

Februari 2023

Instruções de uso (Manual) do PAXgene[®] Blood RNA Kit



Versie 3 (V3)

IVD

Voor in-vitrodiagnostisch gebruik



REF

762174



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

EC REP

Geproduceerd door QIAGEN[®] GmbH voor PreAnalytiX GmbH
QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, DUITSLAND

R2

MAT

1130774NL

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

PreAnalytiX GmbH, 8634 Hombrechtikon, CH.

© 2023 PreAnalytiX GmbH. Tenzij anders vermeld, zijn PreAnalytiX, het PreAnalytiX-logo en alle overige handelsmerken eigendom van PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH.

Beperkte licentieovereenkomst voor de PAXgene Blood RNA Kit

Door dit product te gebruiken, verklaart de koper of gebruiker van het product zich akkoord met de volgende voorwaarden:

1. Het product mag uitsluitend worden gebruikt in overeenstemming met de protocollen die bij het product zijn meegeleverd en deze handleiding, en mag alleen worden gebruikt met componenten in het panel. PreAnalytiX® geeft onder haar intellectuele eigendom geen licentie om de bijgesloten onderdelen van deze panel te gebruiken of samen te stellen met onderdelen die niet bij de panel zijn meegeleverd behalve zoals beschreven in de protocollen die bij het product en deze handleiding zijn meegeleverd en in aanvullende protocollen die beschikbaar zijn op www.qiagen.com en www.preanalytix.com.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert PreAnalytiX niet dat deze kit en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Deze kit wordt in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mag niet worden hergebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. PreAnalytiX doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die worden genoemd of geïmpliceerd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van de kit gaan ermee akkoord dat zij geen stappen ondernemen of niemand anders toestaan stappen te ondernemen die tot bovenstaande verboden handelingen kunnen leiden of deze vergemakkelijken.
6. PreAnalytiX mag de verbodsbepalingen in deze beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten, inclusief advocaatkosten, verhalen bij elke rechtshandeling om deze beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht in verband met de kit en/of de componenten ervan af te dwingen.

Raadpleeg www.qiagen.com en www.preanalytix.com voor actuele licentievoorwaarden.

HB-3009-002 BD-8945 1130774NL © 2023 PreAnalytiX GmbH, alle rechten voorbehouden.

PreAnalytiX-distributeurs

PreAnalytiX-producten worden geproduceerd en gedistribueerd door QIAGEN en BD voor PreAnalytiX.

Inhoud

Inhoud.....	3
Beoogd gebruik.....	6
Beoogde gebruiker.....	6
Beschrijving en principe.....	7
Inleiding.....	7
Principe en procedure.....	7
Monsterafname en stabilisatie.....	8
RNA-isolatie.....	8
Handmatige RNA-isolatie.....	9
Geautomatiseerde RNA-isolatie.....	11
Meegeleverde materialen.....	14
Inhoud van de kit.....	14
Bestanddelen van de kit.....	15
Benodigde, maar niet-meegeleverde materialen.....	16
Voor alle protocollen.....	16
Voor het handmatige protocol.....	16
Voor het geautomatiseerde protocol.....	17
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen.....	18
Veiligheidsinformatie.....	18
Informatie voor noodgevallen.....	19
Voorzorgsmaatregelen.....	19
Opslag en hantering van reagentia.....	22

Stabiliteit tijdens gebruik	22
Afnemen, bewaren en verwerken van specimens	23
Protocol: Handmatige isolatie van totaal-RNA uit menselijk volbloed afgenomen in PAXgene Blood RNA Tubes	24
Protocol: Geautomatiseerde isolatie van totaal-RNA uit menselijk volbloed afgenomen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's).....	32
Beperkingen van het gebruik van het product	40
Kwaliteitscontrole	40
Prestatiekenmerken.....	41
Monsterafname en stabilisatie	41
Handmatige RNA-isolatie	46
Geautomatiseerde RNA-isolatie	55
Stabiliteit van geïsoleerd RNA	58
Belangrijke opmerkingen.....	59
De QIAcube Connect MDx gebruiken	59
De QIAcube Connect MDx opstarten.....	59
Protocollen installeren op de QIAcube Connect MDx	61
De QIAcube Connect MDx laden	62
Spinkolommen (PSC, PRC), MCT en plastic artikelen voor QIAcube Connect MDx	65
Afvoer	71
Referenties	72
Probleemoplossingsgids	73
Symbolen	75
Contactgegevens	77

Bijlage A: Algemene opmerkingen over de verwerking van RNA.....	78
Bijlage B: Kwantificatie en bepaling van de kwaliteit van totaal RNA.....	79
Bijlage C: Verwerking van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's).....	81
Bestelgegevens	83
Revisiegeschiedenis van document	85

Beoogd gebruik

Voor in-vitrodiagnostisch gebruik.

Het PAXgene Blood RNA System bestaat uit een bloedafnamebuisje (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) en nucleïnezuur-zuiveringskit (PAXgene Blood RNA Kit). Het is bedoeld voor de afname, opslag en transport van bloed en stabilisatie van intracellulair RNA in een gesloten buisje en de daarop volgende isolatie en zuivering van gastheer-RNA uit volbloed voor RT-PCR die wordt gebruikt voor moleculaire diagnostische tests.

Prestatiekenmerken van het PAXgene Blood RNA System zijn alleen bepaald met transcripten van het FOS- en IL1B-gen. Als gebruiker bent u zelf verantwoordelijk voor het vaststellen van de juiste prestatiekenmerken van het PAXgene Blood RNA System voor andere beoogde transcripten.

Indicaties voor gebruik

De PAXgene Blood RNA Kit is bedoeld voor de zuivering van intracellulair RNA uit volbloed dat is afgenomen in de PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Als de kit wordt gebruikt in combinatie met de PAXgene Blood RNA Tube (BRT), geeft het systeem gezuiverd intracellulair RNA uit volbloed voor RT-PCR dat wordt gebruikt bij moleculair diagnostisch testen.

Beoogde gebruiker

Het product is bedoeld voor gebruik door professionele gebruikers, zoals technici en artsen die zijn opgeleid in in-vitrodiagnostische procedures.

Deze kit is bestemd voor professioneel gebruik.

Beschrijving en principe

Inleiding

Het afnemen van volbloed is de eerste stap bij vele moleculaire assays die worden gebruikt om cellulair RNA te onderzoeken. De instabiliteit van het cellulaire RNA-profiel in vitro is echter een groot probleem bij dit soort experimenten. Onderzoeken van PreAnalytiX hebben aangetoond dat het aantal kopieën van individuele soorten mRNA in volbloed meer dan 1000 maal kunnen veranderen tijdens opslag of transport bij kamertemperatuur (Rainen et al., 2002). Dit wordt veroorzaakt door snelle RNA-degradatie en geïnduceerde expressie van bepaalde genen nadat het bloed is afgenomen. Deze veranderingen in het RNA-expressieprofiel maken betrouwbare onderzoeken naar genexpressie onmogelijk. Een methode om het RNA-expressieprofiel tijdens en na flebotomie te behouden is daarom essentieel voor een nauwkeurige analyse van genexpressie in menselijk volbloed.

Principe en procedure

PreAnalytiX heeft een systeem ontworpen dat het afnemen, stabiliseren, opslaan en transporteren van monsters van menselijk volbloed mogelijk maakt, tezamen met een snel en efficiënt protocol voor de isolatie van intracellulair RNA. Het systeem vereist het gebruik van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's) voor bloedafname en RNA-stabilisatie, gevolgd door een handmatige of geautomatiseerde RNA-isolatie met behulp van de PAXgene Blood RNA Kit. De handmatige en geautomatiseerde protocollen bieden nagenoeg gelijkwaardige prestaties met betrekking tot RNA-kwaliteit en -opbrengst. Prestatiegegevens voor het handmatige protocol (startend op pagina 46) en het geautomatiseerde protocol (startend op pagina 55) zijn inbegrepen in deze handleiding.

Het PAXgene Blood RNA System maakt standaardisering van de pre-analytische workflowstappen van bloedspecimenafname tot cellulaire RNA-isolatie mogelijk in overeenstemming met ISO 20186-1:2019, Moleculaire in-vitrodiagnostische onderzoeken – Specificaties voor processen voorafgaand aan het onderzoek voor veneus volbloed – Deel 1: Geïsoleerd cellulair RNA.

