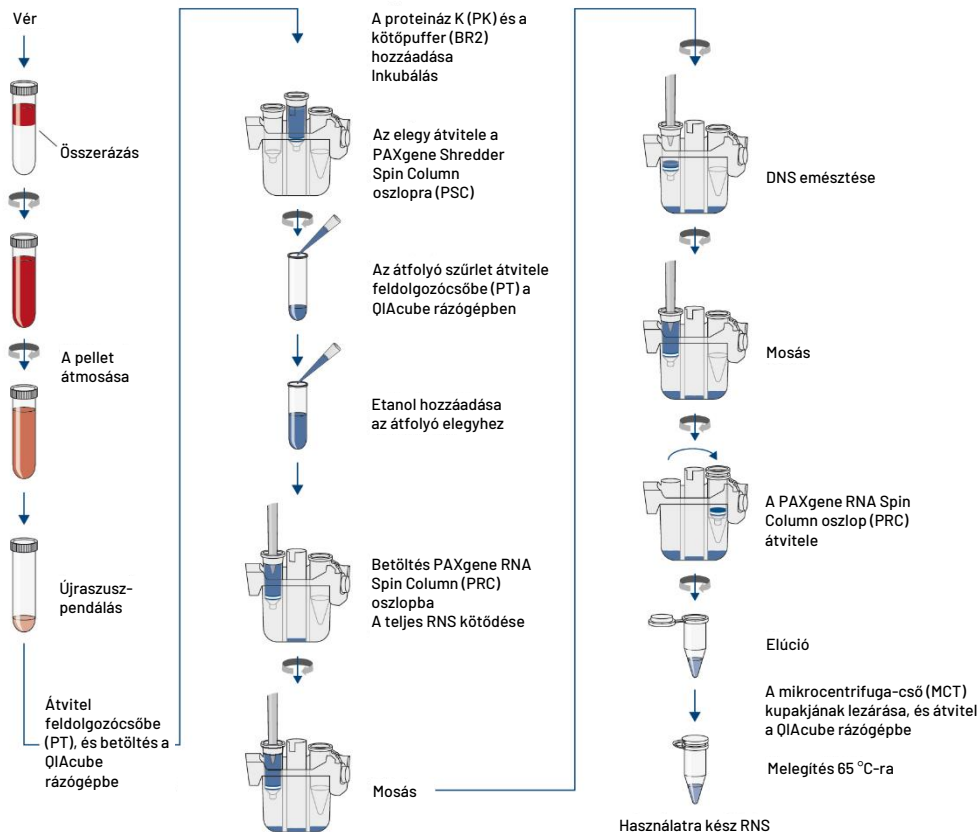


2. ábra: QIAcube Connect MDx.



A QIAGEN QIAcube Connect MDx készülék nem kapható minden országban. További részletekért lépjen kapcsolatba a QIAGEN műszaki ügyfélszolgálatával.

Az automatizált RNS-izolációs protokoll 2 részből (vagy protokollból) áll, a „PAXgene Blood RNA Part A” (a PAXgene Blood RNA Tube mintacsóban levő vértől az eluálásig) és a „PAXgene Blood RNA Part B” részből (eluálás után a használatra kész RNS-ig), és a 2 rész között rövid manuális beavatkozás szükséges (lásd 3. ábra).




3. ábra: Az automatizált PAXgene Blood RNA eljárás.

A lecentrifugált, mosott és újraszuszpendált nukleinsavpelletet (lásd „RNS-izolálás”, 8. oldal) átviszik a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsőből feldolgozócsövekbe (Processing Tube, PT), amelyeket a QIAcube Connect MDx készülék munkaasztalán elhelyezkedő rázótermosztát-egységbe helyeznek be. A kezelő kiválasztja és elindítja a „PAXgene Blood RNA Part A” (PAXgene Blood RNA „A” rész) protokollt a menüből. A QIAcube Connect MDx készülék végrehajtja a protokoll lépéseit egészen az RNS eluáló pufferben való (BR5) eluálásáig. A kezelő átrakja a tisztított RNS-t tartalmazó mikrocentrifuga-csőveket (microcentrifuge tube, MCT) a QIAcube Connect MDx készülék rázótermosztát-egységébe. A kezelő kiválasztja és elindítja a „PAXgene Blood RNA Part B” (PAXgene Blood RNA „B” rész) protokollt a menüből, és a QIAcube Connect MDx készülék elvégzi a hődenaturálást. A PAXgene Blood RNA System segítségével, QIAcube Connect MDx készüléken végzett automatizált RNS-izolálás teljesítményjellemzői az 54. oldalon tekinthetők meg.

# Szállított anyagok

## A kit tartalma

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Katalógusszám			762174
Gyűjtőeszközök száma			50
Összetevő neve	Leírás	Szimbólum	Mennyiség
BR1	Resuspension Buffer (Reszuszpenziós puffer)	RES   BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Kötőpuffer)*	BIND   BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (1. mosópuffer)*	WASH   BUF   1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) (2. mosópuffer [tömény]) <sup>†</sup>	WASH   BUF   2   CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Eluáló puffer)	ELU   BUF	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (RNáz-mentes víz [palack])	PEL   WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (Proteináz K [zöld kupak])	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (PAXgene RNA spin oszlopok [vörös]) <sup>‡</sup>	PAXgene   RNA   COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (2 ml) (Feldolgozócsövek [2 ml]) <sup>§</sup>	PROC   TUBE	6 × 50
Hemogard™	Secondary BD Hemogard Closures (Másodlagos BD Hemogard zárókupakok)	SEC   CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (1,5 ml) (Mikrocentrifuga-csővek [1,5 ml]) <sup>§</sup>	MIC   TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (DNáz I, RNáz-mentes [liofilizált])	DNA   REM	1500 Kunitz-egység <sup>¶</sup>
RDD	DNA Digestion Buffer (DNS emésztőpuffer [fehér kupak])	DNA   DIG   BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (DNáz reszuszpenziós puffer [tesztcső, lila kupak])	DNase   RES   BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (PAXgene Shredder spin oszlopok [lila]) <sup>‡</sup>	PAXgene   SHRED   COL	5 × 10
Kézikönyv	PAXgene Blood RNA Kit kézikönyv (3. verzió)		1

\* Nem használható hipót tartalmazó fertőtlenítőszerrel. Guanidinsót tartalmaz. Biztonsági információk, lásd 18. oldal.

<sup>†</sup> A 2. mosópuffer (BR4) tömény formában található a kitben. Az első használat előtt adjon hozzá 4-szeres térfogatú (96–100% v/v, analitikai tisztaságú) etanolt a palackon feltüntetettek szerint a munkaidet előállításához.

<sup>‡</sup> Mindegyik oszlop buboréksomagolásba van becsomagolva, és csak egyszeri használatra szolgál. Lásd az ártalmatlanítási útmutatásra vonatkozó biztonsági információkat.

<sup>§</sup> A csövek műanyag zsákokban kaphatók, és mindegyik cső csak egyszeri használatra szolgál. Lásd az ártalmatlanítási útmutatásra vonatkozó biztonsági információkat.

<sup>¶</sup> A Kunitz-egység az általánosan használt egység a DNáz I mérésére, definíció szerint az a DNáz I-mennyiség, amely 0,001/perc/milliliter  $A_{260}$ -növekedést okoz 25 °C-on, 5,0-s pH-n, erősen polimerizált DNS-szubsztrát mellett (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* 33, 349 és 363).

## A kit összetevői

Összetevő neve	Leírás	Hatóanyag	Koncentráció
BR1	Resuspension Buffer (Reszuszpenziós puffer)	Nincs	-
BR2	Binding Buffer (Kötőpuffer)	Guanidin-tiocianát	$\geq 30 - < 50\%$ [w/w]
BR3	Wash Buffer 1(1. mosópuffer)	Guanidin-tiocianát Etanol	$\geq 10 - < 20\%$ [w/w] $\geq 3 - < 10\%$ [w/w]
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) (2. mosópuffer [tömény])	Nincs	-
BR5	Elution Buffer (Eluáló puffer)	Nincs	-
RNFW	RNase-Free Water (RNáz-mentes víz [palack])	Nincs	-
PK	Proteinase K (Proteináz K [zöld kupak])	Proteinase K	$\geq 1 - < 3\%$ [w/w]
RNFD	DNase I, RNase-free (DNáz I, RNáz-mentes [líoifilizált])	DNáz	$\geq 90 - \leq 100\%$ [w/w]
RDD	DNA Digestion Buffer (DNS emésztőpuffer [fehér kupak])	Nincs	-
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (Dnáz reszuszpenziós puffer [tesztcső, lila kupak])	Nincs	-

# Szükséges, de nem biztosított anyagok

Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. További információk a megfelelő biztonsági adatlapokon (Safety Data Sheets, SDS-ek) találhatóak, amelyek az adott termék gyártójától szerezhetők be.

## Mindkét protokollhoz szükséges

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek (PreAnalytiX, katalógusszám: 762165)
- Etanol (96–100% v/v, analitikai tisztaságú)
- Pipetta\* (10 µl – 4 ml)
- Steril, aeroszol elleni gáttal ellátott, RNáz-mentes pipettahegyek†
- Mérőhenger‡
- 3000–5000 × g elérésére képes és a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek befogadására alkalmas lengőkosaras rotorral felszerelt centrifuga\*
- Vortex keverő\*
- Jégzúzalék
- Alkoholos filctoll a címkézéshez

## A manuális protokollhoz szükséges

- Változtatható sebességű mikrocentrifuga\*, amely képes elérni legalább az 1000–8000 × g tartományt, bár alacsonyabb és magasabb g-erőhatások is alkalmazhatók (a részletekért lásd a protokoll lépéseit), és fel van szerelve 2 ml-es mikrocentrifuga-csővek (MCT) befogadására alkalmas rotorral

\* Ügyeljen rá, hogy az eszközöket és a készülékeket a gyártó javaslatai szerint rendszeresen ellenőrizték, karbantartsák és kalibrálják.

† Győződjön meg róla, hogy ismeri az RNS kezelésének irányelveit („A” függelék, 75. oldal).

‡ Az etanol BR4 puffer koncentrátumhoz adásához.



- Rázóinkubátor\*, amely képes 55 °C-on és 65 °C-on inkubálni, és ≥400 rpm, de legfeljebb 1400 rpm sebességgel rázni (pl. Eppendorf® Thermomixer Compact vagy azzal egyenértékű készülék)

## Az automatizált protokollhoz szükséges

- Olló
- QIAcube Connect MDx\* (QIAGEN, katalógusszám: 9003070)

### QIAcube Connect MDx fogyóeszközök:

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

### QIAcube Connect MDx tartozékok:

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, katalógusszám: 990392)†

### QIAcube Connect MDx szolgáltatási csomagok:

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

\* Ügyeljen arra, hogy az eszközök és a készülékek a gyártó javaslatai szerint rendszeresen legyenek ellenőrizve, karbantartva és kalibrálva.

† Része a Starter Pack, QIAcube indulócsomagnak is (QIAGEN, katalógusszám: 990395).

# Figyelmeztetések és óvintézkedések

Az Európai Unión belüli ügyfelek tartsák szem előtt, hogy az eszközzel összefüggésben fellépő bármilyen súlyos incidenst jelenteni kell a gyártó, valamint a felhasználó és/vagy a beteg tartózkodási helye szerinti tagállam illetékes hatósága felé.

Az Európai Unión kívüli ügyfelek tartsák szem előtt, hogy szükséges lehet a vonatkozó helyi előírásoknak megfelelően az eszközzel összefüggésben fellépő súlyos balesetek jelentése a gyártó és/vagy hivatalos képviselője, valamint a felhasználó és/vagy a beteg tartózkodási helye szerinti illetékes szabályozó hatóság felé.

## Biztonsági információk

A vegyszerekkel és biológiailag veszélyes anyagokkal végzett munka során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, eldobható kesztyűt és védőszemüveget. További információkat a megfelelő biztonsági adatlapok (Safety Data Sheets, SDS-ek) tartalmaznak. Az egyes QIAGEN kitek és összetevők biztonsági adatlapjai praktikus és kisméretű PDF-fájl formájában online megtalálhatók, megtekinthetők és kinyomtathatók a [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) weboldalon.

- Minden vegyi és biológiai anyag potenciálisan veszélyes. A betegvérminták és a minták potenciálisan fertőzőek lehetnek, ezért biológiailag veszélyes anyagként kezelendők.
- A biológiailag veszélyes és a kitekből származó hulladékokat a helyi biztonsági eljárásoknak megfelelően kell ártalmatlanítani.

## Vészhelyzeti információk

CHEMTREC

Az USA-n és Kanadán kívül: +1 703-527-3887

## Óvintézkedések

Amikor vérrel dolgozik, alkalmazzon általános óvintézkedéseket a vér útján terjedő kórokozók (pl. HIV, hepatitisz B és más, vér útján terjedő vírussal) való potenciális érintkezés kockázatának elkerülésére. Használjon kesztyűt, köpenyt, védőszemüveget, egyéb egyéni védőeszközt vagy a rendelkezésre álló műszaki lehetőségeket a vérrel való érintkezés elleni védelem érdekében. További információkat a megfelelő biztonsági adatlapok (Safety Data Sheets, SDS-ek) tartalmaznak. Ezek jól kezelhető, kompakt PDF-formátumban elérhetők online, a **www.preanalytix.com** weboldalon, ahol megtalálható, megtekinthető és kinyomtatható a jelen kit biztonsági adatlapja.

### FIGYELEM



SOHA NE adjon hipót vagy savas oldatot közvetlenül a minta-előkészítés hulladékához.

A kötőpuffer (BR2) és az 1. mosópuffer (BR3) guanidin-tiocianátot tartalmaz, amely hipóval keverve rendkívül reakcióképes vegyületeket képezhet. Ha a kötőpuffer (BR2) vagy az 1. mosópuffer (BR3) kiömlik, tisztítsa fel megfelelő laboratóriumi tisztítószerrel és vízzel. Ha potenciálisan fertőző anyagot tartalmazó folyadék ömlik ki, az érintett felületet először laboratóriumi tisztítószerrel és vízzel, majd 1%-os (v/v) nátrium-hipoklorit oldattal (hipó) tisztítsa meg.

A PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsőből származó RNS-stabilizáló oldat és vér keveréke 1 térfogategységnyi háztartási hipóoldat (5%-os nátrium-hipoklorit) 9 térfogategységnyi RNS-stabilizáló oldat és vér keverékéhez adásával fertőtleníthető.

A minta-előkészítés hulladékát, például az RNS-izolálási eljárás centrifugálási lépéseiben kapott felülúszókat potenciálisan fertőzőnek kell tekinteni. A biológiai anyagok hulladékait helyezze biológiailag veszélyes hulladéktartályokba. A hulladékkezelést a helyi szabályozásoknak és az intézménye eljárásainak megfelelően végezze el.

A PAXgene Blood RNA Kit specifikus összetevőit csak egyszeri használatra szánták. Az egyes összetevőkről „A kit tartalma” című részben, a 14. oldalon talál információkat.

A következő veszélyességi és biztonsági jelzések vonatkoznak a PAXgene Blood RNA Kit összetevőire. A PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek használatával kapcsolatos biztonsági információkat lásd a *PAXgene Blood RNA Tube kézikönyvben*.

#### Buffer BR2



Guanidin-tiocianátot tartalmaz. Veszély! Lenyelve ártalmas. Bőrrel érintkezve vagy belélegzés esetén ártalmas lehet. Súlyos szemkárosodást okoz. Ártalmas a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz. Savval érintkezve nagyon mérgező gázok képződnek. Ne hagyja, hogy kijusson a környezetbe. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező. HA SZEMBE KERÜL: Óvatos öblítés vízzel több percen keresztül. Adott esetben kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása. Expozíció vagy annak gyanúja esetén: Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz. A tartalom/edény elhelyezése hulladékként: jóváhagyott hulladékkezelő létesítményben.

### Buffer BR3



Etanolt és guanidin-tiocianátot tartalmaz. Veszély! Tűzveszélyes folyadék és gőz. Súlyos szemkárosodást okoz. Savval érintkezve nagyon mérgező gázok képződnek. Hőtől/szikrától/nyílt lángtól/forró felületektől távol tartandó. Tilos a dohányzás. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező. HA SZEMBE KERÜL: Óvatos öblítés vízzel több percen keresztül. Adott esetben kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása. Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz.

### DNase I



Tartalmazott anyag: DNáz. Veszély! Allergiás bőrreakciót válthat ki. Belélegezve allergiás és asztmás tüneteket, és nehéz légzést okozhat. Kerülje a por belégzését. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező. Légzésvédelem használata kötelező. Expozíció vagy annak gyanúja esetén: Forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz. Az érintett személyt friss levegőre kell vinni, és olyan nyugalmi testhelyzetbe kell helyezni, hogy könnyen tudjon lélegezni. A szennyezett ruhát az újbóli használat előtt ki kell mosni.

# A reagensek tárolása és kezelése

A PAXgene RNA spin oszlopok (PRC), a PAXgene Shredder spin oszlopok (PSC), a proteináz K (PK) és a pufferek (BR1, BR2, BR3, BR4 és BR5) száraz környezetben, a kit címkéjén feltüntetett hőmérsékleten tárolandók.

Az RNase-Free DNase Set készletet, amely DNáz I-et (RNFD), DNS emésztőpuffert (RDD) és DNáz reszuszpenziós puffert (DRB) tartalmaz, környezeti hőmérsékleten szállítják. Megérkezése után haladéktalanul tegye az RNase-Free DNase Set kit minden komponensét a termékcímkén feltüntetett hőmérsékletre. Megfelelő tárolás mellett a kit a dobozon feltüntetett lejárati dátumig marad stabil.

Vegye figyelembe a dobozon és az egyes összetevők címkéjén feltüntetett lejárati időt és tárolási körülményeket. Ne használjon lejárt szavatosságú vagy helytelenül tárolt összetevőket.

## Felbontás utáni stabilitás

A kit első használata után a reagensek stabilak az eredeti palackokban és hőmérsékleteken, a kit dobozának címkéjén feltüntetett lejárati időn belül.

A QIAcube Connect MDx készülék reagenspalackjaiba töltött reagensek 3 hónapos tárolási ideig stabilak szobahőmérsékleten (15–25 °C).

A feloldott Dnáz I (RNFD) 2–8 °C-on 6 hétig stabil az eredeti üvegben (törzsoldat).

A törzsoldat egyszeri használathoz szükséges alikvotjai a (kittel szállított) 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csővekben (MCT) 9 hónapos tárolási ideig stabilak –20 °C-on. Kioldás után az egyszer használatos alikvotok 6 hetes tárolási ideig stabilak 2–8 °C-on.

## Mintavétel, -tárolás és -kezelés

A PAXgene Blood RNA Kit a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekbe gyűjtött teljes vérrrel használatos. A vért a PAXgene Blood RNA Tube kézikönyvben található instrukcióknak megfelelően kell levenni a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekbe. Szükség esetén a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek kezelésével kapcsolatos javaslatokért lásd a „C” függelék (80. oldal). Minden mintát potenciálisan veszélyes (fertőző) anyagnak kell tekinteni. A PAXgene Blood RNA System teljesítményjellemzőit csak FOS és IL1B gének transzkriptjeivel állapították meg. Ezek a 42–45. oldalakon tekinthetők meg.

# Protokoll: Teljes RNS manuális izolálása PAXgene Blood RNA Tubes mintacsövekbe gyűjtött humán teljes vérből

## A kezdés előtt figyelembe veendő fontos szempontok

- Győződjön meg róla, hogy a kít doboza bontatlan és sértetlen, és hogy a pufferek nem szivárogtak ki a palackokból. Ne használjon sérült kitet.
- Pipetta használatakor ügyeljen rá, hogy a helyes térfogati értékre legyen beállítva, és hogy a folyadékot óvatosan és teljes mértékben felszívja és kiadagolja.
- A minták rossz tesztcsőbe vagy spin oszlopba való pipettázásának elkerülése érdekében gondoskodjon róla, hogy az összes tesztcső és spin oszlop megfelelően meg legyen jelölve alkoholos filctollal. Feliratozza minden egyes (PT, MCT) tesztcső oldalát és kupakját. A spin oszlopok esetében a feldolgozócsövek (Processing Tube, PT) oldalát feliratozza. Zárjon le minden egyes tesztcsövet és spin oszlopot, miután folyadékot juttatott beléjük.
- Az eljárás során a minták és pufferek kicsorgása, kiömlése csökkentheti a kapott RNS-hozamát és tisztaságát.
- Hacsak nincs másként jelezve, a jelen protokoll minden lépése – a centrifugálási lépéseket is beleértve – szobahőmérsékleten (15-25 °C) végzendő.

A nukleinsav-amplifikációs technikák szenzitivitása miatt az alábbi óvintézkedések szükségesek a minták kezelésekor a keresztszennyeződések elkerülése érdekében:

- Óvatosan pipettázza a mintát a spin oszlopba (PSC, PRC) anélkül, hogy megnedvesítené az oszlop peremét.
- Az egyes folyadékátvitel között mindig cseréljen pipettahegyet. Használjon aeroszol elleni gáttal ellátott pipettahegyeket.
- Ne érjen hozzá a pipetta hegyével a spin oszlop (PSC, PRC) membránjához.



- A mikrocentrifuga-cső (microcentrifuge tube, MCT) vortexelése vagy melegítése után röviden centrifugálja le, hogy eltávolítsa a cseppeket a kupak belső faláról.
- A teljes eljárás során viseljen gumikesztyűt. Amennyiben a kesztyű mintával érintkezik, haladéktalanul vegyen fel új kesztyűt.
- Zárja le a spin oszlopot (PSC, PRC), mielőtt a mikrocentrifugába helyezné. A centrifugálást az eljárásban leírtaknak megfelelően végezze.
- Egyszerre csak egy spin oszlopot (PSC, PRC) nyisson ki, és ügyeljen arra, hogy ne képződjenek aeroszol részecskék.
- Több minta hatékony párhuzamos feldolgozásához azt javasoljuk, hogy töltsön meg egy tartóállványt feldolgozócsövekkel (processing tubes, PT-k), amelyekbe a centrifugálás után áthelyezheti a spin oszlopokat (PSC, PRC). Az átfolyó frakciót tartalmazó, használt feldolgozócsöveket (processing tubes, PT-k) dobja ki, és helyezze a spin oszlopokat (PSC, PRC) új feldolgozócsövekbe, mielőtt visszahelyezné a mikrocentrifugába.



## **Teendők az eljárás megkezdése előtt**

- A vért a *PAXgene Blood RNA Tube* kézikönyvben található instrukcióknak megfelelően kell levenni a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekbe. Szükség esetén a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek kezelésével kapcsolatos javaslatokért lásd a „C” függelék (80. oldal).
- Gondoskodjon róla, hogy a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsöveket legalább 2 órán át inkubálja szobahőmérsékleten a vérvételt követően, hogy biztosítsa a vörsejtek teljes lízisét és az RNS kicsapódását. A PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsövek másnapig tartó inkubálásával megnőhet a tisztítás hozama. Ha a 2–8 °C-on, –20 °C-on vagy –70 °C-on történő tárolás előtt nem végezték el a vér 2 órás kezdeti inkubálását szobahőmérsékleten, akkor először hagyja a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsövet szobahőmérsékletre melegedni, majd inkubálja azt ezen a hőmérsékleten 2 órán keresztül, mielőtt elkezdené az eljárást.

- Olvassa el a biztonsági információkat a 18. oldalon.
- Olvassa el az RNS kezelésével kapcsolatos irányelveket („A” függelék, 77. oldal).
- Gondoskodjon róla, hogy az eszközöket, úgymint a pipettákat és a rázóinkubátort a gyártó javaslatai szerint rendszeresen ellenőrizték és kalibrálják.
- A rázóinkubátorra az 5. és 20. lépésben van szükség. Állítsa be a rázóinkubátor hőmérsékletét 55 °C-ra.
- A kötőpuffer (BR2) csapadékot képezhet a tárolás során. Szükség esetén melegítse fel 37 °C-ra, hogy feloldja a csapadékot.
- A 2. mosópuffer (BR4) tömény formában található a kitben. Az első használat előtt adjon hozzá 4-szeres térfogatú (96–100% v/v, analitikai tisztaságú) etanolt a palackon feltüntetettek szerint a munkaoldat előállításához.
- Ha először használja az RNase-Free DNase Set kitet, készítsen DNáz I törzsoldatot. Oldja fel a szilárd DNáz I (RNFD; 1500 Kunitz-egység)\* komponens 550 µl DNáz reszuszenziós pufferben (DRB), amely a kit részét képezi. Ügyeljen rá, hogy ne vesszen el semennyi DNáz I (RNFD) az üveg kinyitásakor. Ne vortexelje a feloldott DNáz I (RNFD) oldatot. A DNáz I különösen érzékeny a fizikai denaturációra. A keverést kizárólag az üveg óvatos megfordításával végezze.
- A feloldott DNáz I (RNFD) 2–8 °C-on tárolható az eredeti üvegben (törzsoldat), vagy –20 °C-on, miután a törzsoldatot kivették az üvegből, és szétosztották egyszeri használathoz szükséges alikvotokra (használja ehhez a kit részét képező 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csöveket (MCT); ezek 5 alikvothoz elegendők). A kioldott alikvotok 2–8 °C-on tárolhatók. Kioldás után az alikvotokat tilos visszafagyasztani.
- A DNáz I (RNFD) feloldása és alikvotokba szétosztása során ügyeljen rá, hogy kövesse az RNS kezelésének irányelveit („A” függelék, 77. oldal).


\* A Kunitz-egység az általánosan használt egység a DNáz I mérésére, definíció szerint az a DNáz I-mennyiség, amely 0,001perc/milliliter  $A_{260}$ -növekedést okoz 25 °C-on, 5,0-s pH-n, erősen polimerizált DNS-szubsztrát mellett (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 és 363).

## Eljárás

1. Centrifugálja a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsöveket 10 percig 3000–5000 × g-vel, lengőkosaras rotor használatával.
  -  A vérszövetek teljes lízise és az RNS kicsapódása érdekében ügyeljen rá, hogy a vérminta minimum 2 órán át inkubálódjon szobahőmérsékleten (15–25 °C-on) a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsövekben.
  -  A rotorba lekerekített aljú csövekhez való tesztcsőadaptereket kell helyezni. Ha másféle típusú tesztcsőadaptert használ, a tesztcsövek eltörhetnek a centrifugálás során.
2. Leöntéssel vagy pipettázással távolítsa el a felülúszót. Adjon hozzá 4 ml RNase-Free Water (RNFV) vizet a pellethez, és egy új, második BD Hemogard zárókupak (a kit része) segítségével zárja le a csövet.

Ha leönti a felülúszót, ügyeljen rá, hogy ne kavarodjon fel a pellet, és tiszta papírtörülő segítségével törölje szárazra a tesztcső peremét.
3. Vortexelje, amíg a pellet szemmel láthatóan fel nem oldódik, és centrifugálja 10 percig 3000–5000 × g-vel, lengőkosaras rotor használatával. Távolítsa el és dobja ki a felülúszó teljes mennyiségét.

A vortexelés után, de a centrifugálás előtt a felülúszóban maradt apró törmelék nem befolyásolja az eljárás sikerességét.

  -  A felülúszó tökéletlen eltávolítása gátolja a lízist, és felhígítja a lizátumot, ennélfogva befolyásolja az RNS molekulák PAXgene membránhoz való kötődésének feltételeit.
4. Adjon hozzá 350 µl reszuszpenziós puffert (BR1), és vortexelje, amíg a pellet szemmel láthatóan feloldódik.
5. Pipettázza a mintát egy 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csőbe (MCT). Adjon az elegyhez 300 µl kötőpuffert (BR2) és 40 µl proteináz K (PK) reagenst. Keverje össze: vortexelje 5 másodpercig, majd inkubálja 10 percig 55 °C-on a rázóinkubátorban, 400–1400 rpm fokozaton. Inkubálás után állítsa át a rázóinkubátor hőmérsékletét 65 °C-ra (a 20. lépéshez).



Ne keverje össze a kötőpuffert (BR2) és a proteináz K (PK) reagenst, mielőtt hozzáadná őket a mintához.

- Pipettázza a lizátumot közvetlenül egy 2 ml-es feldolgozócsőbe (PT) helyezett spin oszlopba (PSC) (lila), és centrifugálja 3 percig maximális sebességgel (de ne lépje túl a  $20\,000 \times g$ -t).



Óvatosan pipettázza a lizátumot a spin oszlopba (PSC), és szabad szemmel ellenőrizze, hogy a lizátum teljesen átkerült-e a spin oszlopba (PSC).

Az oszlopok (PSC) és csövek (PT) sérülésének megelőzése érdekében ne lépje túl a  $20\,000 \times g$ -t.



Egyes minták centrifugálás nélkül is átfolyhatnak a spin oszlopon (PSC). Ez az adott minta alacsony viszkozitásával magyarázható, és nem tekintendő a termék hibájának.

- Óvatosan helyezze át az átfolyó frakció teljes felülúszóját egy új 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csőbe (MCT) anélkül, hogy közben felkavarná a pelletet a feldolgozócsőben (PT).
- Adjon hozzá 350  $\mu$ l etanolt (96–100% v/v, analitikai tisztaságú). Keverje össze vortexeléssel és centrifugálja röviden (1–2 mp,  $500$ – $1000 \times g$ ), hogy eltávolítsa a cseppeket a cső kupakjának belső faláról.



A centrifugálás hossza nem haladhatja meg az 1–2 mp-et, mivel ellenkező esetben a nukleinsavak pelletté tömörülését, ezáltal pedig a teljes RNS csökkent hozamát eredményezhetné.

- Pipettázzon 700  $\mu$ l mintát egy 2 ml-es feldolgozócsőbe (PT) helyezett PRC spin oszlopba (vörös), és centrifugálja 1 percig  $8000$ – $20\,000 \times g$ -vel. Ezután helyezze a spin oszlopot (PRC) egy új 2 ml-es feldolgozócsőbe (PT), és dobja el az átfolyó frakciót tartalmazó régi feldolgozócsövet.
- Pipettázza a maradék mintát a spin oszlopba (PRC), és centrifugálja 1 percig  $8000$ – $20\,000 \times g$ -vel. Ezután helyezze a spin oszlopot (PRC) egy új 2 ml-es feldolgozócsőbe (PT), és dobja el az átfolyó frakciót tartalmazó régi feldolgozócsövet (PT).



Óvatosan pipettázza a mintát a spin oszlopba (PRC), és szabad szemmel ellenőrizze, hogy a minta teljesen átkerült-e a spin oszlopba (PRC).

11. Pipettázzon 350 µl 1. mosópuffert (BR3) a spin oszlopba (PRC). Centrifugálja 1 percig 8000–20 000 × *g*-vel. Ezután helyezze a spin oszlopot (PRC) egy új 2 ml-es feldolgozócsőbe (PT), és dobja el az átfolyó frakciót tartalmazó régi feldolgozócsövet (PT).
12. Adjon 10 µl DNáz I (RNFD) törzsoldatot 70 µl DNS emésztőpufferhez (RDD) egy 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csőben (MCT). Keverje össze: finoman kocogtassa meg párszor a tesztcsövet, és röviden centrifugálja le, hogy összegyűjtse a maradék folyadékot a cső oldaláról.

Ha például 10 mintát dolgoz fel, adjon 100 µl DNáz I (RNFD) törzsoldatot 700 µl DNS emésztőpufferhez (RDD). Használja a kitben található 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csőveket (MCT).



A DNáz I különösen érzékeny a fizikai denaturációra. A keverést kizárólag a tesztcső finom kocogtatásával végezze. Ne vortexelje.

13. Pipettázza a DNáz I (RNFD) inkubációs elegyet (80 µl) közvetlenül a PAXgene RNA spin oszlop (PRC) membránjára, és helyezze a munkaasztalra (20–30 °C) 15 percre.



Ügyeljen rá, hogy a DNáz I (RNFD) inkubációs elegy közvetlenül a membránra kerüljön. A DNázos emésztés tökéletlen lesz, ha az elegynek egy része nem a membránra, hanem a spin oszlop (PRC) falára vagy O-gyűrűjére kerül, és ott is marad.

14. Pipettázzon 350 µl 1. mosópuffert (BR3) a PAXgene RNA spin oszlopba (PRC), és centrifugálja 1 percig 8000–20 000 × *g*-vel. Ezután helyezze a spin oszlopot (PRC) egy új 2 ml-es feldolgozócsőbe (PT), és dobja el az átfolyó frakciót tartalmazó régi feldolgozócsövet (PT).
15. Pipettázzon 500 µl 2. mosópuffert (BR4) a PAXgene RNA spin oszlopba (PRC), és centrifugálja 1 percig 8000–20 000 × *g*-vel. Ezután helyezze a spin oszlopot (PRC) egy új 2 ml-es feldolgozócsőbe (PT), és dobja el az átfolyó frakciót tartalmazó régi feldolgozócsövet (PT).



A 2. mosópuffer (BR4) tömény formában található a kitben. Ügyeljen rá, hogy használat előtt hozzáadja az etanolt a 2. mosópufferhez (BR4) (lásd „Teendők az eljárás megkezdése előtt”, 25. oldal).

16. Adagoljon újabb 500 µl 2. mosópuffert (BR4) a PAXgene RNA spin oszlopba (PRC). Centrifugálja 3 percig 8000–20 000 × *g*-vel.
17. Dobja el az átfolyó frakciót tartalmazó feldolgozócsövet (PT), és helyezze a spin oszlopot (PRC) egy új 2 ml-es feldolgozócsőbe (PT). Centrifugálja 1 percig 8000–20 000 × *g*-vel.
18. Dobja el az átfolyó frakciót tartalmazó feldolgozócsövet (Processing Tube, PT). Helyezze a spin oszlopot (PRC) egy 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csőbe (MCT), és pipettázzon 40 µl eluáló puffert (BR5) közvetlenül a spin oszlop (PRC) membránjára. Az RNS eluálásához centrifugálja 1 percig 8000–20 000 × *g*-vel. A maximális elúciós hatásfok elérése érdekében fontos, hogy az egész membránt megnedvesítse az eluáló pufferrel (BR5).
19. Ismétlje meg az elúciós lépést (18. lépés) a fentebb leírtak szerint, 40 µl eluáló puffer (BR5) és ugyanazon mikrocentrifuga-cső (MCT) használatával.
20. Inkubálja az eluátumot 5 percig 65 °C-on a rázóinkubátorban (az 5. lépésből), ezúttal rázatás nélkül. Az inkubációt követően azonnal helyezze jégre.