Monsterafname en stabilisatie

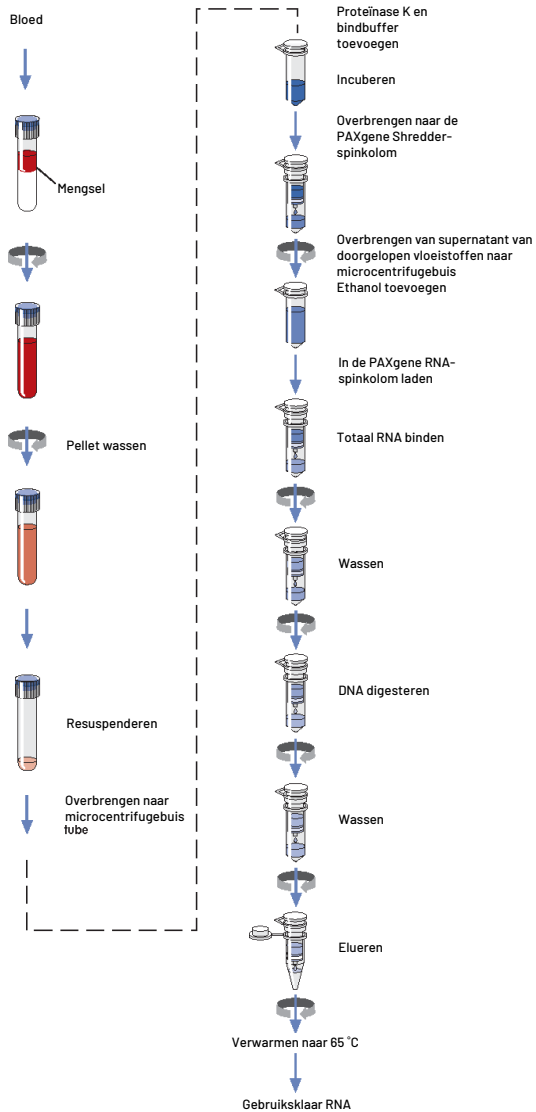
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's) bevatten een bedrijfseigen RNA-stabilisatiereagens. Dit additief beschermt RNA-moleculen tegen degradatie door RNasen en minimaliseert veranderingen in genexpressie ex vivo. Prestatiekenmerken van het PAXgene Blood RNA System zijn alleen bepaald met transcripten van het FOS- en IL1B-gen, die staan vermeld vanaf pagina 41.

RNA-isolatie

De PAXgene Blood RNA Kit is bedoeld voor de isolatie van totaal-RNA uit 2,5 ml menselijk volbloed dat is afgenomen in een PAXgene Blood RNA Tube (BRT). De procedure is eenvoudig en kan met behulp van handmatige of geautomatiseerde procedures worden uitgevoerd (zie afbeelding 1 of afbeelding 3, respectievelijk op pagina 10 en 12). In beide protocollen begint de isolatie met een centrifugeringsstap om nucleïnezuren te pelletiseren in de PAXgene Blood RNA Tube (BRT). De pellet wordt gewassen en geresuspendeerd, daarna volgt handmatige of geautomatiseerde RNA-isolatie. In principe volgen beide protocollen dezelfde stappen met dezelfde componenten uit de kit.

Handmatige RNA-isolatie

De geresuspendeerde pellet wordt geïncubeerd in geoptimaliseerde buffers samen met proteïnase K (PK) om proteïne-afbraak te veroorzaken. Er wordt een extra centrifugatie door de PAXgene Shredder-spinkolom (PSC) uitgevoerd om het cellysaat te homogeniseren en overgebleven celresten te verwijderen. Ook wordt de supernatant van de doorgelopen fractie overgebracht naar een nieuw microcentrifugebuisje (MCT). Ethanol wordt toegevoegd om de bindingscondities aan te passen en het lysaat wordt aangebracht op een PAXgene RNA-spinkolom (PRC). Tijdens een korte centrifugatie wordt het RNA selectief gebonden aan het PAXgene-silicamembraan, terwijl verontreinigingen passeren. Achtergebleven verontreinigingen worden verwijderd met diverse efficiënte wasstappen. Tussen de eerste en de tweede wasstap wordt het membraan behandeld met DNase I (RNFD) om kleine hoeveelheden gebonden DNA te verwijderen. Na de wasstappen wordt RNA geëluëerd in elutiebuffer (BR5) en door verhitting gedenatureerd. De prestatiekenmerken van handmatige RNA-isolatie met behulp van het PAXgene Blood RNA System vindt u op pagina 46.



Afbeelding 1: De handmatige PAXgene Blood RNA-procedure.

Geautomatiseerde RNA-isolatie

Op de QIAGEN QIAcube Connect MDx is de isolatie van bloed-RNA geautomatiseerd. Het innovatieve instrument maakt gebruik van geavanceerde technologie voor het verwerken van QIAGEN-spinkolommen, en zorgt daarmee voor een naadloze integratie van geautomatiseerde monsterbereiding met lage verwerkingsnelheid in de workflow van het laboratorium. Bij de monsterbereiding met de QIAcube Connect MDx worden dezelfde stappen gevolgd als bij de handmatige procedure (lyseren, binden, wassen en elueren), en ze kunnen worden uitgevoerd met dezelfde PAXgene Blood RNA Kit.

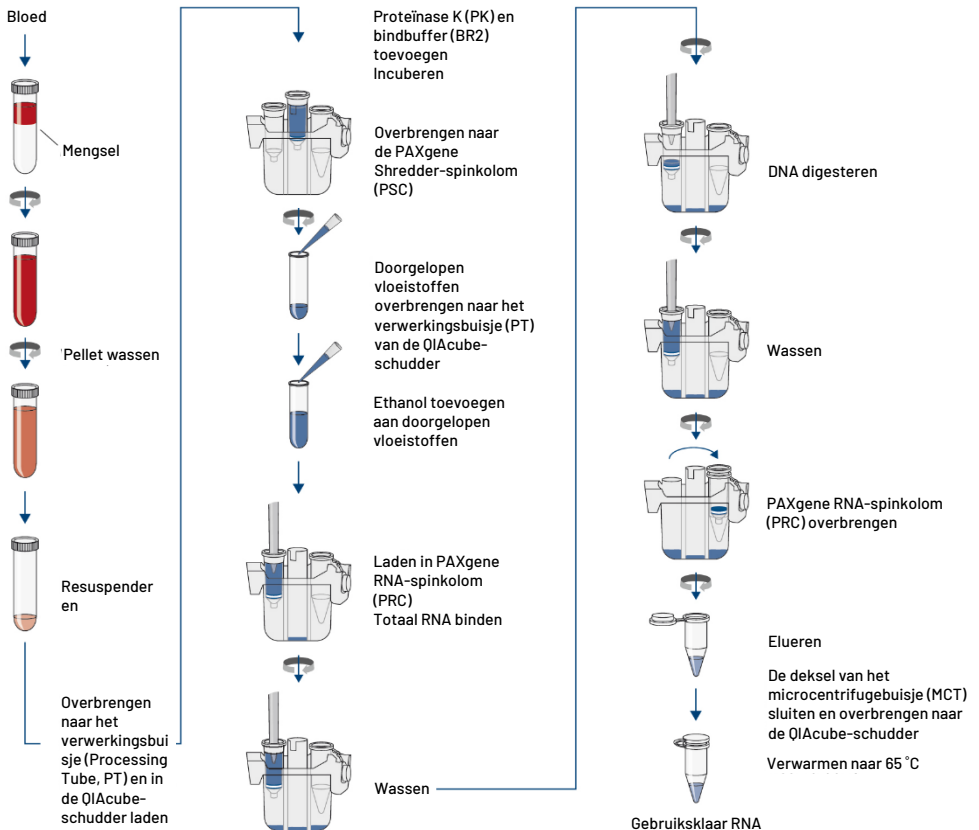


Afbeelding 2: QIAcube Connect MDx.



De QIAGEN QIAcube Connect MDx is niet in alle landen verkrijgbaar. Neem voor meer informatie contact op met de technische diensten van QIAGEN.

Het geautomatiseerde RNA-isolatieprotocol bestaat uit 2 delen (of protocollen), 'PAXgene Blood RNA Part A' (vanuit het bloed in de PAXgene Blood RNA Tube om te elueren) en 'PAXgene Blood RNA Part B' (na het elueren naar gebruiksklaar RNA), met een korte handmatige interventie tussen de 2 delen (zie afbeelding 3).




Afbeelding 3: De geautomatiseerde PAXgene Blood RNA-procedure.

De gecentrifugeerde, gewassen en geresuspendeerde nucleïnezuurpellet (zie 'RNA-isolatie', pagina 8) is overgebracht vanuit de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) naar verwerkingsbuisjes (PT's) die in de thermoschudeenheid op de werktafel van de QIAcube Connect MDx zijn geplaatst. De operator selecteert en start het protocol 'PAXgene Blood RNA Part A' uit het menu. De QIAcube Connect MDx voert de stappen van het protocol uit tot de elutie van RNA in de elutiebuffer (BR5). De operator brengt de MCT's met het gezuiverde RNA over naar de thermoschudeenheid van de QIAcube Connect MDx. De operator selecteert en start het protocol 'PAXgene Blood RNA Part B' uit het menu en denaturatie door verhitting wordt uitgevoerd door de QIAcube Connect MDx. De prestatiekenmerken van geautomatiseerde RNA-isolatie met behulp van het PAXgene Blood RNA System op de QIAcube Connect MDx vindt u op pagina 55.