A minták 65 °C-on végzett inkubációja denaturálja az RNS-t a downstream alkalmazások számára. Még ha a későbbi, downstream alkalmazásnak része is egy hődenaturálásos lépés, akkor se hagyja ki ezt a lépést. Ezen a ponton az elégséges RNS-denaturáció elengedhetetlen a maximális hatékonysághoz a downstream alkalmazásokban.

Ne lépje túl a megadott inkubációs időt vagy hőmérsékletet.

21. Ha az RNS-mintákat nem használja fel azonnal, tárolja azokat –20 °C-on vagy –70 °C-on.

Mivel az RNS ismételt felolvasztás és visszafagyasztás után is denaturált marad, nem szükséges megismételni az inkubálást 65 °C-on. Ha diagnosztikai assay-hez használja az RNS mintákat, kövesse a gyártótól kapott instrukciókat.

Az RNS 260 nm-en mért abszorbancia általi mennyiségi meghatározásának pontossága érdekében azt javasoljuk, hígítsa a mintákat 10 mM-os, 7,5 pH-jú Tris-HCl oldattal.\* A minták RNase-Free Water vízben való hígítása pontatlan, túl alacsony értékekhez vezethet.

Nullázza le a spektrofotométert egy vak minta segítségével, amely ugyanolyan arányban tartalmaz eluáló puffert (BR5) és Tris-HCl puffert, mint a mérendő minták. Az eluáló puffer (BR5) abszorbanciája magas 220 nm-en, ami magas háttér abszorbanciaszintekhez vezethet, ha a spektrofotométer nem lett megfelelően lenullázva.



A Tris-HCl pufferben történő mennyiségi meghatározáshoz használja az alábbi összefüggést:  $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ . Lásd „B” függelék, 78. oldal.

22. Zárja vissza a puffert és az RNase-Free Water vizet tartalmazó összes palackot, az enzimeket és enzimpuffereket tartalmazó üvegeket és csöveket, valamint a kitből származó, a protokollhoz használt műanyagot tartalmazó zsákokat. A kit többi részét tárolja a „A reagensek tárolása és kezelése” (22. oldal) és a „Felbontás utáni stabilitás” (22. oldal) részben leírtaknak megfelelően a következő használatig.

\* Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. További információk a megfelelő biztonsági adatlapokon (Safety Data Sheets, SDS-ek) találhatóak, amelyek az adott termék gyártójától szerezhetők be.

# Protokoll: Teljes RNS automatizált izolálása PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekbe gyűjtött humán teljes vérből

## A kezdés előtt figyelembe veendő fontos szempontok

- Győződjön meg róla, hogy a kít doboza bontatlan és sértetlen, és hogy a pufferek nem szivárogtak ki a palackokból. Ne használjon sérült kitet.
- Pipetta használatakor ügyeljen rá, hogy a helyes térfogati értékre legyen beállítva, és hogy a folyadékot óvatosan és teljes mértékben felszívja és kiadagolja.
- A minták rossz tesztcsöbe és műanyag fogyóeszközökbe való pipettázásának elkerülése érdekében gondoskodjon róla, hogy az összes feldolgozócső (PT), mikrocentrifuga-cső (MCT) és rotoradapter megfelelően meg legyen feliratozva alkoholos filctollal. Feliratozza minden egyes mikrocentrifuga-cső (MCT) oldalát és kupakját, minden egyes feldolgozócső (PT) oldalát és minden egyes rotoradapter külső falát.
- Az eljárás során a minták és pufferek kicsorgása, kiömlése csökkentheti a kapott RNS-hozamát és tisztaságát.
- Hacsak nincs másként jelezve, a jelen protokoll minden lépése – a centrifugálási lépéseket is beleértve – szobahőmérsékleten (15-25 °C) végzendő.

A nukleinsav-amplifikációs technikák szenzitivitása miatt az alábbi óvintézkedések szükségesek a minták kezelésekor a keresztszennyeződések elkerülése érdekében:

- Óvatosan pipettázza a mintát a feldolgozócsöbe (PT), a cső aljába anélkül, hogy megnedvesítené a tesztcső peremét.
- Az egyes folyadékátvitel között mindig cseréljen pipettahegyet. Használjon aeroszol elleni gáttal ellátott pipettahegyeket.



- Ne érjen hozzá a pipetta hegyével a spin oszlop (PSC, PRC) membránjához.
- A mikrocentrifuga-cső (microcentrifuge tube, MCT) vortexelése vagy melegítése után röviden centrifugálja le, hogy eltávolítsa a cseppeket a kupak belső faláról.
- A teljes eljárás során viseljen gumikesztyűt. Amennyiben a kesztyű mintával érintkezik, haladéktalanul vegyen fel új kesztyűt.

## Teendők az eljárás megkezdése előtt

- A vért a *PAXgene Blood RNA Tube* kézikönyvben található instrukcióknak megfelelően kell levenni a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekbe. Szükség esetén a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek kezelésével kapcsolatos javaslatokért lásd a „C” függelék (80. oldal).
- Gondoskodjon róla, hogy a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsöveket legalább 2 órán át inkubálja szobahőmérsékleten a vérvételt követően, hogy biztosítsa a vörsejtek teljes lízisét és az RNS kicsapódását. A PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsövek másnapig tartó inkubálásával megnőhet a tisztítás hozama. Ha a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsöveket 2–8 °C között, –20 °C-on vagy –70 °C-on tárolták a vér levételét követően, először hagyja a csöveket szobahőmérsékletűre melegedni, majd tárolja a csöveket szobahőmérsékleten 2 órán át, mielőtt elkezdené az eljárást.
- Olvassa el a biztonsági információkat a 18. oldalon.
- Olvassa el a „Fontos megjegyzések” című részt a 58. oldalon.
- Olvassa el az RNS kezelésével kapcsolatos irányelveket („A” függelék, 77. oldal).
- Olvassa el a megfelelő QIAcube Connect MDx készülék felhasználói kézikönyvét és a készülékhez mellékelte bármely további tájékoztatót, különös figyelmet fordítva a biztonsági információkra.
- Gondoskodjon róla, hogy az eszközöket és készülékeket, úgymint a pipettákat és a QIAcube Connect MDx készüléket a gyártó javaslatai szerint rendszeresen ellenőrizze és kalibrálja.

- A kötőpuffer (BR2) csapadékot képezhet a tárolás során. Szükség esetén melegítse fel 37 °C-ra, hogy feloldja a csapadékot.
- A 2. mosópuffer (BR4) tömény formában található a kitben. Az első használat előtt adjon hozzá megfelelő térfogatú (96–100% v/v, analitikai tisztaságú) etanolt a palackon feltüntetettek szerint a munkaoldat előállításához.
- Ha először használja az RNase-Free DNase Set kitet, készítsen DNáz I törzssoldatot. Oldja fel a szilárd DNáz I (RNFD; 1500 Kunitz-egység)\* komponens 550 µl DNáz reszuszpenziós pufferben (DRB), amely a kit részét képezi. Ügyeljen rá, hogy ne vesszen el semennyi DNáz I (RNFD) az üveg kinyitásakor. Ne vortexelje a feloldott DNáz I (RNFD) oldatot. A DNáz I különösen érzékeny a fizikai denaturációra. A keverést kizárólag az üveg óvatos megfordításával végezze.
- A feloldott DNáz I (RNFD) 2–8 °C-on tárolható az eredeti üvegben (törzssoldat), vagy –20 °C-on, miután a törzssoldatot kivették az üvegből, és szétosztották egyszeri használathoz szükséges alikvotokra (használja ehhez a kit részét képező 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csöveket (MCT); ezek 5 alikvothoz elegendők). A kioldott alikvotok 2–8 °C-on tárolhatók. Kioldás után az alikvotokat tilos visszafagyasztani.
- A DNáz I (RNFD) feloldása és alikvotokba szétosztása során ügyeljen rá, hogy kövesse az RNS kezelésének irányelveit („A” függelék, 77. oldal).
- Helyezze be a megfelelő rázógépadaptert (a QIAcube Connect MDx készülékekhez mellékelve; használja a 2 ml-es biztonsági záras tesztcsövekhez való „2” jelzésű adaptert), és helyezze a rázógép tartóállványát az adapter tetejére.
- Ellenőrizze a hulladéktartályt, és szükség esetén ürítse ki.
- Telepítse a kapcsolódó protokollokat, ha nem tette még meg a korábbi futtatásokhoz. A QIAcube Connect MDx készülék működéséhez szükség van a kapcsolódó zip fájlban talált összes protokoll letöltésére. Lásd: „Protokollok telepítése a QIAcube Connect MDx készülékre”, 60. oldal.

\* A Kunitz-egység az általánosan használt egység a DNáz I mérésére, definíció szerint az a DNáz I-mennyiség, amely 0,001/perc/milliliter  $A_{260}$  növekedést okoz 25 °C-on, 5,0-s pH-n, erősen polimerizált DNS-szubsztrát mellett (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 és 363).

## Eljárás

1. Zárja be a QIAcube Connect MDx készülék fedelét, és kapcsolja be a készüléket a főkapcsolóval (lásd 15. ábra, 59. oldal).

Sípoló hang hallatszik, és megjelenik az indulóképernyő. A készülék automatikusan elvégzi az inicializálási teszteket.

2. Nyissa fel a QIAcube Connect MDx készülék fedelét, és helyezze be a szükséges reagenseket és műanyag eszközöket a készülékbe. Lásd „A QIAcube Connect MDx készülék betöltése”, 61. oldal.

Hogy időt takarítson meg, az előkészítést az egyik vagy mindkét 10 perces centrifugálási lépés alatt is elvégezheti (3. és 5. lépés).

3. Centrifugálja a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsöveket 10 percig 3000–5000 × g-vel, lengőkosaras rotor használatával.



A vörsejtek teljes lízise és az RNS kicsapódása érdekében ügyeljen rá, hogy a vérminta minimum 2 órán át inkubálódjon szobahőmérsékleten (15–25 °C, -on) a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsövekben.



A rotorba lekerekített aljú csövekhez való tesztcsőadaptereket kell helyezni. Ha másféle típusú tesztcsőadaptert használ, a tesztcsövek eltörhetnek a centrifugálás során.

4. Leöntéssel vagy pipettázással távolítsa el a felülúszót. Ha leönti a felülúszót, ügyeljen rá, hogy ne kavarodjon fel a pellet, és tiszta papírtörülő segítségével törölje szárazra a tesztcső peremét. Adjon hozzá 4 ml RNase-Free Water (RNFW) vizet a pellethez, és egy új, második BD Hemogard zárókupak (a kit része) segítségével zárja le a csövet.
5. Vortexelje, amíg a pellet szemmel láthatóan fel nem oldódik, és centrifugálja 10 percig 3000–5000 × g-vel, lengőkosaras rotor használatával. Távolítsa el és dobja ki a felülúszó teljes mennyiségét.

A vortexelés után, de a centrifugálás előtt a felülúszóban maradt apró törmelék nem befolyásolja az eljárás sikerességét.



A felülúszó tökéletlen eltávolítása gátolja a lízist, és felhígítja a lizátumot, ennél fogva befolyásolja az RNS molekulák PAXgene membránhoz való kötődésének feltételeit.

6. Adjon hozzá 350 µl reszuszpenziós puffert (BR1), és vortexelje, amíg a pellet szemmel láthatóan feloldódik.

7. Pipettázza a mintát egy 2 ml-es feldolgozócsőbe (PT).



A PAXgene Blood RNA Kitben található 2 ml-es feldolgozócsöveket (PT) használja.

8. Helyezze be a mintákat tartalmazó, nyitott feldolgozócsöveket (Processing Tube, PT) a QIAcube Connect MDx rázógépbbe (lásd 18. ábra, 63. oldal). A mintapozíciók meg vannak számozva a könnyebb betölthetőség kedvéért. Helyezze be a rázógép-tartóállvány dugós csatlakozóit (a QIAcube Connect MDx készülékhez mellékelve) a rázógép-tartóállvány peremén a nyílásokba, az egyes feldolgozócsövek (Processing Tube, PT) mellé. Ez lehetővé teszi a minták detektálását a betöltés ellenőrzése során.



Ügyeljen rá, hogy a helyes rázógépadapter legyen behelyezve (rázógépadapter, 2 ml-es biztonsági záras tesztcsövekhez, „2” jelzéssel ellátva, a QIAcube Connect MDx készülékhez mellékelve).



Ha 12 db mintánál kevesebbet dolgoz fel, ügyeljen rá, hogy a 67. oldalon található 22. ábra szerint töltsen meg a rázógép állványát. Egy (1) vagy 11 minta nem dolgozható fel. A rázógép állványának pozícióit jelölő számozás megfelel a centrifuga pozícióit jelölő számozásnak.

9. Csupkja le a QIAcube Connect MDx készülék fedelét (lásd 15. ábra, 59. oldal).

10. Válassza ki a „PAXgene Blood RNA Part A” protokollt, és indítsa el.

Kövesse a QIAcube Connect MDx készülék érintőképernyőjén megjelenő utasításokat.



Ügyeljen rá, hogy mindkét programrész (A és B rész) telepítve legyen a QIAcube Connect MDx készülékre (lásd „Protokollok telepítése a QIAcube Connect MDx készülékre”, 60. oldal).



A készülék elvégzi a minták, pipettahegyek, rotoradapterek és reagenspalackok megfelelő betöltésének ellenőrzését.

11. Miután a „PAXgene Blood RNA Part A” protokoll befejeződött, nyissa ki a QIAcube Connect MDx készülék ajtaját (lásd 15. ábra, 59. oldal). Távolítsa el és dobja ki a spin oszlopokat (PRC) a rotoradapterekből, és az üres feldolgozócsöveket (Processing Tube, PT) a rázógépből.



Futtatás közben a készülék áthelyezi a spin oszlopokat a rotoradapter 1. pozíciójából (L1 kupakpozíció) a rotoradapter 3. pozíciójába (L2 kupakpozíció)(lásd 20. ábra, 65. oldal).

12. Zárja le a tisztított RNS-t tartalmazó összes 1,5 ml-es mikrocentrifuga-cső (MCT) kupakját a rotoradapterekben (3. pozíció, L3 kupakpozíció, lásd 20. ábra, 65. oldal). Helyezze át az 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csőveket (MCT) a QIAcube Connect MDx rázógépadapterére (lásd 18. ábra, 63. oldal).
13. Csukja le a QIAcube Connect MDx készülék fedelét (lásd 15. ábra, 59. oldal).
14. Válassza ki a „PAXgene Blood RNA Part B” protokollt, és indítsa el.

Kövesse a QIAcube Connect MDx készülék érintőképernyőjén megjelenő utasításokat.



Ez a program 65 °C-on inkubálja a mintákat, és denaturálja az RNS-t a downstream alkalmazások számára. Még ha a későbbi, downstream alkalmazásnak része is egy hődenaturációs lépés, akkor se hagyja ki ezt a lépést. Ezen a ponton az elégséges RNS-denaturáció elengedhetetlen a maximális hatékonysághoz a downstream alkalmazásokban.

15. Miután a „PAXgene Blood RNA Part B” program befejeződött, nyissa ki a QIAcube Connect MDx készülék ajtaját (lásd 15. ábra, 59. oldal). Haladéktalanul helyezze jégre a tisztított RNS-t tartalmazó mikrocentrifuga-csőveket (microcentrifuge tube, MCT).



**VIGYÁZAT:** Forró felület. A rázógép akár 70 °C hőmérsékletűre is felforrósodhat. Ne érjen a felforrósodott eszközhöz.



Ne hagyja benne a tisztított RNS-t a QIAcube Connect MDx készülékben. Mivel a minták nincsenek hűtve, a tisztított RNS lebomolhat. Ezért nem ajánlott felügyelet nélkül hagyott, éjszakai mintafuttatásokat elindítani.

16. Ha az RNS-mintákat nem használja fel azonnal, tárolja azokat  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on vagy  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on.

Mivel az RNS ismételt felolvasztás és visszafagyasztás után is denaturált marad, nem szükséges megismételni a hőinkubációs protokollt („PAXgene Blood RNA Part B”). Ha diagnosztikai assay-hez használja az RNS mintákat, kövesse a gyártótól kapott instrukciókat.

Az RNS 260 nm-en mért abszorbancia általi mennyiségi meghatározásának pontossága érdekében azt javasoljuk, hígítsa a mintákat 10 mM-os, 7,5 pH-jú Tris-HCl oldattal.\* A minták RNase-Free Water vízben való hígítása pontatlan, túl alacsony értékekhez vezethet.

Nullázza le a spektrofotométert egy vak minta segítségével, amely ugyanolyan arányban tartalmaz eluáló puffert (BR5) és Tris-HCl puffert, mint a mérendő minták. Az eluáló puffer (BR5) abszorbanciája magas 220 nm-en, ami magas háttér abszorbanciaszintekhez vezethet, ha a spektrofotométer nem lett megfelelően lenullázva.



A Tris-HCl pufferben történő mennyiségi meghatározáshoz használja az alábbi összefüggést:

$$A_{260} = 1 \Rightarrow 44\text{ }\mu\text{g/ml. Lásd „B” függelék, 78. oldal.}$$

17. Távolítsa el a reagenspalackok tartóállványát a QIAcube Connect MDx készülék munkaasztaláról (lásd 18. ábra, 63. oldal), és zárja le az összes palackot a megfelelően feliratozott kupakkal. Zárja vissza a puffert és az RNase-Free Water vizet tartalmazó összes palackot, az enzimeket és enzimpuffereket tartalmazó üvegeket és csöveket, valamint a kitből származó, a protokollhoz használt műanyagot tartalmazó zsákokat. A kit többi részét és a reagenspalackokat tárolja

\* Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. További információk a megfelelő biztonsági adatlapokon (Safety Data Sheets, SDS-ek) találhatóak, amelyek az adott termék gyártójától szerezhetők be.

a „A reagensek tárolása és kezelése” (22. oldal) és a „Felbontás utáni stabilitás” (22. oldal) részben leírtaknak megfelelően a következő használatig.