Meegeleverde materialen

Inhoud van de kit

PAXgene Blood RNA Kit Catalogusnr. Aantal afnamehulpmiddelen			(50) 762174 50
Naam onderdeel	Beschrijving	Symbol	Aantal
BR1	Resuspension Buffer (Resuspensiebuffer)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer* (Bindbuffer)	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1* (Wasbuffer 1)	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (Wasbuffer 2) (concentraat)*	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Elutiebuffer)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-free Water (bottle) (RNase-vrij water (fles))	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid) (Proteïnase K (groene deksel))	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (PAXgene RNA-spinkolommen (rood))*	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (Verwerkingsbuisjes) (2 ml) [§]	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard™	Secundaire BD Hemogard Closures (BD Hemogard-sluitingen)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (Microcentrifugebuisjes) (1,5 ml) [§]	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNase I, RNase-vrij (gelyofiliseerd))	DNA REM	1500 Kunitz-eenheden [¶]
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (DNA-digestiebuffer (witte deksel))	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (DNase-resuspensiebuffer (buisje, lila deksel))	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (PAXgene Shredder-spinkolommen (lila))*	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Handleiding	Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Kit (versie 3)		1

- * Niet geschikt voor gebruik met desinfectiereagentia die bleek bevatten. Bevat een guanidinezout. Zie pagina 18 voor Veiligheidsinformatie.
- [†] Wasbuffer 2 (BR4) wordt geleverd als concentraat. Voeg 4 volumes ethanol (96-100% v/v, zuiverheidsgraad p.a.) toe volgens de instructies op de fles om een werkoplossing te verkrijgen voordat u het concentraat voor de eerste keer gebruikt.
- [‡] Elke kolom is verpakt in een blisterverpakking die uitsluitend voor eenmalig gebruik is bedoeld. Bekijk de veiligheidsinformatie voor afvoerinstructies.
- [§] Slangen zijn verkrijgbaar in plastic zakken en elke slang is uitsluitend bedoeld voor eenmalig gebruik. Bekijk de veiligheidsinformatie voor afvoerinstructies.
- [¶] Kunitz-eenheden worden algemeen gebruikt als eenheden voor het meten van DNase I, gedefinieerd als de hoeveelheid DNase I die een toename veroorzaakt in A_{260} van 0,001 per minuut per milliliter bij 25 °C, pH 5,0, met sterk gepolymeriseerd DNA als het substraat (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* 33, 349 en 363).

Bestanddelen van de kit

Naam onderdeel	Beschrijving	Actief bestanddeel	Concentratie
BR1	Resuspension Buffer (Resuspensiebuffer)	Geen	-
BR2	Binding Buffer (Bindbuffer)	Guanidiniethiocyanaat	≥ 30 tot < 50% w/w
BR3	Wash Buffer 1 (Wasbuffer 1)	Guanidiniethiocyanaat Ethanol	≥ 10 tot < 20% w/w ≥ 3 tot < 10% w/w
BR4	Wash Buffer 2 (Wasbuffer 2) (concentraat)	Geen	-
BR5	Elution Buffer (Elutiebuffer)	Geen	-
RNFW	RNase-free Water (bottle)(RNase-vrij water (fles))	Geen	-
PK	Proteinase K (green lid)(Proteinase K (groene deksel))	Proteinase K	≥ 1 tot < 3% w/w
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNase I, RNase-vrij (gelyofiliseerd))	DNase	≥ 90 tot ≤ 100% w/w
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (DNA-digestiebuffer (witte deksel))	Geen	-
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid)(DNase-resuspensiebuffer (buisje, lila deksel))	Geen	-

Benodigde, maar niet-meegeleverde materialen

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Voor alle protocollen

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's, PreAnalytiX; cat.nr. 762165)
- Ethanol (96-100% v/v, zuiverheidsgraad p.a.)
- Pipetten* (10 µl-4 ml)
- Steriel, aerosolfilter, RNase-vrije pipettips †
- Maatcilinder‡
- Centrifuge* in staat om 3000-5000 × g te bereiken en uitgerust met een zwaai-emmerrotor om de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's) vast te houden
- Vortexmixer*
- IJsschaafsel
- Permanente pen voor etikettering

Voor het handmatige protocol

- Microcentrifuge met variabele snelheid* in staat om een bereik van minimaal 1000-8000 × g te bereiken, hoewel lagere en hogere g-krachten van toepassing zijn (zie de protocolstappen voor informatie), en uitgerust met een rotor voor MCT's van 2 ml

* Controleer of de hulpmiddelen en instrumenten regelmatig zijn gecontroleerd, onderhouden en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

† Zorg dat u bekend bent met de richtlijnen voor de verwerking van RNA (bijlage A, pagina 75).

‡ Voor de toevoeging van ethanol aan buffer BR4-concentraat.

- Schudincubator* in staat om bij 55 °C en 65 °C te incuberen en schudden met ≥ 400 tpm, maximaal 1400 tpm (zoals de Eppendorf® Thermomixer Compact of gelijkwaardig)

Voor het geautomatiseerde protocol

- Schaar
- QIAcube Connect MDx* (QIAGEN, cat.nr. 9003070)

De QIAcube Connect MDx-verbruiksartikelen:

- Filter-Tips, 1000 μ l (1024) (QIAGEN, cat.nr. 990352)†
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, cat.nr. 990393)†
- Rotor Adapters (10 \times 24) (QIAGEN, cat.nr. 990394)†

De QIAcube Connect MDx-accessoires:

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

QIAcube Connect MDx-servicepakketten:

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

* Controleer of het hulpmiddel regelmatig is gecontroleerd, onderhouden en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

† Ook inbegrepen in het Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, cat.nr. 990395).

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Onthoud dat klanten in de Europese Unie verplicht zijn om elk ernstig incident dat heeft plaatsgevonden in verband met gebruik van het hulpmiddel te melden bij de fabrikant en de bevoegde instantie van de lidstaat waarin de gebruiker en/of de patiënt zich bevindt.

Onthoud dat klanten buiten de Europese Unie volgens de plaatselijke voorschriften verplicht kunt zijn om ernstige incidenten die hebben plaatsgevonden in verband met gebruik van het hulpmiddel te melden bij de fabrikant en/of diens geautoriseerde vertegenwoordiger en de regelgevende instantie van de locatie waar de gebruiker en/of de patiënt zich bevindt.

Veiligheidsinformatie

Draag bij het werken met chemicaliën en biologisch gevaarlijke materialen altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's). Deze zijn als handige en compacte PDF online beschikbaar op www.qiagen.com/safety. Hier kunt u ook de VIB voor elke QIAGEN-kit en elk onderdeel van de kit vinden, bekijken en afdrukken.

- Alle chemische en biologische materialen zijn mogelijk gevaarlijk. Bloedspecimens en -monsters zijn potentieel besmettelijk en dienen als biologisch gevaarlijk materiaal te worden behandeld.
- Gooi biologisch gevaarlijk afval en kit-afval weg conform uw lokale veiligheidsprocedures.

Informatie voor noodgevallen

CHEMTREC

Buiten de VS en Canada +1 703-527-3887

Voorzorgsmaatregelen

Wanneer u met bloed werkt, dient u de universele voorzorgsmaatregelen te volgen met betrekking tot het voorkomen van het risico op potentiële blootstelling aan pathogenen in het bloed (bijv. hiv, hepatitis-B, en via het bloed overdraagbare virussen). Draag handschoenen, een schort, oogbescherming, andere persoonlijke beschermingsmiddelen, en volg de toepasselijke technische maatregelen om uzelf tegen blootstelling aan bloed te beschermen. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's). Deze zijn online beschikbaar in handig en compact pdf-formaat via **www.preanalytix.com**. Hier kunt u de VIB's van deze kit vinden, bekijken en afdrukken.

VOORZICHTIG



Voeg **GEEN** bleekmiddel of zuuroplossingen rechtstreeks toe aan het afval van monsterbereiding.

Bindbuffer (BR2) en wasbuffer 1 (BR3) bevatten guanidiniethiocynaat, dat sterk reactieve verbindingen kan vormen met bleekmiddelen. Als u bindbuffer (BR2) of wasbuffer 1 (BR3) hebt gemorst, moet deze worden verwijderd met een geschikt laboratoriumreinigingsmiddel en water. Reinig de verontreinigde plek eerst met een laboratoriumreinigingsmiddel en water en vervolgens met 1% (v/v) natriumhypochloriet (bleek) als de gemorste vloeistof mogelijk infectueuze stoffen bevat.

Het mengsel van RNA-stabilisatieoplossing en bloed uit de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kan worden gedesinfecteerd met behulp van 1 volume commercieel bleekmiddel (5% natriumhypochloriet) per 9 volumes van het mengsel van RNA-stabilisatieoplossing en bloed.

Afval van monsterbereiding, zoals supernatant van centrifugatiestappen in de RNA-isolatieprocedure, is mogelijk besmettelijk. Gebruik containers voor biologisch gevaarlijk materiaal om biologische materialen af te voeren. De afvoer moet worden uitgevoerd in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften en procedures van uw laboratorium.

Specifieke onderdelen van de PAXgene Blood RNA Kit zijn uitsluitend bedoeld voor eenmalig gebruik. Bekijk de Inhoud van de kit op pagina 14 voor informatie over individuele onderdelen.

De volgende gevarenaanduidingen en voorzorgsmaatregelen zijn van toepassing op de componenten van de PAXgene Blood RNA Kit. Raadpleeg de *Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Tube* voor veiligheidsinformatie over de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's).

Buffer BR2



Bevat: guanidiniethiocyanaat. Gevaar! Schadelijk bij opname door de mond. Kan schadelijk zijn bij contact met de huid of bij inademing. Veroorzaakt ernstige oogschade. Langdurig schadelijk voor in het water levende organismen. Door contact met zuren komt zeer giftig gas vrij. Voorkom vrijkomen in het milieu. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming. **BIJ CONTACT MET DE OGEN:** Voorzichtig spoelen met water gedurende een aantal minuten. Contactlenzen verwijderen, indien mogelijk. Blijven spoelen. **NA (mogelijke) blootstelling:** Onmiddellijk een arts of GIFCENTRUM raadplegen. Voer de inhoud/container af naar een goedgekeurde stortlocatie.