Távolítsa el és dobja ki a feldolgozócsövekben (Processing Tube, PT) és a QIAcube Connect MDx mikrocentrifuga-csővek (microcentrifuge tube, MCT) nyílásaiban maradt reagenseket. Távolítsa el a centrifugából a rotoradptereket, majd dobja ki őket. Üritse ki a QIAcube Connect MDx készülék hulladékfiókját (lásd 15. ábra, 59. oldal). Zárja le a készülék fedelét, és kapcsolja ki a készüléket a főkapcsolóval.

## A termék használatának korlátai

A PAXgene Blood RNA Kit a humán teljes vérből ( $4,8 \times 10^6$  –  $1,1 \times 10^7$  leukocita/ml) származó intracelluláris RNS izolálására szolgál in vitro diagnosztikai alkalmazásokhoz. Nem alkalmas azonban genomális DNS vagy vírus-nukleinsavak humán teljes vérből való izolálására. A stabilizáció részletes leírásához validált géntranszkriptek korlátozott száma miatt (FOS és IL1B géntranszkriptek) a teljesítményjellemzőket nem állapították meg minden transzkriptre. A felhasználóknak át kell tekinteniük a gyártó adatait és saját adataikat annak eldöntéséhez, hogy szükséges-e más transzkriptek esetében is elvégezni a validálást. A kit összetevői csak a használati útmutatóban leírt manuális és automatizált protokollokban használatosak.

A PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek használatával kapcsolatos információkat lásd a *PAXgene Blood RNA Tube kézikönyvben*.

## Minőség-ellenőrzés

A QIAGEN ISO-minősített minőségirányítási rendszerének megfelelően a PAXgene Blood RNA Kit minden egyes gyártási tételét leellenőrzik, hogy az megfelel-e az előírt paramétereknek, ezzel biztosítva a termék állandó és kifogástalan minőségét.



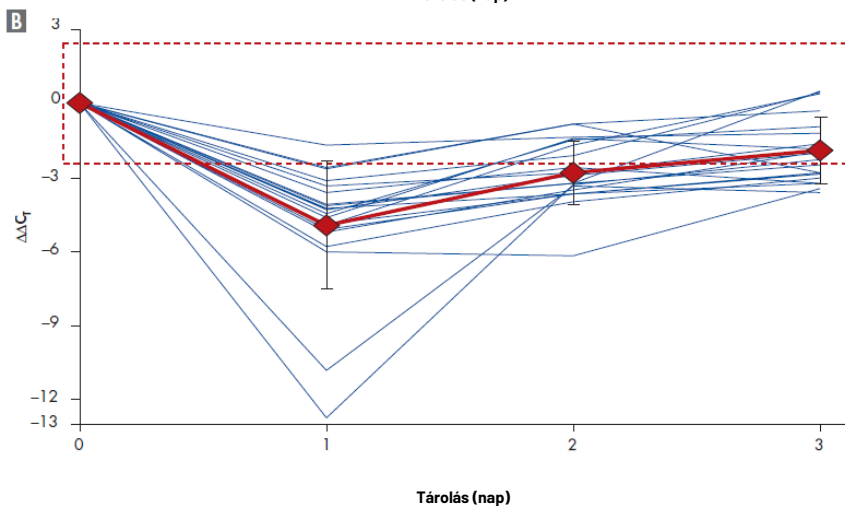
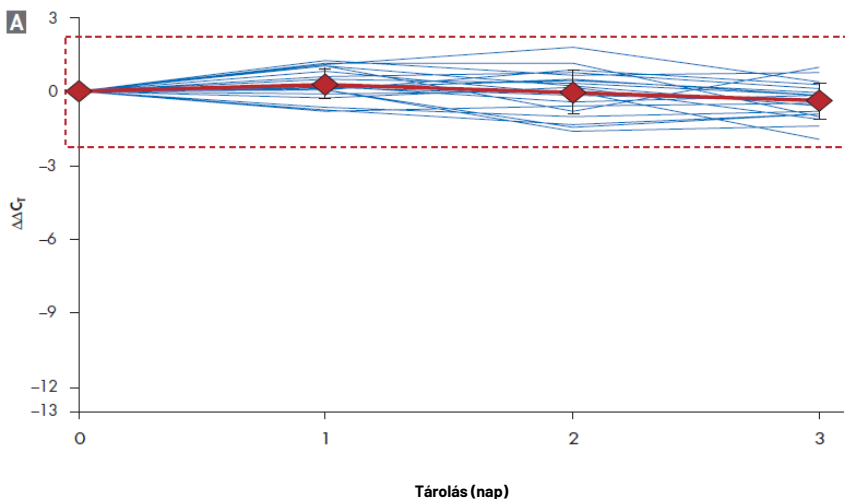
# Teljesítményjellemzők

## Mintavétel és -stabilizálás

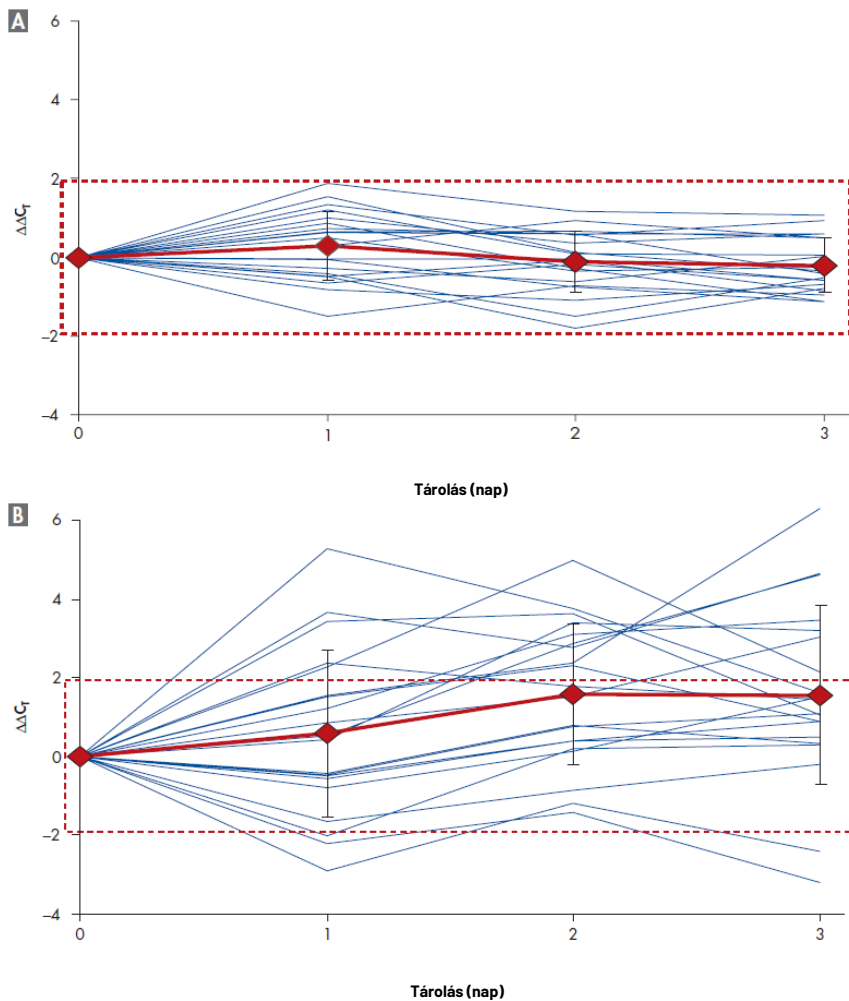
A PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek egy szabadalmazott RNS-stabilizálási reagenst tartalmaznak. Ez az adalékanyag megvédi az RNS molekulákat az RNázok általi lebomlástól, és minimalizálja a génexpresszió ex vivo változásait. A PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek rendeltetése a humán teljesvérminták gyűjtése és a celluláris RNS stabilizálása 3 napig 18–25 °C-on (4. ábra, 42. oldal és 5. ábra, 43. oldal) vagy akár 5 napig 2–8 °C-on (6. ábra, 44. oldal és 7. ábra, 45. oldal). Ezenkívül a stabilizált vér fagyaszttá tárolható. A jelenleg rendelkezésre álló adatok tanúsága szerint a celluláris RNS legalább 11 évre stabilizálható –20 °C-on vagy –70 °C-on\*. A hosszabb időtartamú stabilitást kiértékelő, jelenleg is folyó vizsgálatokkal kapcsolatos további információkért látogasson el a [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) oldalra vagy lépjen kapcsolatba a QIAGEN műszaki ügyfélszolgálatával.

Az RNS stabilizálás tényleges időtartama változhat a celluláris RNS típusától és a használt downstream alkalmazástól függően. A stabilizáció részletes leírásához validált géntranszkriptek korlátozott száma miatt (FOS és IL1B géntranszkriptek) a teljesítményjellemzőket nem állapították meg minden transzkriptre. A felhasználóknak át kell tekinteniük a gyártó adatait és saját adataikat annak eldöntéséhez, hogy szükséges-e más transzkriptek esetében is elvégezni a validálást.

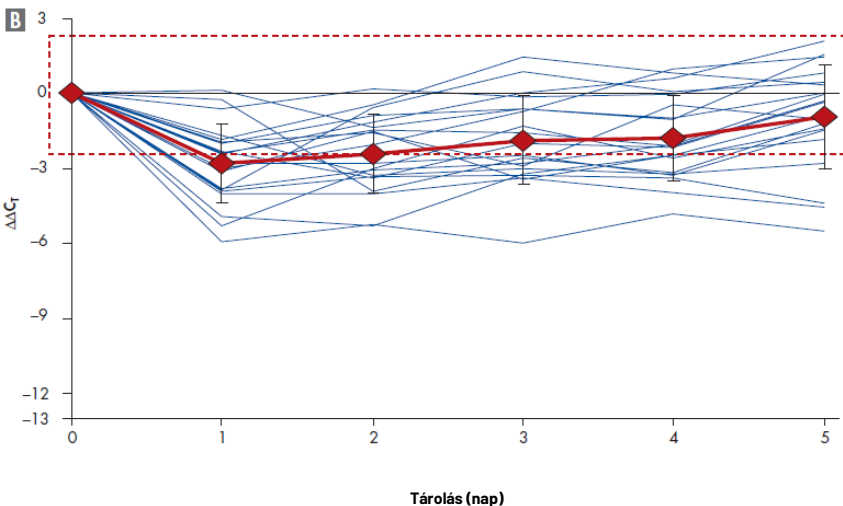
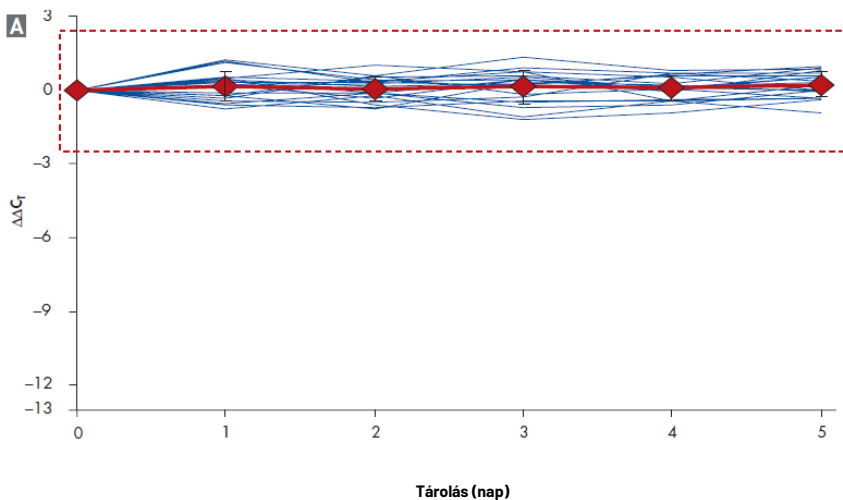
\* Jelenleg is folyik a PAXgene Blood RNA Tubes mintacsövekben való vértárolás hosszú távú vizsgálata.



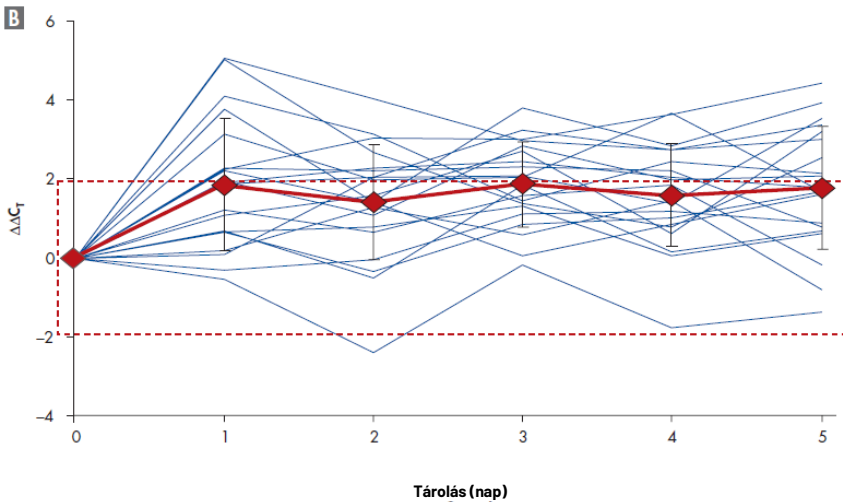
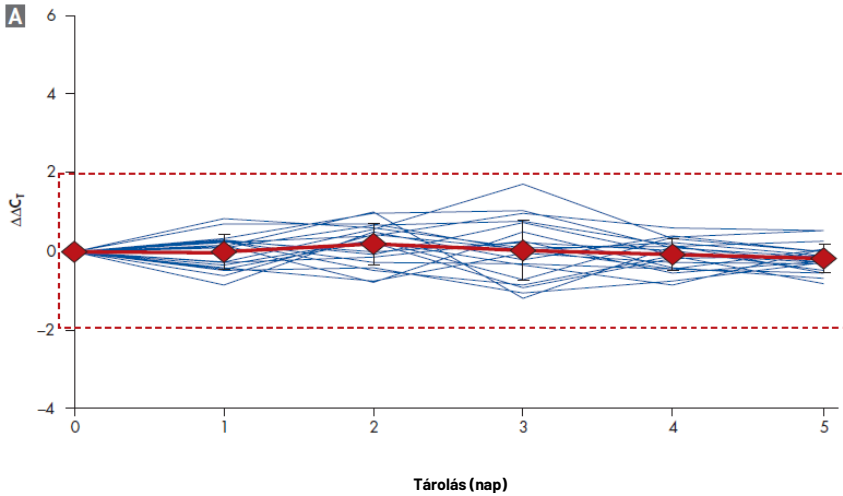
**4. ábra: Az RNS stabilitása 18–25 °C-on tárolt vérmintákban: FOS.** 10 egészségesnek tűnő donortól vettek két-két párhuzamos vérmintát, és a mintákat 18–25 °C-on tárolták a jelzett számú napon át, amit teljes RNS-izolálás követett. **[A]** A levett vért PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekben gyűjtötték és tárolták, a teljes RNS-t pedig a PAXgene Blood RNA Kit használatával tisztították meg. **[B]** A levett vért szabványos mintacsövekben gyűjtötték és tárolták, véralvadásgátlóként EDTA hozzáadásával, a teljes RNS-t pedig egy standard szerves izolációs módszer segítségével tisztították meg, szilikamembrán-alapú RNS-tisztítással. A FOS relatív transzkript szintjeit real-time, duplex RT-PCR segítségével határozták meg, 18S rRNS-t használva belső standardként. Minden egyes minta átlagértéke és az értékek szórása is látható a diagramokon. A szaggatott vonalak az assay  $\pm 3\times$  teljes precizitását jelzik ( $2,34 C_t$ ).



5. ábra: Az RNS stabilitása 18–25 °C-on tárolt vérmintákban: IL1B. Vért vettek, és teljes RNS-t tisztítottak belőle 18–25 °C-on való tárolás után, az 4. ábránál feltüntetettek szerint. Az IL1B relatív transzkript szintjeit real-time, duplex RT-PCR segítségével határozták meg, 18S rRNS-t használva belső standardként. Minden egyes minta átlagértéke és az értékek szórása is látható a diagramokon. A szaggatott vonalak az assay  $\pm 3\times$  teljes precizitását jelzik (1,93 Ct).



**6. ábra: Az RNS stabilitása 2–8 °C-on tárolt vérmintákban: FOS.** 10 donortól vettek két-két párhuzamos vérmintát, és 2–8 °C-on tárolták a mintákat a jelzett számú napon át, amit teljes RNS-izolálás követett. **[A]** A levett vért PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekben gyűjtötték és tárolták, a teljes RNS-t pedig a PAXgene Blood RNA Kit használatával tisztították meg. **[B]** A levett vért szabványos mintacsövekben gyűjtötték és tárolták, véralvadásgátlóként EDTA hozzáadásával, a teljes RNS-t pedig egy standard szerves extrakciós módszer segítségével tisztították meg, szilikamembrán-alapú RNS-izolálással. A FOS relatív transzkript szintjeit real-time, duplex RT-PCR segítségével határozták meg, 18S rRNS-t használva belső standardként. Minden egyes minta átlagértéke és az értékek szórása is látható a diagramokon. A szaggatott vonalak az assay  $\pm 3\times$  teljes precizitását jelzik (2,34  $C_T$ ).