Buffer BR3



Bevat: ethanol; guanidinetiocyanaat. Gevaar! Ontbrandbare vloeistof en damp. Veroorzaakt ernstige oogschade. Door contact met zuren komt zeer giftig gas vrij. Uit de buurt houden van warmte/-vonken/open vuur/hete oppervlakken. Niet roken. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gezichtsbescherming. BIJ CONTACT MET DE OGEN: Voorzichtig spoelen met water gedurende een aantal minuten. Contactlenzen verwijderen, indien mogelijk. Blijven spoelen. Schakel onmiddellijk hulp van een GIFCENTRUM of arts in.

DNase I



Bevat: DNase. Gevaar! Kan een allergische huidreactie veroorzaken. Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken. Voorkom het inademen van stof. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/ gelaatsbescherming. Adembescherming dragen. NA (mogelijke) blootstelling: een GIFCENTRUM of arts raadplegen. Breng de persoon in de frisse lucht, in een houding die het ademen vergemakkelijkt. Was verontreinigde kleding voordat u deze opnieuw gebruikt.

Opslag en hantering van reagentia

PAXgene RNA-spinkolommen (PRC), PAXgene Shredder-spinkolommen (PSC), proteïnase K (PK) en buffers (BR1, BR2, BR3, BR4 en BR5) moeten droog worden opgeslagen bij de temperatuur die wordt vermeld op het etiket van de kit.

De RNase-Free DNase Set die DNase I (RNFD), DNA-digestiebuffer (RDD) en DNase-resuspensiebuffer (DRB) bevat, wordt bij omgevingstemperatuur verzonden. Sla alle componenten van de RNase-Free DNase Set onmiddellijk na ontvangst op bij een op het etiket aangegeven temperatuur. Wanneer de kit onder de juiste omstandigheden wordt bewaard, is hij stabiel tot de houdbaarheidsdatum die op de doos van de kit staat vermeld.

Let op de vervaldatum en opslagcondities die op de verpakking en etiketten van alle componenten staan vermeld. Gebruik geen componenten waarvan de uiterste gebruiksdatum is verstreken of die onjuist zijn opgeslagen.

Stabiliteit tijdens gebruik

Na het eerste gebruik van de kit dienen reagentia stabiel te zijn en in de originele flessen aanwezig te zijn bij de temperaturen en tot de uiterste gebruiksdatum die op het verpakkingslabel van de kit staan vermeld.

Reagentia die in de reagensflessen van de QIAcube Connect MDx zijn gevuld, zijn stabiel gedurende 3 maanden opslag bij kamertemperatuur (15-25 °C).

Gereconstitueerde DNase I (RNFD) is stabiel bij 2-8 °C gedurende 6 weken in de oorspronkelijke flacon (voorraadoplossing).

Aliquots voor eenmalig gebruik van de voorraadoplossing in MCT's van 1,5 ml (meegeleverd met de kit) zijn gedurende 9 maanden opslag stabiel bij -20°C . Na het ontdooien zijn de aliquots voor eenmalig gebruikt gedurende 6 weken opslag stabiel bij $2-8^{\circ}\text{C}$.

Afnemen, bewaren en verwerken van specimen

De PAXgene Blood RNA Kit is bedoeld voor gebruik met bloed dat is afgenomen in de PAXgene Blood RNA Tubes. Bloed moet worden verzameld in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's) volgens de instructies in de Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Tube. Zie indien nodig bijlage C (pagina 81) voor aanbevelingen over de verwerking van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's). Alle monsters moeten worden behandeld als mogelijk gevaarlijk. Prestatiekenmerken van het PAXgene Blood RNA System zijn alleen bepaald met transcripten van het FOS- en IL1B-gen, die staan vermeld op pagina 42-45.

Protocol: Handmatige isolatie van totaal-RNA uit menselijk volbloed afgenomen in PAXgene Blood RNA Tubes

Wat u moet weten voordat u begint

- Controleer of de doos intact en onbeschadigd is en dat de buffers niet hebben gelekt. Gebruik geen kit die beschadigd is.
- Zorg er bij gebruik van pipetten voor dat het juiste volume is ingesteld en dat vloeistof zorgvuldig en volledig wordt afgezogen en afgegeven.
- Om te voorkomen dat monsters naar de verkeerde buis of spinkolom worden overgebracht, moet u ervoor zorgen dat alle buisjes en spinkolommen op de juiste manier zijn voorzien van een etiket met een permanente pen. Voorzie de deksel en elke fysieke buis (PT, MCT) van een etiket. Voor de spinkolommen voorziet u het PT van een etiket. Sluit elk buisje of elke spinkolom nadat er vloeistoffen naartoe zijn overgebracht.
- Het morsen van monsters en buffers tijdens de procedure kan de opbrengst en de zuiverheid van RNA beïnvloeden.
- Tenzij anders aangegeven, moeten alle centrifugatiestappen worden gedaan bij kamertemperatuur (15-25 °C).

Technieken waarin gebruik wordt gemaakt van nucleïnezuuramplificatie zijn erg gevoelig; de volgende voorzorgsmaatregelen zijn daarom noodzakelijk om kruisbesmetting tussen monsterbereidingen te voorkomen:

- Pipetteer het monster voorzichtig in de spinkolom (PSC, PRC) zonder de rand van de kolom te bevochtigen.
- Gebruik iedere keer na het overbrengen van vloeistof een nieuwe pipetpunt. Gebruik pipettips met een aerosolfilter.
- Raak het membraan van de spinkolom (PSC, PRC) niet aan met de pipetpunt.

- Centrifugeer het monster kort om eventuele druppeltjes aan de onderkant van de deksel te verwijderen, na het vortexen of verhitten van een MCT.
- Draag handschoenen tijdens de gehele procedure. Als de handschoenen in aanraking komen met het monster moeten de handschoenen onmiddellijk worden vervangen.
- Sluit de spinkolom (PSC, PRC) voordat u deze in de microcentrifuge plaatst. Centrifugeer zoals beschreven in de procedure.
- Open niet meer dan één spinkolom (PSC, PRC) tegelijk en zorg dat er geen aerosolen kunnen worden gevormd.
- Om meerdere monsters tegelijkertijd efficiënt te kunnen verwerken, vult u een rek met de benodigde PT's zodat spinkolommen (PSC, PRC) na centrifugatie naar de buisjes kunnen worden overgebracht. Voer de gebruikte PT's met doorgelopen vloeistoffen af en plaats de spinkolommen (PSC, PRC) in nieuwe PT's voordat ze opnieuw worden overgedragen naar de microcentrifuge.



Wat u moet doen voordat u begint

- Bloed moet worden verzameld in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's) volgens de instructies in de *Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Tube*. Zie indien nodig bijlage C (pagina 81) voor aanbevelingen over de verwerking van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's).
- Zorg ervoor dat de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's) minimaal 2 uur geïncubeerd zijn op kamertemperatuur na de bloedafname om volledige lysis van bloedcellen en precipitatie van RNA te garanderen. Incubatie van de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) gedurende de gehele nacht kan de opbrengst vergroten. Indien de initiële bloedincubatie bij kamertemperatuur gedurende 2 uur niet is uitgevoerd vóór de opslag bij 2–8 °C, -20 °C of -70 °C, dan dient u de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) eerst op kamertemperatuur te brengen en vervolgens gedurende 2 uur te incuberen bij deze temperatuur voordat u de procedure start.
- Lees de veiligheidsinformatie op pagina 18.

- Lees de richtlijnen voor de verwerking van RNA (bijlage A, pagina 78).
- Zorg ervoor dat instrumenten, zoals pipetten en de schudincubator, regelmatig worden gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.
- Een schudincubator is vereist bij stap 5 en stap 20. Stel de temperatuur van de schudincubator in op 55 °C.
- Er kan in bindbuffer (BR2) tijdens opslag een precipitaat ontstaan. Verwarm, indien nodig, tot 37 °C om deze op te lossen.
- Wasbuffer 2 (BR4) wordt geleverd als concentraat. Voeg 4 volumes ethanol (96-100% v/v, zuiverheidsgraad p.a.) toe volgens de instructies op de fles om een werkoplossing te verkrijgen voordat u het concentraat voor de eerste keer gebruikt.
- Bereid DNase I-voorraadoplossing wanneer u de RNase-Free DNase Set voor het eerst gebruikt. Los de vaste DNase I (RNFD; 1500 Kunitz-eenheden)* op in 550 µl DNase-resuspensiebuffer (DRB) die wordt meegeleverd met de set. Let op dat er geen DNase I (RNFD) verloren gaat bij het openen van de flacon. Vortex de gereconstitueerde DNase I (RNFD) niet. DNase I is met name gevoelig voor fysieke denaturatie. Meng alleen door het buisje voorzichtig om te keren.
- Gereconstitueerde DNase I (RNFD) kan in de originele glazen flacon (voorraadoplossing) bij 2–8 °C worden opgeslagen of bij -20 °C nadat voorraadoplossing uit de glazen flacon is verwijderd en onderverdeeld in aliquots voor eenmalig gebruik (gebruik het MCT van 1,5 ml dat in de kit is meegeleverd; er zijn er voldoende voor 5 aliquots). Ontdooide aliquots kunnen bij 2–8 °C worden bewaard. Vries de aliquots na het ontdooien niet opnieuw in.
- Zorg er bij het reconstitueren en aliquoteren van DNase I (RNFD) voor dat u de richtlijnen voor de verwerking van RNA volgt (bijlage A, pagina 78).