**7. ábra: Az RNS stabilitása 2–8 °C-on tárolt vérmintákban: IL1B.** Vért vettek, és teljes RNS-t tisztítottak belőle 2–8°C-on való tárolás után, az 6. ábránál feltüntetettek szerint. Az IL1B relatív transzkript szintjeit real-time, duplex RT-PCR segítségével határozták meg, 18S rRNS-t használva belső standardként. Minden egyes minta átlagértéke és az értékek szórása is látható a diagramokon. A szaggatott vonalak az assay  $\pm 3\times$  teljes precizitását jelzik ( $1,93 C_T$ ).

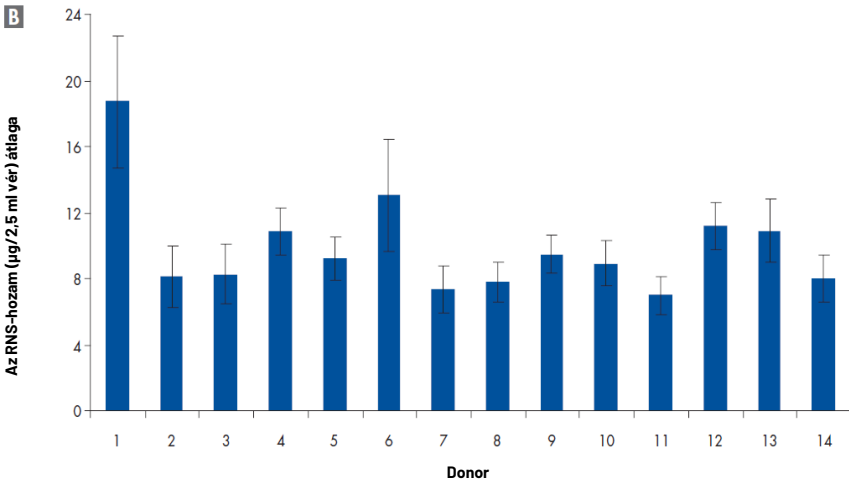
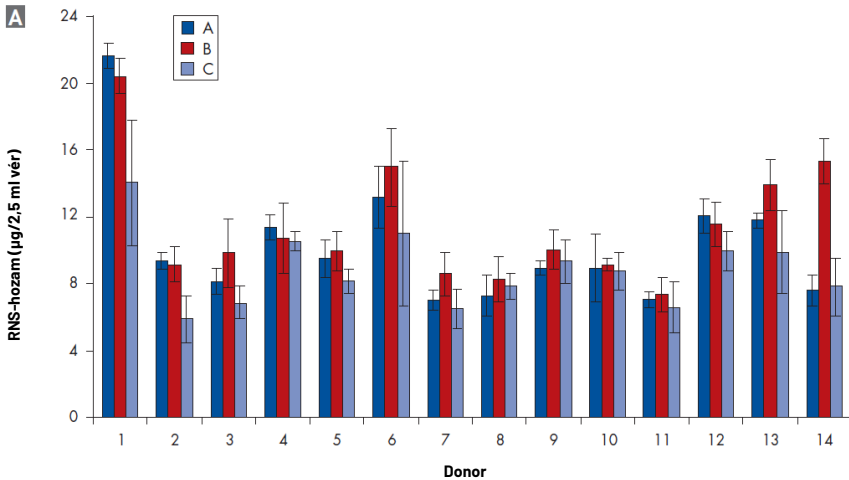
## Manuális RNS-izolálás

A PAXgene Blood RNA System használatával izolált teljes RNS tiszta és szennyeződésmentes. A manuális protokoll használatával a kapott  $A_{260}/A_{280}$  értékek 1,8 és 2,2 közé esnek, és  $\leq 1\%$  (w/w) genomialis DNS van jelen az összes minta  $\geq 95\%$ -ában, a béta-aktin gén egy szekvenciájának kvantitatív, real-time PCR-rel történő mérése alapján. A minták legalább 95%-a nem mutat gátlást RT-PCR-ben, amikor az eluátum az RT-PCR reakciós térfogat max. 30%-át teszi ki.

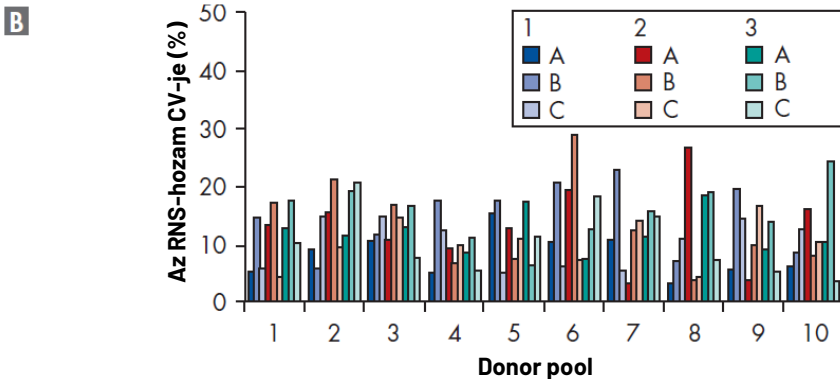
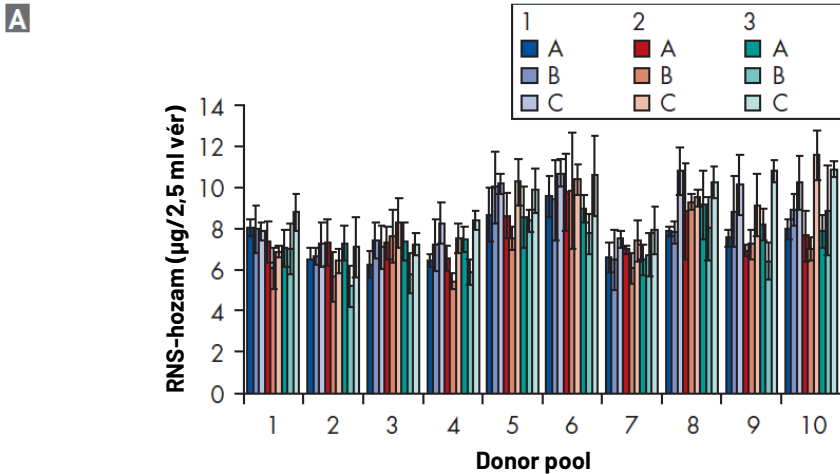
A manuális protokoll használatával az átlagos minta-előkészítési idő (12 minta-előkészítés futtatásának adatai alapján) körülbelül 90 perc\*, amelyből csupán 40 perc a ténylegesen manuális munkával töltött idő. Az RNS-hozam 2,5 ml egészséges humán teljes vérből  $\geq 3 \mu\text{g}$  a feldolgozott minták  $\geq 95\%$ -ánál. Mivel a hozam erősen donorfüggő, az egyes hozamok mértéke változó lehet. Az egyes donorok esetében a PAXgene Blood RNA System igen jól reprodukálható és megismételhető hozamokat biztosít (8. ábra, 47. oldal és 9. ábra, 48. oldal), és reprodukálható és megismételhető RT-PCR reakciót eredményez (10. ábra, 52. oldal és 11. ábra, 53. oldal), ami igen megbízható eljárássá teszi a klinikai diagnosztikai vizsgálatok között.

A 8. ábra (47. oldal) mutatja a PAXgene Blood RNA System teljes megismételhetőségét és reprodukálhatóságát. További tanulmányokat végeztek, hogy kimutassák, milyen hatással vannak a különböző PAXgene Blood RNA kit tételek és a kísérletet végző különböző személyek az RNS-hozam és a real-time RT-PCR futtatás teljesítményének reprodukálhatóságára. Ezen vizsgálatokhoz poolozott vérmintákat használtak az egyedi PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek mintái helyett, így a kapott eredmények nem tükrözik a rendszer megismételhetőségét – az egyes vérvételek közötti ingadozásokat is beleértve –, csupán a minta-előkészítés megismételhetőségét (lásd 9. ábra, 48. oldal).

\* A teljes protokoll futási ideje, beleértve a PAXgene Blood RNA Tubes mintacsövek előzetes kezelését is (centrifugálás, pelletmosás és -újrasuszpendálás).



**8. ábra: Reprodukálható és megismételhető RNS-izolálás.** Összesen 14 donortól vettek négy-négy párhuzamos vérmintát, amelyeket manuálisan dolgozott fel 3 szaktechnikus (A, B, C). Három külön eszközkészletet használtak, és az egyes technikusok által előkészített mintákat ugyanazon eszközzel dolgozták fel. [A] Az ábrán az azonos donortól származó párhuzamos minták különböző szaktechnikusok által nyert RNS-hozamának átlagértékei és szórásai láthatók. [B] A 14 donor mindegyikétől vett tizenkét párhuzamos vérmintát 3 különböző technikus dolgozta fel. Az ábrán az azonos donortól származó minták és az összes szaktechnikus által nyert RNS-hozamok átlagértékei és szórásai láthatók. Az  $A_{280}/A_{280}$  arányok az összes RNS-minta esetében 1,8 és 2,2 közé estek.



9. ábra: Az RNS-hozam megismételhetősége és reprodukálhatósága a különböző kezelők és PAXgene Blood RNA Kit tételek esetében, poolozott vérminták használatával. 30 különböző donortól származó vérmintákat PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekbe gyűjtötték (BRT;12 tesztsző donoronként, összesen 360 tesztsző). 3 donoronként a tesztszővek tartalmát egybeöntötték, majd azt követően újra szétadagolták 36 alikvotba. A 3 donortól származó 36 minta poolját azután manuálisan dolgozta fel 3 különböző kezelő. Minden egyes kezelő 3 különböző tételből származó PAXgene Blood RNA Kitet használt az RNS izolálásához, és a 10 donor mintapool mindegyikéből négy párhuzamos mintát dolgozott fel. [A] Az RNS-hozam átlaga és szórása az összes kezelő-tétel kombináció esetében. 3 különböző kezelő (A, B, C) dolgozta fel a 10 donor mintapool négy párhuzamos vérmintáját a 3 tételből származó kitek (1, 2, 3) mindegyikével. Az ábrán az ugyanazon donor pooljából származó négy párhuzamos minta átlag hozamai (oszlopok) és szórásai (hibasávok) láthatók a különböző kezelők és különböző tételek esetében. [B] A donor-poolonkénti RNS-hozam CV-je az összes kezelő-tétel kombináció (A, B, C; 1, 2, 3) esetében, a 9A. ábrán látható átlag hozamok és szórásaik alapján számolva.



**1A. táblázat: Reprodukálhatóság az egyes tételeken és az egyes felhasználókon belül, kiválasztott donor mintapoolok (1, 6, 9, 10) esetében**

Adatkombináció	1. donor-pool ( $5,1 \times 10^6$ sejt/ml)			6. donor-pool ( $6,5 \times 10^6$ sejt/ml)		
	Átlag hozam ( $\mu\text{g}$ )	Szórás ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Átlag hozam ( $\mu\text{g}$ )	Szórás ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
1. tétel, A felhasználó	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
1. tétel, B felhasználó	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
1. tétel, C felhasználó	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
2. tétel, A felhasználó	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
2. tétel, B felhasználó	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
2. tétel, C felhasználó	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
3. tétel, A felhasználó	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
3. tétel, B felhasználó	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
3. tétel, C felhasználó	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
Adatkombináció	9. donor-pool ( $8,4 \times 10^6$ sejt/ml)			10. donor-pool ( $10,2 \times 10^6$ sejt/ml)		
	Átlag hozam ( $\mu\text{g}$ )	Szórás ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Átlag hozam ( $\mu\text{g}$ )	Szórás ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
1. tétel, A felhasználó	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
1. tétel, B felhasználó	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
1. tétel, C felhasználó	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
2. tétel, A felhasználó	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
2. tétel, B felhasználó	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
2. tétel, C felhasználó	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
3. tétel, A felhasználó	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
3. tétel, B felhasználó	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
3. tétel, C felhasználó	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3

**1B: Reprodukálhatóság az egyes felhasználókon belül az összes tétel között, kiválasztott donor mintapoolok (1, 6, 9, 10) esetében**

Adatkombináció	1. donor-pool ( $5,1 \times 10^6$ sejt/ml)			6. donor-pool ( $6,5 \times 10^6$ sejt/ml)		
	Átlag hozam ( $\mu\text{g}$ )	Szórás ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Átlag hozam ( $\mu\text{g}$ )	Szórás ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
A felhasználó, az összes tétel	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
B felhasználó, az összes tétel	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
C felhasználó, az összes tétel	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Adatkombináció	9. donor-pool ( $8,4 \times 10^6$ sejt/ml)			10. donor-pool ( $10,2 \times 10^6$ sejt/ml)		
	Átlag hozam ( $\mu\text{g}$ )	Szórás ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Átlag hozam ( $\mu\text{g}$ )	Szórás ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
A felhasználó, az összes tétel	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
B felhasználó, az összes tétel	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
C felhasználó, az összes tétel	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

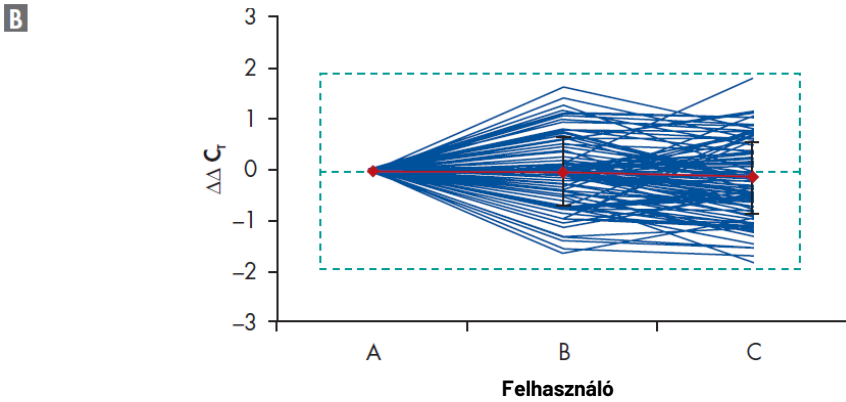
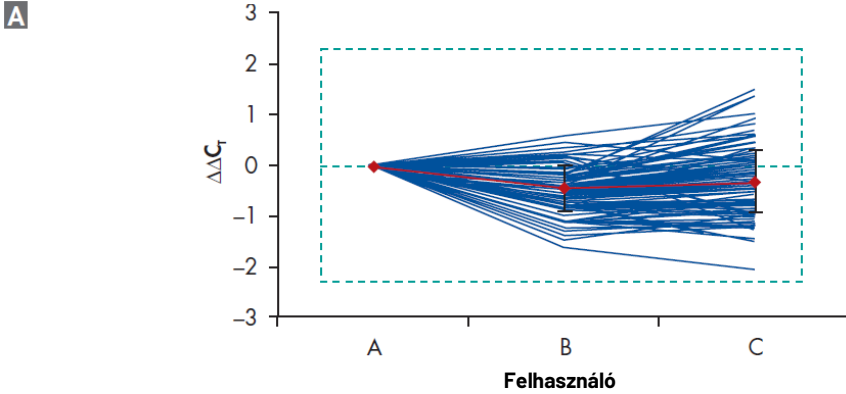
**1C: Reprodukálhatóság az egyes tételeken belül az összes felhasználó között, kiválasztott donor mintapoolok (1, 6, 9, 10) esetében**

Adatkombináció	1. donor-pool ( $5,1 \times 10^6$ sejt/ml)			6. donor-pool ( $6,5 \times 10^6$ sejt/ml)		
	Átlag hozam ( $\mu\text{g}$ )	Szórás ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Átlag hozam ( $\mu\text{g}$ )	Szórás ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
1. tétel, az összes felhasználó	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
2. tétel, az összes felhasználó	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
3. tétel, az összes felhasználó	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Adatkombináció	9. donor-pool ( $8,4 \times 10^6$ sejt/ml)			10. donor-pool ( $10,2 \times 10^6$ sejt/ml)		
	Átlag hozam ( $\mu\text{g}$ )	Szórás ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Átlag hozam ( $\mu\text{g}$ )	Szórás ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
1. tétel, az összes felhasználó	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
2. tétel, az összes felhasználó	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
3. tétel, az összes felhasználó	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