* Kunitz-eenheden worden algemeen gebruikt als eenheden voor het meten van DNase I, gedefinieerd als de hoeveelheid DNase I die een toename veroorzaakt in A_{260} van 0,001 per minuut per milliliter bij 25 °C, pH 5,0, met sterk gepolymeriseerd DNA als het substraat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 en 363).






Procedure

1. Centrifugeer de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 10 minuten met $3000\text{--}5000 \times g$ met behulp van een zwaai-emmerrotor.
 -  Zorg ervoor dat het bloedmonster minimaal 2 uur op kamertemperatuur ($15\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) is geïncubeerd in de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) om volledige lysis van bloedcellen en precipitatie van RNA te bereiken.
 -  De rotor moet de buisadapters voor buisjes met een ronde onderkant bevatten. Als er andere buisjes worden gebruikt, kunnen deze breken tijdens het centrifugeren.
2. Verwijder supernatant door te decanteren of pipetteren. Voeg 4 ml RNase-Free Water (RNase-vrij water; RNFV) toe aan de pellet en sluit het buisje met behulp van een nieuwe secundaire BD Hemogard-sluiting (meegeleverd met de kit).

Zorg er na het decanteren van supernatant voor dat de pellet niet verstoord wordt en droog de rand van het buisje met een schone papieren doek.
3. Vortex tot de pellet zichtbaar is opgelost en centrifugeer 10 minuten met $3000\text{--}5000 \times g$ met behulp van een zwaai-emmerrotor. Verwijder het volledige supernatant en gooi het weg.

Kleine celresten die in het supernatant achterblijven na het vortexen maar voor de centrifugatie hebben geen invloed op de procedure.

 -  Als het supernatant niet volledig is verwijderd, belemmert dit de lyse en verdunt dit het lysaat. Dit heeft invloed op de bindingscondities van het RNA op het PAXgene-membraan.
4. Voeg 350 μl resuspensiebuffer (BR1) toe en vortex tot de pellet zichtbaar is opgelost.
5. Pipetteer het monster in een MCT van 1,5 ml. Voeg 300 μl bindbuffer (BR2) en 40 μl proteïnase K (PK) toe. Vortex gedurende 5 seconden om te mengen en incubeer gedurende 10 minuten bij $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ met behulp van een schudincubator met 400–1400 tpm. Stel na de incubatie de temperatuur van de schudincubator in op $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ (voor stap 20).

-  Meng bindbuffer (BR2) en proteïnase K (PK) niet samen alvorens deze aan het monster toe te voegen.
6. Pipetteer het lysaat direct in een PSC (lila) die in een PT van 2 ml is geplaatst en centrifugeer 3 minuten op maximale snelheid (niet hoger dan $20.000 \times g$).
-  Pipetteer het lysaat voorzichtig in de spinkolom (PSC) en controleer visueel of het lysaat volledig is overgebracht naar de spinkolom (PSC). Om schade aan kolommen (PSC) en buisjes (PT) te voorkomen, mag de snelheid niet hoger dan $20.000 \times g$ zijn.
-  Sommige monsters kunnen door de PSC stromen zonder centrifugatie. Dit komt door de lage viscositeit van sommige monsters en mag niet worden opgevat als een indicatie voor het falen van het product.
7. Breng de volledige supernatant van de doorgelopen fractie voorzichtig over naar een nieuw MCT van 1,5 ml zonder de pellet in het PT te verstoren.
8. Voeg 350 μ l ethanol (96–100% v/v, zuiverheidsgraad p.a.) toe. Meng door kort te vortexen en centrifugeren (1–2 seconden met 500 – $1000 \times g$) om druppels van de binnenkant van de deksel van het buisje te verwijderen.
-  De centrifugatieduur mag niet meer dan 1–2 seconden zijn, omdat dit kan zorgen voor een pellet van nucleïnezuren en verminderde opbrengsten van totaal-RNA.
9. Pipetteer 700 μ l monster in de PRC (rood) die in een PT van 2 ml is geplaatst en centrifugeer gedurende 1 minuut met 8000 – $20.000 \times g$. Plaats de spinkolom (PRC) in een nieuw PT van 2 ml en gooi het oude PT met doorgelopen vloeistoffen weg.
10. Pipetteer monster in de PRC en centrifugeer 1 minuut met 8000 – $20.000 \times g$. Plaats de spinkolom (PRC) in een nieuw PT van 2 ml en gooi het oude PT met doorgelopen vloeistoffen weg.
-  Pipetteer het monster voorzichtig in de spinkolom (PRC) en controleer visueel of het monster volledig is overgebracht naar de spinkolom (PRC).

11. Pipetteer 350 µl wasbuffer 1 (BR3) in de PRC. Centrifugeer 1 minuut met 8000–20.000 × *g*. Plaats de spinkolom (PRC) in een nieuw PT van 2 ml en gooi het oude PT met doorgelopen vloeistoffen weg.
12. Voeg 10 µl DNase I (RNFD)-voorraadoplossing toe aan 70 µl DNA-digestiebuffer (RDD) in een MCT van 1,5 ml. Meng door voorzichtig tegen het buisje te tikken en centrifugeer kort om achtergebleven vloeistoffen van de zijkanten van het buisje te verwijderen.

Als er, bijvoorbeeld, 10 monsters worden verwerkt, voegt u 100 µl DNase I (RNFD)-voorraadoplossing toe aan 700 µl DNA-digestiebuffer (RDD). Gebruik de MCT's van 1,5 ml die met de kit worden geleverd.



DNase I is met name gevoelig voor fysieke denaturatie. Meng alleen door voorzichtig tegen het buisje te tikken. Niet vortexen.

13. Pipetteer het DNase I (RNFD)-incubatiemengsel (80 µl) direct op het PRC-membraan en plaats deze 15 minuten op de tafel (20–30 °C).



Zorg ervoor dat het DNase I (RNFD)-incubatiemengsel direct op het membraan is geplaatst. Incomplete digestie van DNase wordt veroorzaakt als het mengsel aan de wanden of de O-ring van de spinkolom (PRC) is aangebracht en het daar blijft zitten.

14. Pipetteer 350 µl wasbuffer 1 (BR3) in de PRC en centrifugeer 1 minuut met 8000–20.000 × *g*. Plaats de spinkolom (PRC) in een nieuw PT van 2 ml en gooi het oude PT met doorgelopen vloeistoffen weg.
15. Pipetteer 500 µl wasbuffer 2 (BR4) in de PRC en centrifugeer 1 minuut met 8000–20.000 × *g*. Plaats de spinkolom (PRC) in een nieuw PT van 2 ml en gooi het oude PT met doorgelopen vloeistoffen weg.



Wasbuffer 2 (BR4) wordt geleverd als concentraat. Zorg ervoor dat ethanol voor gebruik is toegevoegd aan wasbuffer 2 (BR4) (zie 'Wat u moet doen voordat u begint', pagina 25).

16. Voeg nogmaals 500 µl wasbuffer 2 (BR4) aan de PRC. 3 min centrifugereren met 8000–20.000 × *g*.

17. Gooi het PT met doorgelopen vloeistoffen weg en plaats de PRC in een nieuw PT van 2 ml. 1 min centrifugeren met $8000-20.000 \times g$.
18. Gooi het PT met de doorgelopen vloeistoffen weg. Plaats de PRC in een MCT van 1,5 ml en pipetteer 40 μ l elutiebuffer (BR5) direct op de PRC-membraan. Centrifugeer 1 minuut met $8000-20.000 \times g$ om het RNA te elueren.
Het is belangrijk om het hele membraan te bevochtigen met elutiebuffer (BR5) om een maximale elutie-efficiëntie te bereiken.
19. Herhaal de elutiestap (stap 18) zoals die wordt beschreven, met behulp van 40 μ l elutiebuffer (BR5) en hetzelfde MCT.
20. Incubeer het eluaat 5 minuten bij 65°C in de schudincubator (uit stap 5) zonder te schudden. Koel onmiddellijk met ijs na incubatie.



Deze incubatie van monsters bij 65°C denatureert het RNA voor vervolgtoeepassingen. Zelfs als de vervolgtoeepassing een denaturatiestap met hitte bevat mag u deze stap niet overslaan. Voldoende RNA-denaturatie is op dit moment noodzakelijk voor de maximale efficiëntie voor vervolgtoeepassingen.

Overschrijd de incubatietijd of -temperatuur niet.

21. Als de RNA-monsters niet onmiddellijk worden gebruikt, slaat u ze op bij -20°C of -70°C .

Omdat het RNA na herhaaldelijk invriezen en ontdooien gedeneureerd blijft, is het niet nodig om de incubatie bij 65°C te herhalen. Als u de RNA-monsters in een diagnostisch assay gebruikt, volg dan de instructies van de fabrikant.

Voor de nauwkeurige kwantificatie van RNA door absorptie bij 260 nm, raden wij aan om monsters te verdunnen met 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Het verdunnen van het monster in RNase-Free Water kan leiden tot onnauwkeurig lage waarden.

* Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Zet de spectrofotometer op nul met een blanco die bestaat uit dezelfde verhouding met elutiebuffer (BR5) en Tris-HCl-buffer als in de te meten monsters. De elutiebuffer (BR5) heeft een hoge absorptiewaarde bij 220 nm, wat kan leiden tot hoge niveaus van achtergrondabsorptie als de spectrofotometer niet goed is genuld.



Voor kwantificering in de Tris-HCl-buffer gebruikt u het verband $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Zie bijlage B, pagina 79.

22. Sluit opnieuw alle flessen met buffers en RNase-vrij water, flacons en buisjes met enzymen en enzymbuffers, en zakken met plastic materiaal uit de kit die voor het protocol worden gebruikt. Bewaar de overige inhoud van de kit zoals beschreven in de paragraaf 'Opslag en hantering van reagentia' (pagina 22) en 'Stabiliteit tijdens gebruik' (pagina 22) tot verder gebruik.

Protocol: Geautomatiseerde isolatie van totaal-RNA uit menselijk volbloed afgenomen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's)

Wat u moet weten voordat u begint

- Controleer of de doos intact en onbeschadigd is en dat de buffers niet hebben gelekt. Gebruik geen kit die beschadigd is.
- Zorg er bij gebruik van pipetten voor dat het juiste volume is ingesteld en dat vloeistof zorgvuldig en volledig wordt afgezogen en afgegeven.
- Om te voorkomen dat monsters naar de verkeerde buisjes of kunststof artikelen worden overgebracht, moet u ervoor zorgen dat alle PT, MCT's, en rotoradapters op de juiste manier zijn voorzien van een etiket met een permanente pen. Voorzie de deksel en elke MCT, elk PT en de buitenzijde van elke rotoradapter van een etiket.
- Het morsen van monsters en buffers tijdens de procedure kan de opbrengst en de zuiverheid van RNA beïnvloeden.
- Tenzij anders aangegeven, moeten alle centrifugatiestappen worden gedaan bij kamertemperatuur (15-25 °C).

Technieken waarin gebruik wordt gemaakt van nucleïnezuuramplificatie zijn erg gevoelig; de volgende voorzorgsmaatregelen zijn daarom noodzakelijk om kruisbesmetting tussen monsterbereidingen te voorkomen:

- Pipetteer het monster voorzichtig onderin in het PT zonder de rand van het buisje te bevochtigen.
- Gebruik iedere keer na het overbrengen van vloeistof een nieuwe pipetpunt. Gebruik pipettips met een aerosolfilter.
- Raak het membraan van de spinkolom (PSC, PRC) niet aan met de pipetpunt.

- Centrifugeer het monster kort om eventuele druppeltjes aan de onderkant van de deksel te verwijderen, na het vortexen of verhitten van een MCT.
- Draag handschoenen tijdens de gehele procedure. Als de handschoenen in aanraking komen met het monster moeten de handschoenen onmiddellijk worden vervangen.

Wat u moet doen voordat u begint

- Bloed moet worden verzameld in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's) volgens de instructies in de *Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Tube*. Zie indien nodig bijlage C (pagina 81) voor aanbevelingen over de verwerking van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's).
- Zorg ervoor dat de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's) minimaal 2 uur geïncubeerd zijn op kamertemperatuur na de bloedafname om volledige lysis van bloedcellen en precipitatie van RNA te garanderen. Incubatie van de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) gedurende de gehele nacht kan de opbrengst vergroten. Als de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) is opgeslagen bij 2–8 °C, –20 °C of –70 °C na de bloedafname, laat deze dan eerst op kamertemperatuur komen en sla deze daarna 2 uur op bij kamertemperatuur voordat u de procedure start.
- Lees de veiligheidsinformatie op pagina 18.
- Lees 'Belangrijke opmerkingen', pagina 59.
- Lees de richtlijnen voor de verwerking van RNA (bijlage A, pagina 78).
- Lees de bijbehorende gebruikershandleiding bij de QIAcube Connect MDx en aanvullende informatie die bij het instrument wordt meegeleverd, schenk hierbij met name aandacht aan de veiligheidsinformatie.
- Zorg ervoor dat hulpmiddelen en instrumenten, zoals pipetten en de QIAcube Connect MDx, regelmatig worden gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.
- Er kan in bindbuffer (BR2) tijdens opslag een precipitaat ontstaan. Verwarm, indien nodig, tot 37 °C om deze op te lossen.

- Wasbuffer 2 (BR4) wordt geleverd als concentraat. Voeg de gepaste hoeveelheid ethanol (96–100% v/v, zuiverheidsgraad p.a.) toe volgens de instructies op de fles om een werkoplossing te verkrijgen voordat u het concentraat voor de eerste keer gebruikt.
- Bereid DNase I-voorraadoplossing wanneer u de RNase-Free DNase Set voor het eerst gebruikt. Los de vaste DNase I (RNFD; 1500 Kunitz-eenheden)* op in 550 µl DNase-resuspensiebuffer (DRB) die wordt meegeleverd met de set. Let op dat er geen DNase I (RNFD) verloren gaat bij het openen van de flacon. Vortex de gereconstitueerde DNase I (RNFD) niet. DNase I is met name gevoelig voor fysieke denaturatie. Meng alleen door het buisje voorzichtig om te keren.
- Gereconstitueerde DNase I (RNFD) kan in de originele glazen flacon (voorraadoplossing) bij 2–8 °C worden opgeslagen of bij -20 °C nadat voorraadoplossing uit de glazen flacon is verwijderd en onderverdeeld in aliquots voor eenmalig gebruik (gebruik het MCT van 1,5 ml dat in de kit is meegeleverd; er zijn er voldoende voor 5 aliquots). Ontdooide aliquots kunnen bij 2–8 °C worden bewaard. Vries de aliquots na het ontdooien niet opnieuw in.
- Zorg er bij het reconstituëren en aliquoteren van DNase I (RNFD) voor dat u de richtlijnen voor de verwerking van RNA volgt (bijlage A, pagina 78).
- Installeer de juiste schudadapter (met de QIAcube Connect MDx meegeleverd; gebruik de adapter voor Safe-Lock-buisjes van 2 ml, gemarkeerd met een '2') en plaats het schudrek bovenop de adapter.
- Controleer de afvallade en gooi deze zo nodig leeg.
- Installeer eventuele protocollen als dit nog niet is uitgevoerd voor eerdere runs. Voor de QIAcube Connect MDx moeten alle protocollen in het bijbehorende zip-bestand worden gedownload. Zie 'Protocollen installeren op de QIAcube Connect MDx', pagina 61.

* Kunitz-eenheden worden algemeen gebruikt als eenheden voor het meten van DNase I, gedefinieerd als de hoeveelheid DNase I die een toename veroorzaakt in A_{260} van 0,001 per minuut per milliliter bij 25 °C, pH 5,0, met sterk gepolymeriseerd DNA als het substraat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 en 363).

Procedure

1. Sluit de kap van de QIAcube Connect MDx en schakel het instrument in met de aan-uitschakelaar (zie afbeelding 15, pagina 60).

Er klinkt een piep en het startscherm verschijnt. Het instrument voert automatisch de initialisatietests uit.

2. Open de kap van de QIAcube Connect MDx en laad de benodigde reagentia en kunststof artikelen in het instrument. Zie 'De QIAcube Connect MDx laden', pagina 62.

Om tijd te besparen kan het laden worden uitgevoerd tijdens een of beide van de volgende centrifugatiestappen van 10 minuten (stap 3 en 5).

3. Centrifugeer de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 10 minuten met $3000\text{--}5000 \times g$ met behulp van een zwaai-emmerrotor.



Zorg ervoor dat het bloedmonster minimaal 2 uur op kamertemperatuur ($15\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) is geïncubeerd in de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) om volledige lysis van bloedcellen en precipitatie van RNA te bereiken.



De rotor moet de buisadapters voor buisjes met een ronde onderkant bevatten. Als er andere buisjes worden gebruikt, kunnen deze breken tijdens het centrifugeren.

4. Verwijder supernatant door te decanteren of pipetteren. Zorg er na het decanteren van supernatant voor dat de pellet niet verstoord wordt en droog de rand van het buisje met een schone papieren doek. Voeg 4 ml RNase-Free Water (RNase-vrij water; RNFW) toe aan de pellet en sluit het buisje met behulp van een nieuwe secundaire BD Hemogard-sluiting (meegeleverd met de kit).
5. Vortex tot de pellet zichtbaar is opgelost en centrifugeer 10 minuten met $3000\text{--}5000 \times g$ met behulp van een zwaai-emmerrotor. Verwijder het volledige supernatant en gooi het weg.

Kleine celresten die in het supernatant achterblijven na het vortexen maar voor de centrifugatie hebben geen invloed op de procedure.



Als het supernatant niet volledig is verwijderd, belemmert dit de lyse en verdunt dit het lysaat. Dit heeft invloed op de bindingscondities van het RNA op het PAXgene-membraan.

6. Voeg 350 µl resuspensiebuffer (BR1) toe en vortex tot de pellet zichtbaar is opgelost.

7. Pipetteer het monster in een PT van 2 ml.



Gebruik de PT's van 2 ml die met de PAXgene Blood RNA Kit worden geleverd.