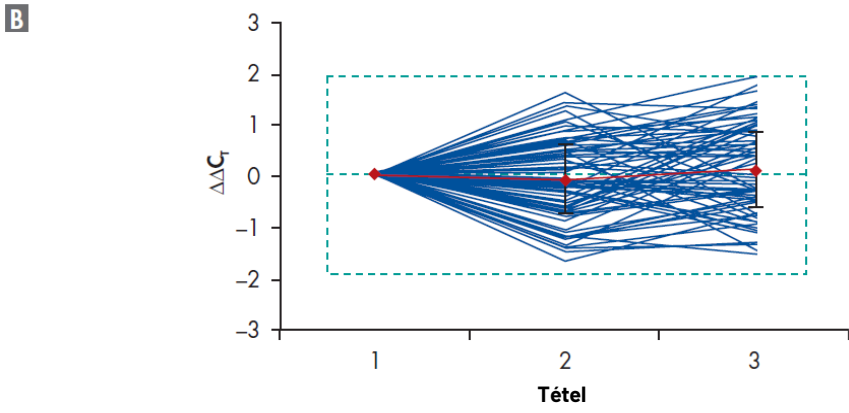
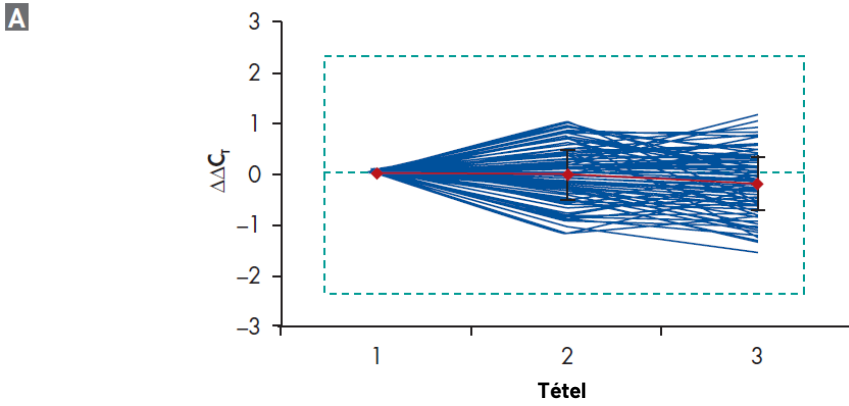
**1D: Reprodukálhatóság az összes tétel és az összes felhasználó között, kiválasztott donor mintapoolok (1, 6, 9, 10) esetében**

Adatkombináció	1. donor-pool ( $5,1 \times 10^6$ sejt/ml)			6. donor-pool ( $6,5 \times 10^6$ sejt/ml)		
	Átlag hozam ( $\mu\text{g}$ )	Szórás ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Átlag hozam ( $\mu\text{g}$ )	Szórás ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
1. tétel, az összes felhasználó	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
	9. donor-pool ( $8,4 \times 10^6$ sejt/ml)			10. donor-pool ( $10,2 \times 10^6$ sejt/ml)		
	Átlag hozam ( $\mu\text{g}$ )	Szórás ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Átlag hozam ( $\mu\text{g}$ )	Szórás ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
1. tétel, az összes felhasználó	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

A 4 reprezentatív donor pool részletes analízise. A poolok a fehérvérsejtszám alapján lettek kiválasztva úgy, hogy a fehérvérsejtszám normál tartományának ( $4,8 \times 10^6$  –  $1,1 \times 10^7$  leukocita/ml) felső, közép- és alsó értékeit tükrözzék. A feltüntetett fehérvérsejtszám a donor poolonkénti 3 donor 3 fehérvérsejt-számlálásának átlagértéke.



**10. ábra: Az RT-PCR reprodukálhatósága – a felhasználók között.** A real-time RT-PCR-hez a 9. ábránál vázolt kísérlet során tisztított RNS-t használták fel. Az [A] FOS és [B] IL1B relatív transzkript szintjeit real-time, duplex RT-PCR segítségével határozták meg, 18S rRNS-t használva belső standardként. A diagramok az összes minta értékeit ábrázolják az „A” felhasználó értékeinek függvényében (10 donor pool  $\times$  3 kit-tétel  $\times$  4 párhuzamos minta = 120 adatsor génenként), feltüntetve az összes minta átlagait (vörös vonalak) és szórásait (fekete sávok). A szaggatott vonalak az assay  $\pm 3x$  teljes precizitását jelzik (FOS: 2,34  $C_T$ ; IL1B: 1,93  $C_T$ ).



**11. ábra: Az RT-PCR reprodukálhatósága – a kit-tételek között.** A real-time RT-PCR-hez a 9. ábránál vázolt kísérlet során tisztított RNS-t használták fel. Az **[A]** FOS és **[B]** IL1B relatív transzkript szintjeit real-time, duplex RT-PCR segítségével határozták meg, 18S rRNS-t használva belső standardként. A diagramok az összes minta értékeit ábrázolják az 1. kit-tétel értékeinek függvényében (10 donor pool × 3 felhasználó × 4 párhuzamos minta = 120 adatsor génenként), feltüntetve az összes minta átlagait (vörös vonalak) és szórásait (fekete sávok). A szaggatott vonalak az assay ±3x teljes precizitását jelzik (FOS: 2,34  $C_t$ ; IL1B: 1,93  $C_t$ ).

2. táblázat: A 10. ábra és a 11. Ábra RT-PCR adatainak összefoglalása

Tesztrendszer	FOS/18S rRNS assay		IL1B/18S rRNS assay	
Az adatok összehasonlítása	Átlag ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ Szórás ( $\Delta\Delta C_T$ )	Átlag ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ Szórás ( $\Delta\Delta C_T$ )
<b>Reprodukálhatóság az egyes felhasználókon belül az összes tétel között</b>				
Minden felhasználó, 1. tétel–1. tétel	0,00	0,00	0,00	0,00
Minden felhasználó, 1. tétel–2. tétel	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Minden felhasználó, 1. tétel–3. tétel	-0,21	0,52	0,11	0,71
<b>Reprodukálhatóság az egyes felhasználókon belül az összes tétel között</b>				
Minden tétel, A felhasználó–A felhasználó	0,00	0,00	0,00	0,00
Minden tétel, A felhasználó–B felhasználó	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Minden tétel, A felhasználó–C felhasználó	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Felhasználó: Az a szaktechnikus, aki elvégezte a vizsgálatot.

Tétel: A vizsgálat során használt kit-tétel száma.

Szórás: Standard deviáció (SD).

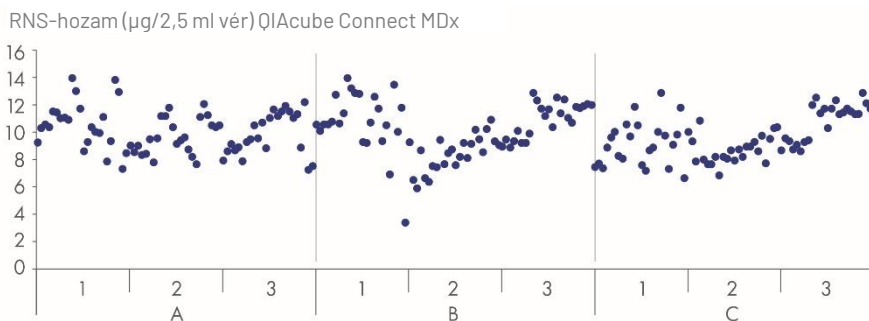
Az átlag  $\Delta\Delta C_T$  értékek (N = 120) és a szórások a 10. ábra és 11. ábra adataira vonatkoznak.

## Automatizált RNS-izolálás

Az RNS-hozam 2,5 ml egészséges humán teljes vérből  $\geq 3 \mu\text{g}$  a feldolgozott minták  $\geq 95\%$ -ánál. A 12. ábra (55. oldal) mutatja az automatizált protokoll alkalmazásával, 3 kezelő által és 3 kit-tétel használatával előkészített, összesen 216 db mintából származó RNS-hozamokat. Mivel az egyedi PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek helyett poolozott vérmintákat használtak ezekhez a vizsgálatokhoz, az eredmények nem tükrözik az egyedi vérvételek mintáiból várható RNS-hozamot. Mivel a hozam erősen donorfüggő, az egyes hozamok mértéke változó lehet (12. ábra, 55. oldal).

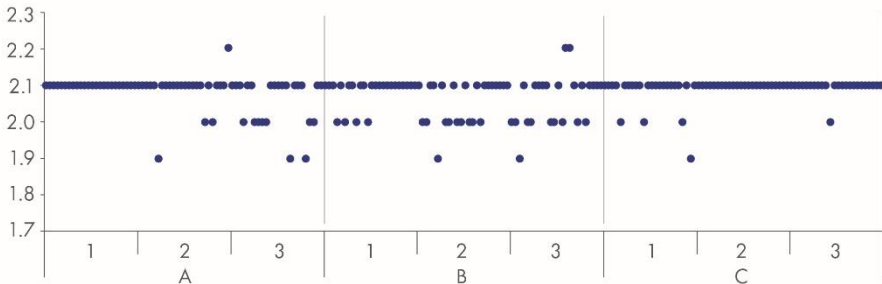
A minták legalább 95%-a nem mutat gátlást RT-PCR-ben, amikor az eluátum az RT-PCR reakciós térfogat max. 30%-át teszi ki. Az automatizált protokoll használatával nem detektálható a minták között keresztszennyeződés ABL1 és FOS transzkriptek szekvenciáinak kvantitatív, real-time RT-PCR vizsgálata alapján, ahol RNS-negatív minták (víz) RNS-pozitív mintákkal (humán teljes vér) lettek párosítva ugyanabban a futtatásban.

A PAXgene Blood RNA System felhasználásával automatizált protokoll során izolált RNS tiszta, amint azt az RT-PCR inhibíció hiánya, valamint az  $A_{260}/A_{280}$  értékek 1,8 és 2,2 közötti értéke is mutatja. Genomiális DNS  $\leq 1\%$  (w/w) mértékben van jelen az összes minta  $\geq 95\%$ -ában, a béta-aktin gén egy meghatározott szekvenciájának kvantitatív, real-time PCR-rel való mérése alapján. A 13. ábra és a 14. ábra (56. oldal) bemutatja az automatizált protokoll alkalmazásával, 3 kezelő által és 3 kit-tétel használatával előkészített, összesen 216 db minta  $A_{260}/A_{280}$  értékeit és relatív genomiális DNS-eit.



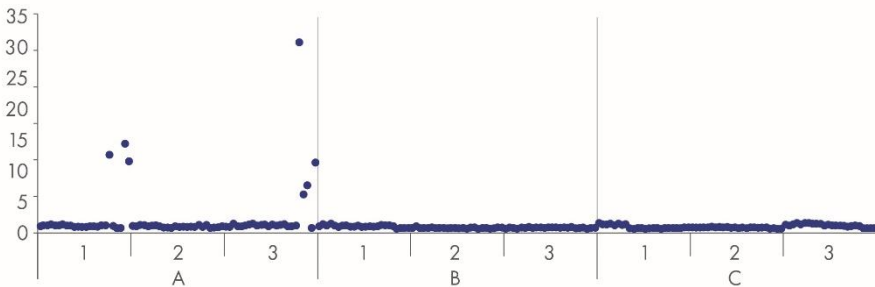
**12. ábra: RNS-hozam – automatizált feldolgozás QIAcube Connect MDx készülékkel.** Az egyes donoroktól történő vérmintagyűjtés PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekbe történt. A tesztcsövek tartalmának egybeöntésével létrehoztak 6 donor poolt, majd ezt követően a poolokat újra szétadagolták. A 3 különböző kezelő (A, B, C) összesen 216 csövet (azaz poolonként 36 mintát) dolgozott fel. Minden egyes kezelő 3 különböző tételből (1, 2, 3) származó PAXgene Blood RNA Kitet használt a QIAcube Connect MDx készülékkel végzett automatizált izoláláshoz, és a 6 donor mintapool mindegyikéből négy párhuzamos mintát dolgozott fel. Az ábrán látható az összes egyedi minta RNS-hozama minden kezelő-tétel kombináció esetén.

#### RNS-tisztaság ( $A_{260}/A_{280}$ ) QIAcube Connect MDx



**13. ábra:** RNS-tisztaság ( $A_{260}/A_{280}$  értékek) – automatizált feldolgozás a QIAcube Connect MDx készülékkel. Az RNS-t 3 különböző kezelő (A, B, C) tisztította meg, a PAXgene Blood RNA Kit 3 különböző tétele (1, 2, 3) használatával, a QIAcube Connect MDx készüléken, a 12. ábránál leírt kísérlet során. Az ábrán látható az összes egyedi minta  $A_{260}/A_{280}$  értéke minden kezelő-tétel kombináció esetén.

#### Genomiális DNS [%] (w/w) QIAcube Connect MDx



**14. ábra:** RNS-tisztaság (%-os genomiális DNS fertőzöttség) – automatizált feldolgozás a QIAcube Connect MDx készülékkel. Az RNS-t 3 különböző kezelő (A, B, C) tisztította meg, a PAXgene Blood RNA Kit 3 különböző tétele (1, 2, 3) használatával, a QIAcube Connect MDx készüléken, a 12. ábránál leírt kísérlet során. Az ábrán látható az összes egyedi minta genomiális DNS mennyisége (w/w) minden kezelő-tétel kombináció esetén.

A PAXgene Blood RNA System automatizált protokollját használó RNS-izolálás jól reprodukálható és megismételhető RT-PCR eredményeket biztosít, ami igen robusztus eljárássá teszi a klinikai diagnosztikai vizsgálatokban.



## Az izolált RNS stabilitása

A PAXgene Blood RNA Tubes mintacsövekbe töltött vérből, a PAXgene Blood RNA Kit segítségével izolált RNS minták 5 éves tárolási ideig stabilak  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, illetve 7 éves tárolási ideig  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on (a vizsgálatok végpontja).

# Fontos megjegyzések

## A QIAcube Connect MDx készülék használata

Győződjön meg róla, hogy tisztában van a QIAcube Connect MDx készülék működtetésének módjával. Kérjük, olvassa el a készülék felhasználói kézikönyvét és a készülékhez mellékelte bármely további tájékoztatót, különös figyelmet fordítva a biztonsági információkra, mielőtt nekikezdene az automatizált PAXgene Blood RNA protokoll használatának.

## A QIAcube Connect MDx készülék elindítása

Zárja be a QIAcube Connect MDx készülék fedelét, és kapcsolja be a készüléket a főkapcsolóval (lásd 15. ábra, 59. oldal).

Sípoló hang hallatszik, és megjelenik az indulóképernyő. A készülék automatikusan elvégzi az inicializálási teszteket.



A QIAcube Connect MDx előlnézetben



Kihúzott érintőképernyő



A QIAcube Connect MDx hátulnézetben (bal oldal)



A QIAcube Connect MDx hátulnézetben (jobb oldal)

15. ábra: A QIAcube Connect MDx készülék külső jellemzői.

- |   |  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>① Érintőképernyő</li> <li>② Fedél</li> <li>③ Hulladékfiók</li> <li>④ Főkapcsoló</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>⑤ 2 USB-port az érintőképernyő bal oldalán; 2 USB-port az érintőképernyő mögött (Wi-Fi modul 1 USB-porthoz csatlakoztatva)</li> <li>⑥ RJ-45 Ethernet-port</li> <li>⑦ Tápkábelaljzat</li> <li>⑧ Hűtőlevegő kivezetése</li> </ul> |
|---|--|

## Érintőképernyő

A QIAcube Connect MDx érintőképernyővel vezérelhető. Az érintőképernyő teszi lehetővé a felhasználó számára a készülék használatát, valamint végigvezeti a felhasználót a munkaasztal beállítási lépésein. A mintafeldolgozás alatt az érintőképernyő a protokoll állapotát és a hátralévő időt mutatja.



16. ábra: A QIAcube Connect MDx készülék kihúzott érintőképernyője.

## Protokollok telepítése a QIAcube Connect MDx készülékre

Előfordulhat, hogy telepíteni kell a protokollokat, mielőtt futtathatná az első RNS-előkészítést a QIAcube Connect MDx készüléken. Telepítse a „PAXgene Blood RNA Part A” és „PAXgene Blood RNA Part B” protokollt egyaránt.

A QIAcube Connect MDx készülék protokolljai a **www.qiagen.com** weboldalon találhatóak meg, és a készülékhez mellékelt USB-adathordozóra kell azokat letölteni. Ezek a protokollok az USB-porton keresztül vihetők át a készülékre.

Az érintő képernyő oldalán található USB-porton (lásd 15. ábra, 59. oldal) keresztül csatlakoztathatja a QIAcube Connect MDx készülékhez a hozzá mellékelt USB-adathordozót. Az USB-porton keresztül adatfájlok, például naplófájlok vagy jelentésfájlok is átvihetők a készülékekről az USB-adathordozóra.



Az USB-portot kizárólag a QIAGEN által biztosított USB-adathordozóval használja. Ne csatlakoztasson más eszközöket ehhez a porthoz.



Ne távolítsa el az USB-adathordozót, miközben protokollokat tölt le, adatfájlokat másol át, vagy protokollt futtat.

A protokollok QIAcube Connect MDx készülékekre történő feltöltésére vonatkozó további részletek a készülék felhasználói kézikönyvében találhatóak.

## A QIAcube Connect MDx készülék betöltése

Hogy időt takarítson meg, az előkészítést a „Protokoll: Teljes RNS automatizált izolálása PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekbe gyűjtött humán teljes vérből” című fejezetben (32. oldal) bemutatott egyik vagy mindkét 10 perces centrifugálási lépés alatt is elvégezheti (3. és 5. lépés).

### Reagenspalackok

A QIAcube Connect MDx készüléken való minden futtatás előtt gondosan töltsse fel a 4 db reagenspalackot a 3. táblázatban (62. oldal) felsorolt reagensekkel a maximum szintet jelző vonalig, vagy ha ez nem lehetséges, akkor addig a szintig, amit a PAXgene Blood RNA Kitben kapott puffertérfogatok lehetővé tesznek. Világosan és egyértelműen tüntesse fel a palackokon és kupakjukon az adott puffer nevét, és helyezze a feltöltött reagenspalackokat a megfelelő pozícióba a reagenspalackok tartóállványán. Helyezze rá a tartóállványt a készülék munkaasztalára, amint azt a 17. ábra (62. oldal) és a 18. ábra mutatja (63. oldal).



A kitben található BR2 puffer térfogata nem elegendő ahhoz, hogy a jelleg feltöltse a reagenspalackot. A BR3 és BR4 pufferek nem feltétlenül elegendők ahhoz, hogy a jelleg feltöltsék a reagenspalackokat, ha a korábbi futtatásokban már számos mintát feldolgoztak.



Ügyeljen rá, hogy eltávolítsa a palackok kupakját, mielőtt ráhelyezi őket a munkaasztalra.



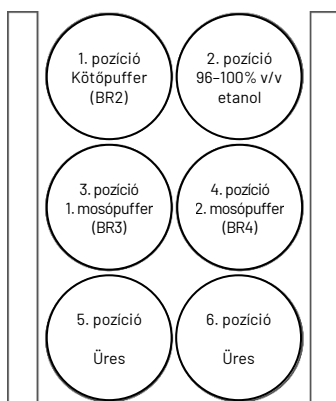
A PAXgene Blood RNA Kitben (50) rendelkezésre álló puffertérfogatok maximum 7 RNS-izolálási futtatásra elegendőek a QIAcube Connect MDx készüléken futtatásonként 2 és 12 közötti mintaszám mellett. Általánosságban kerülni kell a kisebb mintaszámú futtatásokat a készletenkénti összesen 50 minta feldolgozása érdekében. A több mint 7 RNS-izolálási futtatás ahhoz vezethet, hogy az utolsó minták feldolgozásához már nem marad elegendő térfogatú puffer.

### 3. táblázat: Pozíciók a reagenspalackok tartóállványán

Pozíció	Reagens
1	Kötőpuffer (BR2)
2	Etanol (96-100% v/v)
3	1. mosópuffer (BR3)
4	2. mosópuffer (BR4)*
5	– (hagyja üresen)
6	– (hagyja üresen)

\* A 2. mosópuffer (BR4) tömény formában található a kitben. Az első használat előtt adjon hozzá 4-szeres térfogatú (96-100% v/v, analitikai tisztaságú) etanolt a palackon feltüntetettek szerint a munkaoldat előállításához.

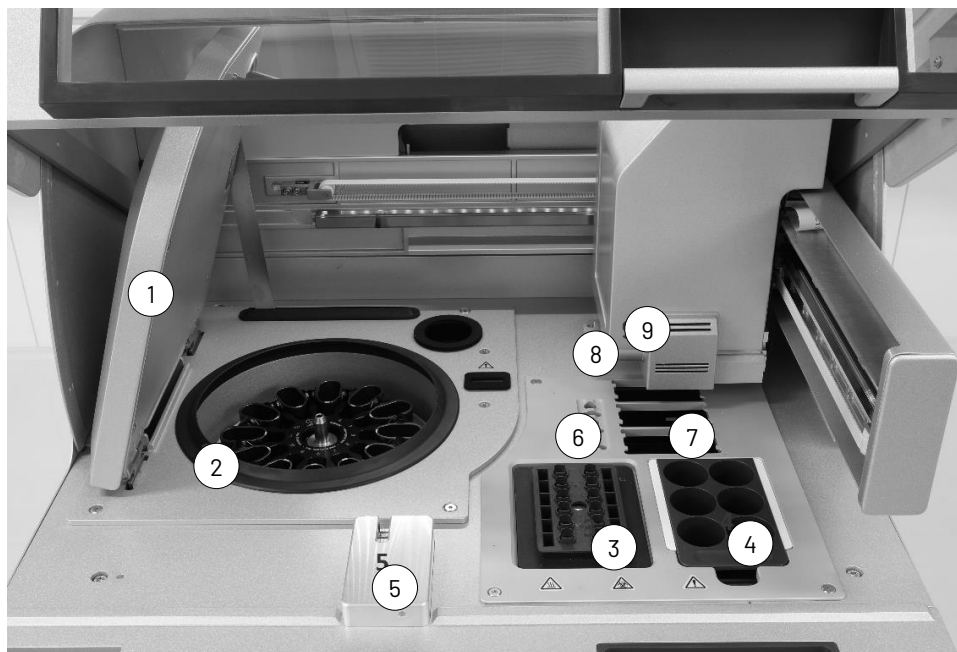
**A**



**B**



**17. ábra: A reagenspalackok tartóállványának betöltése. [A]** A reagenspalackok tartóállványán elhelyezendő palackok pozíciójának és tartalmának sematikus ábrája. **[B]** A tartóállvány ráhelyezése a QIAcube Connect MDx munkaasztalára.



18. ábra: A QIAcube Connect MDx belseje.

- |   |                                |   |  |
|---|--------------------------------|---|--|
| ① | Centrifugafedél                | ⑥ | MCT nyílások   |
| ② | Centrifuga                     | ⑦ | 3 nyílás a hegytartó állványok számára   |
| ③ | Rázógép                        | ⑧ | Pipettahegyek és oszlopok kidobására szolgáló nyílások   |
| ④ | Reagenspalackok tartóállványa  | ⑨ | Robotkar (részei: 1 csatornás pipetta, fogóegység, ultrahangos és optikai szenzor és UV LED-világítás) |
| ⑤ | Pipettahegyszensor és fedélzár |   |  |

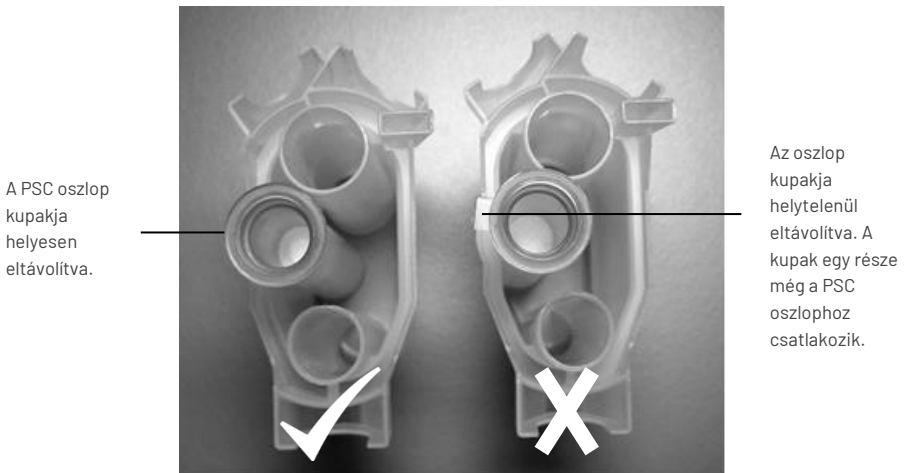
## Spin oszlopok (PSC, PRC), MCT és QIAcube Connect MDx műanyag eszközök

Helyezzen 2 db, 1000 µl-es szűrős pipettahegyekkel megtöltött hegytartó állványt a QIAcube Connect MDx készülékre (lásd 18. ábra, 63. oldal). Amikor szükséges, töltsse fel újra pipettahegyekkel a tartóállványokat.

**i** Kizárólag QIAcube Connect MDx készülékkel való használatra tervezett, 1000 µl szűrős pipettahegyeket használjon.

Alkoholos filctollal jelölje meg minden egyes mintához a rotoradaptereket és mikrocentrifuga-csőveket (microcentrifuge tube, MCT). Nyissa fel a használandó spin oszlopokat (PSC), és ollóval vágja le teljesen a kupakjukat (lásd 19. ábra).

**i** Ahhoz, hogy a QIAcube Connect MDx készülék robotkarja megfelelően működjön, teljesen távolítsa el (vágja le) a kupakokat és a kupakot a spin oszlophoz (PSC) rögzítő minden műanyag részt (lásd 19. ábra). Máskülönben a robotkar nem tudja megfelelően megragadni a PSC oszlopot.



**19. ábra: A PSC behelyezése.** A spin oszlopot (PSC) a rotoradapter középső pozíciójába kell behelyezni. A PSC oszlop behelyezése előtt vágja le a kupakját.



Helyezze be a PAXgene Shredder spin column (PSC) oszlopot (kupak nélkül, lásd 19. ábra, 64. oldal), a PAXgene RNA spin column (PRC) oszlopot és a feliratozott mikrocentrifuga-csővet (microcentrifuge tube, MCT) minden egyes jelölt rotoradapter megfelelő pozíciójába, a 4. táblázatban és a 20. ábrán feltüntetettek szerint.

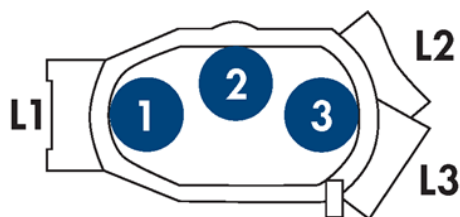


Ügyeljen rá, hogy a spin oszlop (PRC) és a mikrocentrifuga-cső (microcentrifuge tube, MCT) kupakja egészen le legyen nyomva a rotoradapter szélén lévő nyílások aljáig, máskülönben a kupakok le fognak törni a centrifugálás közben.

#### 4. táblázat: Műanyag fogyóeszközök a rotoradapterben

Pozíció	Reagens	Kupakpozíció
1	PAXgene RNA spin oszlop (vörös, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder spin oszlop (lila, PSC) (vágja le a kupakját, mielőtt behelyezi a rotoradapterbe)	-
3	MCT*	L3

\* A PAXgene Blood RNA Kitben található (1,5 ml-es) mikrocentrifuga-csőveket (MCT) használja.



20. ábra: Pozíciók a rotoradapterben. A rotoradapterben 3 csőpozíció (1–3) és három kupakpozíció (L1–L3) van.

## A centrifuga előkészítése

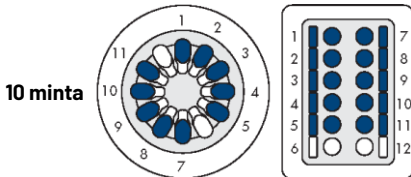
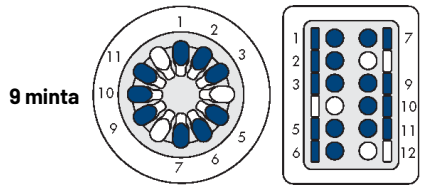
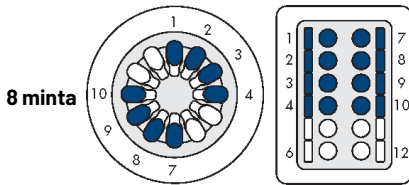
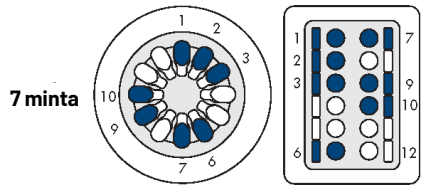
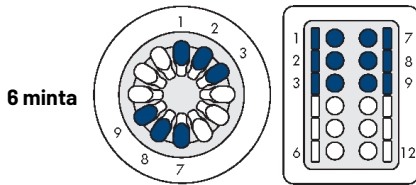
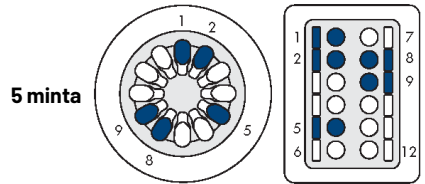
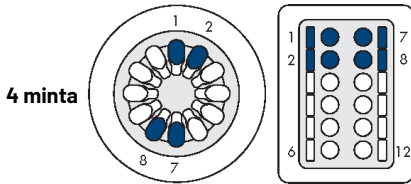
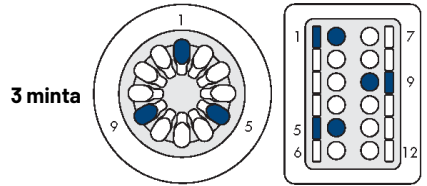
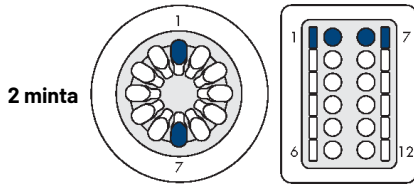
Helyezze be az összeszerelt rotoradaptereket a QIAcube Connect MDx centrifugakosaraiba az alábbiakban, a 21. ábrán bemutatott módon.



Ha 12 db mintánál kevesebbet dolgoz fel, ügyeljen rá, hogy sugarasan kiegyensúlyozva töltsse be az adaptereket a centrifuga rotorjába (lásd 22. ábra, 67. oldal). Az összes centrifugakosarat be kell helyezni, mielőtt elindítana egy protokolfuttatást, még akkor is, ha kevesebb mint 12 mintát kell feldolgoznia. Egyetlen (egy) minta vagy 11 minta nem dolgozható fel.



**21. ábra:** A centrifuga előkészítése a QIAcube Connect MDx készüléken. Helyezze be az összeszerelt rotoradaptereket a centrifuga kosaraiba.



22. ábra: A centrifuga és a rázógép előkészítése. Az ábrán láthatók a centrifuga és rázógép alkalmazandó pozíciói két (2) és tíz (10) közötti darabszámú minta feldolgozásához. Egy (1) vagy 11 minta nem dolgozható fel. 12 minta feldolgozásához a centrifuga és a rázógép minden pozícióját fel kell tölteni (nincs bemutatva).

## Feldolgozócsövek (Processing Tube, PT)

Távolítsa el az előző futtatások után esetleg a mikrocentrifuga-csővek (microcentrifuge tube, MCT) nyílásaiban hagyott feldolgozócsöveket (Processing Tube, PT)(lásd 18. ábra, 63. oldal). Töltsön fel 3 db feldolgozócsövet (Processing Tube, PT) az 5. táblázatban megadott mennyiségű reagensekkel a futtatás során feldolgozandó minták számának megfelelően.

A DNáz I inkubációs elegy elkészítéséhez pipettázza a jelzett térfogatú DNS emésztőpuffert (RDD) egy feldolgozócsöbe (PT), és adja hozzá a jelzett térfogatú DNáz I (RNFD) törzsoldatot. Egy 1000 µl-es pipettahegy segítségével 3-szor felszívva és kinyomva finoman keverje össze az elegyet.



A PAXgene Blood RNA Kitben található 2 ml-es feldolgozócsöveket (PT) használja. Egyértelműen tüntesse fel a csöveken a bennük lévő reagens nevét, és helyezze őket a mikrocentrifuga-csőveknek (microcentrifuge tube, MCT) kialakított nyílások megfelelő pozícióiba, a 6. táblázatban jelzettek szerint (69. oldal).



A DNáz I (RNFD) különösen érzékeny a fizikai denaturációra. Kizárólag óvatos pipettázással keverje össze, széles belső átmérőjű pipettahegyeket használva, hogy csökkentse a nyíróerőt. Ne vortexelje.

Ügyeljen rá, hogy csak a kívánt térfogatot pipettázza, az alábbi 5. táblázatban feltüntetetteknek megfelelően.

5. táblázat: A mikrocentrifuga-csővek (microcentrifuge tube, MCT) nyílásaiba helyezett feldolgozócsövekbe pipettázandó szükséges reagenstérfogatok

Mintaszám	Reagenstérfogat a jelzett mintaszám esetén (µl)		
	Proteináz K (PK)	DNáz I inkubációs elegy	Eluáló puffer (BR5)
2	126	187 (23 DNáz I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNáz I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNáz I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNáz I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNáz I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNáz I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNáz I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNáz I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNáz I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNáz I + 806 Buffer RDD)	1177

6. táblázat: MCT nyílások

	Pozíció		
	A	B	C
Tartalom	Proteináz K	DNáz I inkubációs elegy	Eluáló puffer (BR5)
Edény	Feldolgozócső (Processing Tube, PT)*	Feldolgozócső (Processing Tube, PT)*	Feldolgozócső (Processing Tube, PT)*

\* A PAXgene Blood RNA Kitben található 2 ml-es feldolgozócsöveket (PT) használja.

# Ártalmatlanítás

A mintagyűjtés és manuális RNS-izolálás utáni biztonságos hulladékkezelés érdekében olvassa el a biztonsági információkat a 18. oldalon és az óvintézkedéseket a 19. oldalon.

Ezenkívül a QIAcube Connect MDx készülékkel végzett automatizált RNS-izolálással kapcsolatosan a 21. ábra, 66. oldal és a 22. ábra, 67. oldal tartalmaz információkat, a használt pipettahegyek és oszlopok ártalmatlanítására szolgáló nyílások megjelölésével.

# Irodalomjegyzék

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.