8. Laad de geopende PT's met monster in de QIAcube Connect MDx-schudder (zie afbeelding 18, pagina 64). De monsterposities zijn genummerd om het laden te vergemakkelijken. Plaats de schudrekpluggen (meegeleverd met de QIAcube Connect MDx) in de sleuven aan de rand van het schudrek naast elk PT. Dit maakt de detectie van monsters tijdens de ladingscontrole mogelijk.



Zorg ervoor dat de juiste schudadapter (schudadapter, 2 ml, Safe-Lock-buisjes, gemarkeerd met een '2', meegeleverd met de QIAcube Connect MDx) is geïnstalleerd.



Zorg er bij het laden voor dat het schudrek wordt geladen zoals getoond in afbeelding 22, pagina 68 wanneer er minder dan 12 monsters worden verwerkt. Eén (1) of elf (11) monsters kunnen niet worden verwerkt. De positie nummers in het schudrek komen overeen met de positie nummers in de centrifuge.

9. Sluit de kap van de QIAcube Connect MDx (zie afbeelding 15, pagina 60).

10. Selecteer het protocol 'PAXgene Blood RNA Part A' en start het protocol.

Volg de instructies die worden gegeven op het aanraakscherm van de QIAcube Connect MDx.



Zorg ervoor dat beide programmaonderdelen (deel A en deel B) zijn geïnstalleerd op de QIAcube Connect MDx (zie 'Protocollen installeren op de QIAcube Connect MDx', pagina 61).



Het instrument voert ladingscontroles uit voor monsters, tips, rotoradapters en reagensflessen.

11. Open de kap van de QIAcube Connect MDx (zie afbeelding 15, pagina 60) nadat het protocol 'PAXgene Blood RNA Part A' is afgelopen. Verwijder de PRC uit de rotoradapters en de lege PT's uit de schudder en gooi ze weg.



Tijdens de run worden spinkolommen overgebracht vanuit rotoradapter positie 1 (dekselpositie L1) naar rotoradapter positie 3 (dekselpositie L2) door het instrument (zie afbeelding 20, pagina 66).

12. Sluit alle deksels van de MCT's van 1,5 ml met het gezuiverde RNA in de rotoradapters (positie 3, dekselpositie L3, zie afbeelding 20, pagina 66). Breng de MCT's van 1,5 ml over naar de QIAcube Connect MDx-schudadapter (zie afbeelding 18, pagina 64).

13. Sluit de kap van de QIAcube Connect MDx (zie afbeelding 15, pagina 60).

14. Selecteer het protocol 'PAXgene Blood RNA Part B' en start het protocol.

Volg de instructies die worden gegeven op het aanraakscherm van de QIAcube Connect MDx.



Dit programma incubeert de monsters bij 65 °C en denatureert het RNA voor vervolgtoeepassingen. Zelfs als de vervolgtoeepassing een denaturatiestap met hitte bevat mag u deze stap niet overslaan. Voldoende RNA-denaturatie is op dit moment noodzakelijk voor de maximale efficiëntie voor vervolgtoeepassingen.

15. Open de kap van de QIAcube Connect MDx (zie afbeelding 15, pagina 60) nadat het programma 'PAXgene Blood RNA Part B' is afgelopen. Plaats de MCT's met gezuiverd RNA onmiddellijk op ijs.



WAARSCHUWING: Heet oppervlak. De schudder kan temperaturen tot 70 °C bereiken. Raak het apparaat niet aan als het heet is.



Laat geen gezuiverd RNA achter in de QIAcube Connect MDx. Omdat de monsters niet gekoeld worden, kan het gezuiverde RNA worden afgebroken. Daarom worden ongebruikte monsterbereidingsruns gedurende de nacht niet aanbevolen.

16. Als de RNA-monsters niet onmiddellijk worden gebruikt, slaat u ze op bij $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ of $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Omdat het RNA na herhaaldelijk invriezen en ontdooien gedeneatureerd blijft, is het niet nodig om de incubatieprotocol met behulp van hitte ('PAXgene Blood RNA Part B') te herhalen. Als u de RNA-monsters in een diagnostisch assay gebruikt, volg dan de instructies van de fabrikant.

Voor de nauwkeurige kwantificatie van RNA door absorptie bij 260 nm, raden wij aan om monsters te verdunnen met 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Het verdunnen van het monster in RNase-Free Water kan leiden tot onnauwkeurig lage waarden.

Zet de spectrofotometer op nul met een blanco die bestaat uit dezelfde verhouding met elutiebuffer (BR5) en Tris-HCl-buffer als in de te meten monsters. De elutiebuffer (BR5) heeft een hoge absorptiewaarde bij 220 nm, wat kan leiden tot hoge niveaus van achtergrondabsorptie als de spectrofotometer niet goed is genuld.



Voor kwantificatie in de Tris-HCl-buffer gebruikt u het verband $A_{260} = 1 \Rightarrow 44\text{ }\mu\text{g/ml}$. Zie bijlage B, pagina 79.

17. Verwijder het reagensflessenrek van de werktafel van de QIAcube Connect MDx (zie afbeelding 18, pagina 64) en sluit alle reagensflessen met de juiste gelabelde deksels. Sluit opnieuw alle flessen met buffers en RNase-vrij water, flacons en buisjes met enzymen en enzymbuffers, en zakken met plastic materiaal uit de kit die voor het protocol worden gebruikt. Bewaar de overige inhoud van de kit en de reagensflessen zoals beschreven in de paragraaf 'Opslag en hantering van reagentia' (pagina 22) en 'Stabiliteit tijdens gebruik' (pagina 22) tot verder gebruik.

* Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Verwijder de overgebleven reagentia in de PT's in de sleuven voor de MCT's van de QIAcube Connect MDx en gooi ze weg. Verwijder de rotoradapters uit de centrifuge en gooi ze weg. Leeg de afvallade van de QIAcube Connect MDx (zie afbeelding 15, pagina 60). Sluit de kap van het instrument en schakel het instrument uit met de aan-uitschakelaar.

Beperkingen van het gebruik van het product

De PAXgene Blood RNA Kit is bedoeld voor isolatie van intracellulair RNA uit menselijk volbloed ($4,8 \times 10^6$ - $1,1 \times 10^7$ leukocyten/ml) voor in-vitrodiagnostische toepassingen. Het is niet bedoeld voor de isolatie van genomisch DNA of virale nucleïnezuren uit menselijk volbloed. Door het beperkte aantal transcripten die gevalideerd zijn voor de stabilisatiespecificaties (transcripten van het FOS- en IL1B-gen) zijn de prestatiekenmerken niet bepaald voor alle transcripten. Gebruikers moeten de gegevens van de fabrikant en hun eigen gegevens beoordelen om te bepalen of validatie voor andere transcripten noodzakelijk is. De onderdelen van de kit zijn uitsluitend bedoeld om te worden gebruikt in het handmatige en geautomatiseerde protocol dat in deze gebruiksaanwijzing beschreven wordt.

Raadpleeg de *Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Tube* voor informatie over het gebruik van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's).

Kwaliteitscontrole

Elke partij van de PAXgene Blood RNA Kit wordt, in overeenstemming met het ISO-gecertificeerde kwaliteitsbeheersysteem van QIAGEN, getest tegen vooraf vastgestelde specificaties om een consistente kwaliteit van het product te waarborgen.

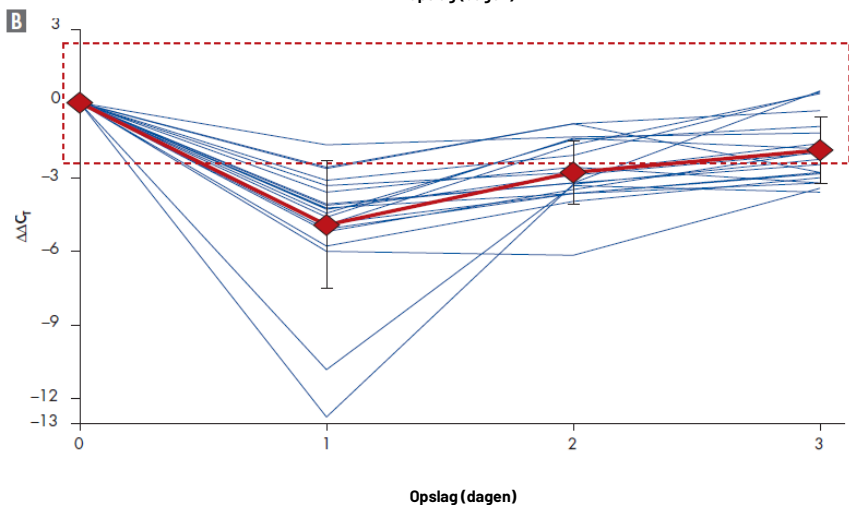
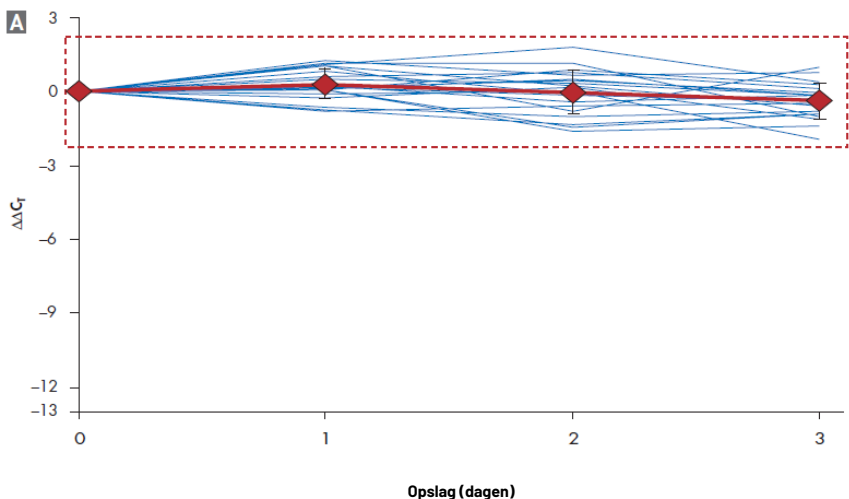
Prestatiekenmerken