# Hibaelhárítási útmutató

Ez a hibaelhárítási útmutató bármely felmerülő hiba esetén segíthet a megoldásban. További információkért kérjük, olvassa el műszaki támogatási oldalunkon a gyakran ismételt kérdéseket: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). A QIAGEN műszaki szolgálat kutató szakemberei örömmel állnak rendelkezésére, ha bármilyen kérdése van akár ennek a kézikönyvnek a tartalmával és a benne szereplő protokollokkal kapcsolatban, akár a mintafeldolgozási és assay módszerekkel kapcsolatban (az elérhetőség a kézikönyv utolsó oldalán vagy a következő címen található: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

Megjegyzések és javaslatok	
<b>Lebomlott RNS</b>	
a) RNáz-szennyezettség	 Ügyeljen rá, hogy ne vigyen be semennyi RNáz-t a reagensekbe az eljárás vagy a későbbi kezelés során (lásd „A” függelék, 77. oldal).
<b>Alacsony RNS-hozam</b>	
b) 2,5 ml-nél kevesebb vért vettek a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsőbe	 Ügyeljen rá, hogy 2,5 ml vér legyen véve a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsőbe (lásd a <i>PAXgene Blood RNA Tube</i> kézikönyvet).
c) Az RNS-koncentráció vízben lett mérve	 Az RNS-t 10 mM-os, 7,5* pH-jú Tris-HCl oldatban kell hígítani a pontos mennyiségi meghatározáshoz (lásd „B” függelék, 78. oldal).
d) Sejtörmelék került a PRC oszlopba a manuális protokoll 9. és 10. lépésében	 Lgyekezzen elkerülni a nagyobb részecskék átvitelét, amikor a manuális protokoll 7. lépésében pipettázza a felülűszót (az apró szemcsés törmelék átvitele nem befolyásolja hátrányosan az eljárást).
e) A felülűszó nem lett teljesen eltávolítva a 3. lépésben	 Ügyeljen rá, hogy a teljes felülűszó el legyen távolítva. Ha leönti a felülűszót, távolítsa el a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacső pereméről a cseppeket papírtörülő segítségével. Tegye meg a megfelelő óvintézkedéseket a keresztaszennyezés megelőzése érdekében.
f) A vért kevesebb mint 2 órán át inkubálták, miután levették a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsőbe	 Inkubálja a vért a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsőben legalább 2 órán át a levételt követően.

\* Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. További információk a megfelelő biztonsági adatlapokon (Safety Data Sheets, SDS-ek) találhatóak, amelyek az adott termék gyártójától szerezhetők be.






Megjegyzések és javaslatok	
<b>Alacsony <math>A_{260}/A_{280}</math> érték</b>	
g) Vizet használtak az RNS $A_{260}/A_{280}$ méréshez való hígításához	 Használjon 10 mM-os, 7,5 pH-jú Tris-HCl oldatot az RNS hígításához, mielőtt megmérné a tisztaságát* (lásd „B” függelék, 78. oldal).
h) A spektrofotométer nem lett megfelelően lenullázva	 Nullázza le a spektrofotométert egy vak minta segítségével, amely ugyanolyan arányban tartalmaz eluáló puffert (BR5) és 10 mM-os, 7,5 pH-jú Tris-HCl puffert, mint a mérendő minták. Az eluáló puffer (BR5) abszorbanciája magas 220 nm-en, ami magas háttér abszorbanciaszintekhez vezethet, ha a spektrofotométer nem lett megfelelően lenullázva.
<b>A készülék hibás működése</b>	
i) A QIAcube Connect MDx készülék nem működik megfelelően	Olvassa el a <i>QIAcube Connect MDx felhasználói kézikönyvet</i> , különös figyelmet fordítva a Hibaelhárítás című fejezetre. Ügyeljen rá, hogy a készülék megfelelően karban legyen tartva, a felhasználói kézikönyvben leírtaknak megfelelően.

\* 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.

# Szimbólumok

A használati útmutatóban, a csomagoláson és a címkéken az alábbi szimbólumok szerepelhetnek. A további szimbólumok magyarázata a A kit tartalma című részben található (6).

Szimbólum	Szimbólum definíciója
V<N1>	A termék <N1>. verziója
 <N2>	<N2> teszthez elegendő reagenst tartalmaz
	Olvassa el a használati útmutatót
	Lejárat dátum
<b>IVD</b>	In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszköz
<b>REF</b>	Katalógusszám
<b>LOT</b>	Sarzsorszám
<b>MAT</b>	Anyagszám
<b>COMP</b>	Komponensek
<b>NUM</b>	Szám
<b>KU</b>	Kunitz-egységek
<b>ADD</b>	Hozzáadva
<b>CONT</b>	Tartalmazott anyag
<b>RCNS</b>	Feloldással előkészített

**DNase**

Dezoxi-ribonukleáz I

**EtOH**

Etanol

**GITC**

Guanidin-izotiocianát

**RNase-Free DNase Set**

RNase-Free DNase Set

**GTIN**

Globális kereskedelmi áruazonosító szám



Hőmérsékleti korlátozás



Felső hőmérsékleti korlát



Gyártó

**EC REP**

Hivatalos európai képviselő a 2017/746 számú (EU) rendeletnek megfelelően



Fontos megjegyzés



Etanol hozzáadása

**CE**

CE-jelölés. Ez a termék megfelel az in vitro diagnosztikai orvostechnikai eszközökre vonatkozó 2017/746 számú (EU) rendelet követelményeinek.

**UDI**

Egyedi eszközazonosító



Figyelem



VIGYÁZAT: Forró felület

## Kapcsolatfelvételi adatok

A QIAGEN vállalatnál büszkék vagyunk az általunk nyújtott műszaki támogatás elérhetőségére és magas színvonalára. Műszaki ügyfélszolgálati részlegeinken a molekuláris biológia, illetve a PreAnalytiX termékek használata terén kiterjedt gyakorlati és elméleti ismeretekkel rendelkező, tapasztalt kutató szakemberek dolgoznak. Ha bármilyen kérdése lenne a PAXgene Blood RNA Kit használatával kapcsolatban, forduljon hozzánk bizalommal.

Műszaki segítségnyújtásért és további információkért tekintse meg műszaki támogatásunk weblapját a **[www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support)** címen, hívja a 00800-22-44-6000 telefonszámot, vagy forduljon a QIAGEN valamelyik műszaki szervizosztályához vagy a területileg illetékes forgalmazóhoz (lásd a hátsó borítón vagy a **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)** webhelyen).

# „A” függelék: Általános megjegyzések az RNS kezeléséről

## Az RNS kezelése



A ribonukleázok (RNázok) nagyon stabil és aktív enzimek, amelyekhez általában nincsen szükség kofaktorokra. Mivel az RNázokat nehéz inaktiválni, és még parányi mennyiségben is képesek lebontani az RNS-t, soha ne használja úgy a műanyag- vagy üvegeszközöket, hogy előtte nem távolította el a lehetséges RNáz-szennyeződések. Nagy gondossággal kell eljárni, nehogy véletlenül RNáz-t vigyen be egy RNS mintába az izolálási eljárás alatt vagy után. Az RNáz-mentes környezet létrehozása és fenntartása érdekében óvintézkedések szükségesek az eldobható és többször használható edények és oldatok előkezelése és használata során, amikor RNS-sel dolgozik.

## Általános kezelés



Mindig megfelelő aseptikus mikrobiológiai technikát kell alkalmazni az RNS-sel való munkálatok során. A kéz és a porrészeccskék baktériumokat és penészgombákat hordoznak, és ezek az RNáz-szennyeződés legáltalánosabb forrásai. A bőrfelületről vagy a poros laboratóriumi eszközökről származó RNáz-szennyeződések átvitelének megakadályozása céljából a reagensek és RNS-minták kezelésekor mindig viseljen latex- vagy vinilkesztyűt. Gyakran váltson kesztyűt, és amikor csak lehetséges, tartsa lezárva a csöveket. Amikor a további alkalmazások számára alikvotokat pipettáz, a tisztított RNS-t tartsa jégen.

Az üvegeszközök és oldatok RNáz-szennyezettségének megszüntetésére szolgáló protokollok megtalálhatók az általános molekuláris biológiai kézikönyvekben, mint például: Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

# „B” függelék: A teljes RNS mennyiségi és minőségi meghatározása

## Az RNS mennyiségi meghatározása

Az RNS koncentrációját spektrofotométerrel, a minta 260 nm-en ( $A_{260}$ ) mért abszorbanciája alapján kell meghatározni. A szignifikancia biztosítása érdekében a leolvasásokat a spektrofotométer lineáris mérési tartományában kell végezni. A 260 nm-en mért 1 egységnyi abszorbancia megfelel 44  $\mu\text{g}$  RNS/ml koncentrációnak ( $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ ). Ez az összefüggés csak a 10 mM-os, 7,5 pH-jú Tris-HCl\* oldatban végzett mérésekre érvényes. Ezért ha hígítani kell az RNS mintát, azt 10 mM-os Tris-HCl oldattal tegye. Az alább tárgyaltaknak megfelelően (lásd „Az RNS tisztasága”, 79. oldal) a 260 és 280 nm-en mért abszorbanciaértékek aránya alapján megbecsülhető az RNS tisztasága. Az RNS minták mérésekor ügyeljen rá, hogy a küetták RNáz-mentesek legyenek. Nullázza le a spektrofotométert egy vak minta segítségével, amely ugyanolyan arányban tartalmaz eluáló puffert (BR5) és Tris-HCl puffert, mint a mérendő minták. Az eluáló puffer (BR5) abszorbanciája magas 220 nm-en, ami magas háttér abszorbanciaszintekhez vezethet, ha a spektrofotométer nem lett megfelelően lenullázva. Alább láthatja az RNS mennyiségi meghatározásához szükséges számítások egy példáját.

$$\begin{aligned} \text{Az RNS minta térfogata} &= 80 \mu\text{l} \\ \text{Hígítás (1/15)} &= 10 \mu\text{l RNS-minta} + 140 \mu\text{l 10 mM-os Tris-HCl, pH 7,5} \\ \text{Mérje meg a hígított minta abszorbanciáját egy (RNáz-mentes) küettában.} & \\ A_{260} &= 0,3 \\ \text{A minta koncentrációja} &= 44 \times A_{260} \times \text{hígítási faktor} \\ &= 44 \times 0,3 \times 15 \\ &= 198 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

\* Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. További információk a megfelelő biztonsági adatlapokon (Safety Data Sheets, SDS-ek) találhatóak, amelyek az adott termék gyártójától szerezhetők be.

$$\begin{aligned}\text{Teljes hozam} &= \text{koncentráció} \times \text{mintatérfogat milliliterben} \\ &= 198 \mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml} \\ &= 15,8 \mu\text{g RNS}\end{aligned}$$

## Az RNS tisztasága

A 260 nm-en és 280 nm-en végzett leolvasások eredményeinek aránya ( $A_{260}/A_{280}$ ) alapján megbecsülhető az RNS tisztasága olyan szennyezőanyagok vonatkozásában, amelyek elnyelik az UV-fényt, mint például a proteinek. Az  $A_{260}/A_{280}$  arányt azonban jelentős mértékben befolyásolja a pH. Az alacsonyabb pH-érték alacsonyabb  $A_{260}/A_{280}$  arányt, és a proteinszennyezettség iránti csökkent érzékenységet eredményez.\* Annak érdekében, hogy pontos értékeket kapjon, azt javasoljuk, hogy 10 mM-os, 7,5 pH-jú Tris-HCl oldatban mérje az abszorbanciát. A tiszta RNS  $A_{260}/A_{280}$  aránya 10 mM-os, 7,5 pH-jú Tris-HCl oldatban 1,8–2,2 közé esik. Nullázza le a spektrofotométert egy vak minta segítségével, amely ugyanolyan arányban tartalmaz eluáló puffert (BR5) és Tris-HCl puffert, mint a mérendő minták. Az eluáló puffer (BR5) abszorbanciája magas 220 nm-en, ami magas háttér abszorbanciaszintekhez vezethet, ha a spektrofotométer nem lett megfelelően lenullázva.

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

# „C” függelék: A PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek kezelése



A BD alábbi javaslatok hasznosak lehetnek a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek kezelése során. A PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek használatával kapcsolatos további információkat lásd a *PAXgene Blood RNA Tube kézikönyvben*.

## Instrukciók a BD Hemogard zárókupak eltávolításához

1. Egyik kezével fogja meg a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) csövet, és helyezze a hüvelykujját a BD Hemogard zárókupak alá. (A stabilitás növelése érdekében támassza a karját egy szilárd felületre.) A másik kezével csavarja el a BD Hemogard zárókupakot, és ezzel egyidejűleg nyomja felfelé a hüvelykujját, de csak addig, amíg a mintacső gumidugója meg nem lazul.
2. Mozdítsa el a hüvelykujját, mielőtt felemelné a zárókupakot. Ne használja a hüvelykujját a zárókupak PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsőről való letolásához. Figyelem: Ha a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) cső vért tartalmaz, számolni kell a fertőzésveszélynek való expozíció kockázatával. A zárókupak eltávolítása közbeni egészségkárosodás megelőzése érdekében fontos, hogy a zárókupak felnyomásához használt hüvelykujjat azonnal vegye el a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) csőről, amint a BD Hemogard zárókupak meglazul.
3. Emelje le a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) cső zárókupakját. Abban a valószínűtlen esetben, ha a műanyag kupak elválna a gumidugótól, ne szerelje újra össze a zárókupakot. Óvatosan távolítsa el a gumidugót a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) cső szájáról.



## **Instrukciók egy második BD Hemogard zárókupak felhelyezéséhez**

1. Cserélje ki a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) cső zárókupáját.
2. Csavaró mozdulattal határozottan nyomja lefelé, amíg a gumidugó újra teljesen illeszkedik. A gumidugó teljes illeszkedése szükséges ahhoz, hogy a zárókupak stabilan és biztonságosan rajta maradjon a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) csövön a kezelés közben.

## Rendelési információk

Termék	Tartalom	Katalógusszám
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 db PAXgene Spin Column oszlop, 50 db Shredder Spin Column oszlop, feldolgozócsövek, RNáz-mentes DNáz I, RNáz-mentes reagensek és pufferek. A PAXgene Blood RNA Tubes mintacsövekkel együtt használandók	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 db vérvételi cső	762165
<b>A QIAGEN-től rendelhető kapcsolódó termékek az automatizált RNS izoláláshoz a QIAcube készüléken</b>		
Starter Pack, QIAcube	A csomag tartalma: reagenspalack-tartóállványok (3); tartóállvány-címkéző csíkok (8); 200 µl-es szűrős pipettahegyek (1024); 1000 µl-es szűrős pipettahegyek (1024); 1000 µl-es, széles belső átmérőjű szűrős pipettahegyek (1024); 30 ml-es reagenspalackok (18); rotoradapterek (240); rotoradapter-tartó	990395
Filter-Tips, 1000 µL (1024)	Steril, egyszer használatos szűrős pipettahegyek, tartóállványban	990352
Reagent Bottles, 30 mL (6)	Reagenspalackok (30 ml) kupakkal; 6-os csomagban; a QIAcube reagenspalack-tartóállvánnyal való használatra	990393
Rotor Adapters (10 × 24)	240 minta-előkészítéshez: 240 db egyszer használatos rotoradapter; QIAcube készülékkel való használatra	990394
Reagent Bottle Rack	Tartóállvány 6 × 30 ml-es reagenspalack tárolására a QIAcube munkaasztalon	9026197
Rotor Adapter Holder	Tartóelem 12 db egyszer használatos rotoradapterhez; QIAcube készülékkel való használatra	990392

Termék	Tartalom	Katalógusszám
<b>A BD-től rendelhető kapcsolódó termékek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)* csövekkel történő vérvételhez</b>		
BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set	21G, 0,75 hüvelykes (0,8 × 19 mm) tű, 12 hüvelykes (305 mm) tömlő luer adapterrel; 50 db/ doboz, 200 db/csomag	367281/367286
BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set	21G, 0,8 × 19 mm-es tű, 305 mm-es cső luer adapterrel; 50 db/doboz, 200 db/csomag	367344
BD Vacutainer One-Use Holder	Csomag csak 13 mm és 16 mm átmérő esetén; 1000 db/csomag	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 × 75 mm-es, 4,0 ml-es vérvételi cső vörös BD Hemogard zárókupakkal és papírcímkével; 100 db/doboz, 1000 db/csomag	367812/368975
BD Vacutainer EST Tube	13 × 75 mm-es, 3,0 ml-es vérvételi cső átlátszó BD Hemogard zárókupakkal és átlátszó címkével; 100 db/doboz, 1000 db/csomag	362725
BD Vacutainer No Additive (Z) Tube	13 × 75 mm-es, 3,0 ml-es vérvételi cső átlátszó BD Hemogard zárókupakkal és papírcímkével; 100 db/doboz, 1000 db/csomag	366703

\* Ezek a vérvételi kiegészítők olyan tipikus termékek, amelyek nyugodtan használhatók a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) csövekkel. Ezen kiegészítővel kapcsolatos további információkért, a rendelés menetét is beleértve, látogasson el a [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) honlapra.

# Dokumentum átdolgozási előzményei

Dátum	Módosítások
[R1] 2022. április	Első IVDR kiadás
[R2] 2023. február	A PreAnalytiX GmbH címében az utca „Feldbachstrasse” helyett „Garstligweg 8”-ra változott. BD termékek hozzáadása a Rendelési információk részhez. A Biztonsági információk frissítése.

## Megjegyzések



A licenccel kapcsolatos legfrissebb információk és a termékspecifikus jogi nyilatkozatok a megfelelő PreAnalytiX vagy QIAGEN kit kézikönyvében vagy felhasználói útmutatójában található. A PreAnalytiX és QIAGEN kitek kézikönyvei és a felhasználói útmutatók elérhetők a [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) és a [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) webhelyen, vagy beszerezhetők a QIAGEN műszaki ügyfélszolgálatától vagy a területileg illetékes forgalmazótól.

**Better samples  
More to explore**

 **PreAnalytiX**  
A QIAGEN / BD Company

További információk: [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)

HB-3009-002 2023. 02.

Rendelés: [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Műszaki támogatás: [www.support.qiagen.com](http://www.support.qiagen.com) | Webhely: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)  
vagy [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)