Monsterafname en stabilisatie

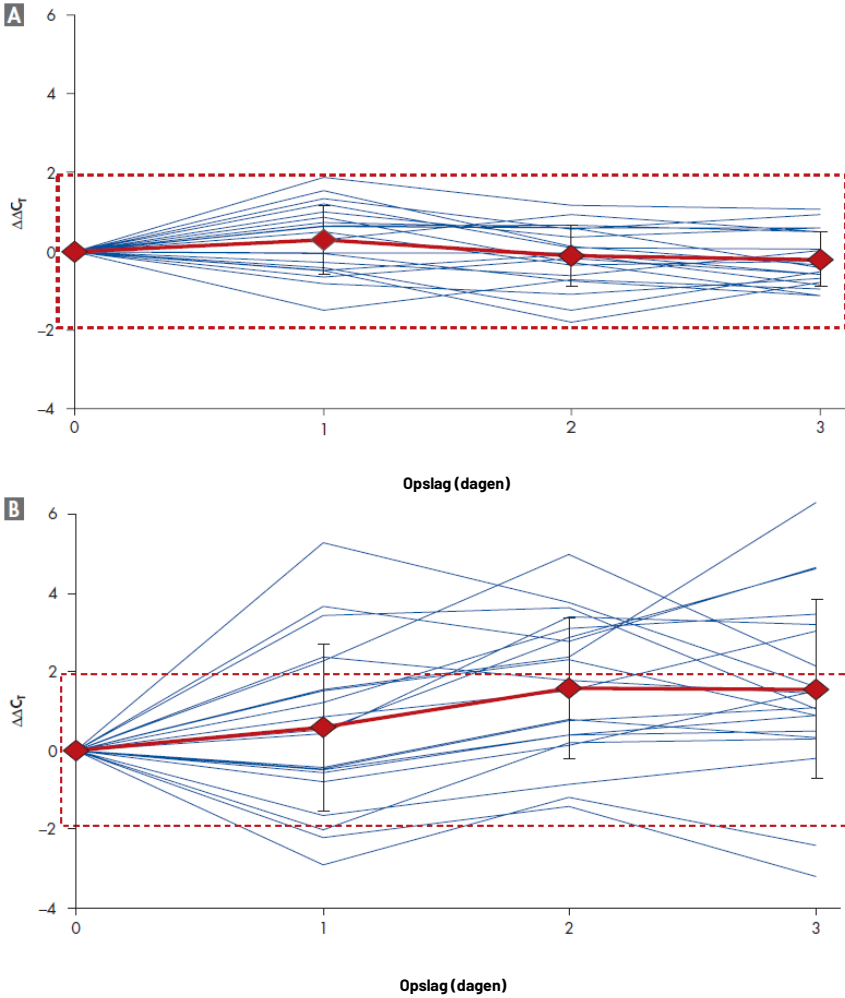
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's) bevatten een bedrijfseigen RNA-stabilisatiereagens. Dit additief beschermt RNA-moleculen tegen degradatie door RNasen en minimaliseert veranderingen in genexpressie ex vivo. PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's) zijn bedoeld voor afname van menselijk volbloed en stabilisatie van cellulair RNA tot 3 dagen bij 18-25 °C (afbeelding 4 en afbeelding 5, respectievelijk pagina 42 en 43) of tot 5 dagen bij 2-8 °C (afbeelding 6 en afbeelding 7, pagina 44 en 45). Gestabiliseerd bloed kan bovendien bevroren worden opgeslagen. De huidige beschikbare gegevens tonen minimaal 11 jaar stabilisatie van cellulair RNA bij -20 °C of -70 °C*. Voor meer informatie uit lopende onderzoeken waarbij stabiliteit voor langere periodes wordt geëvalueerd, gaat u naar www.preanalytix.com of neemt u contact op met de technische diensten van QIAGEN.

De werkelijke tijd van RNA-stabilisatie is afhankelijk van het soort cellulaire RNA en de gebruikte vervolgoepassing. Door het beperkte aantal transcripten die gevalideerd zijn voor de stabilisatiespecificaties (transcripten van het FOS- en IL1B-gen) zijn de prestatiekenmerken niet bepaald voor alle transcripten. Gebruikers moeten de gegevens van de fabrikant en hun eigen gegevens beoordelen om te bepalen of validatie voor andere transcripten noodzakelijk is.

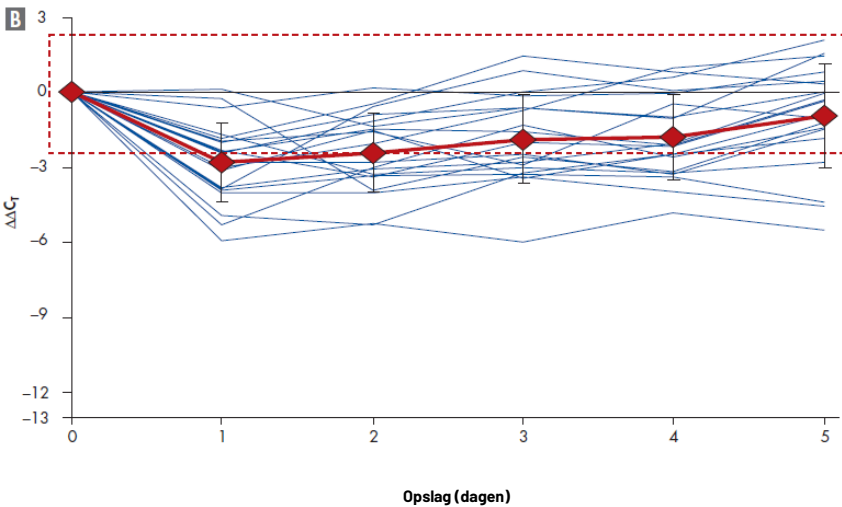
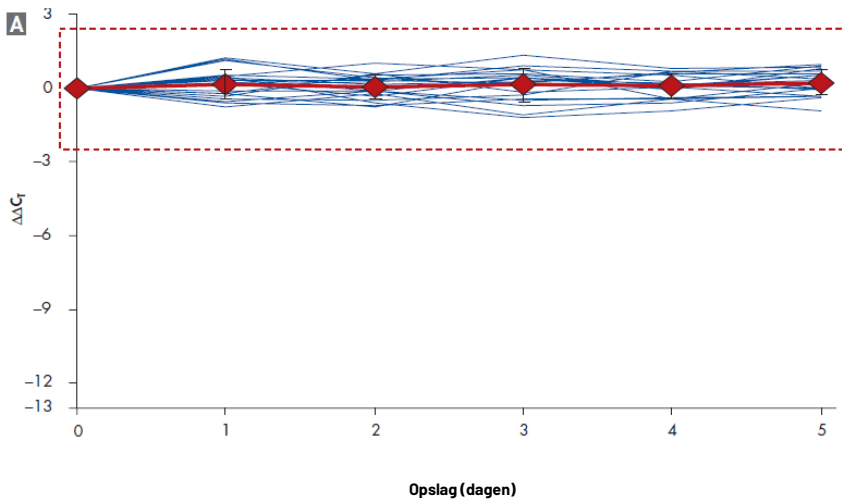
* Een langetermijnonderzoek naar opslag van bloed in PAXgene Blood RNA Tubes loopt nog.



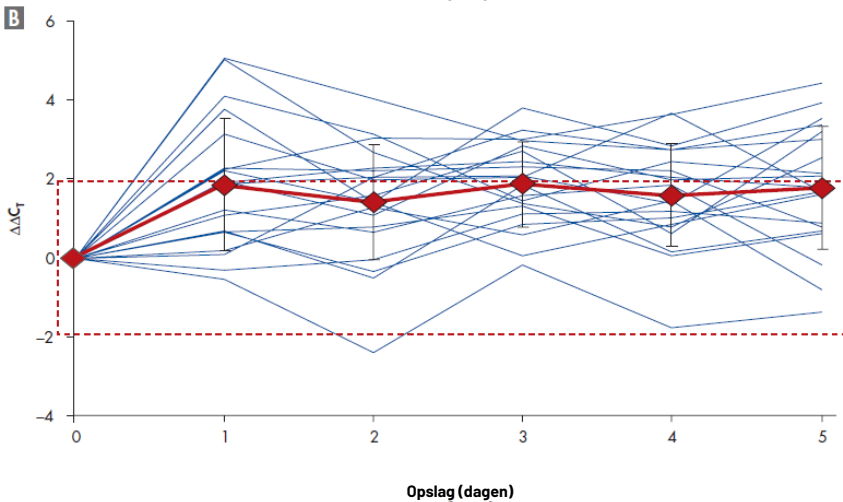
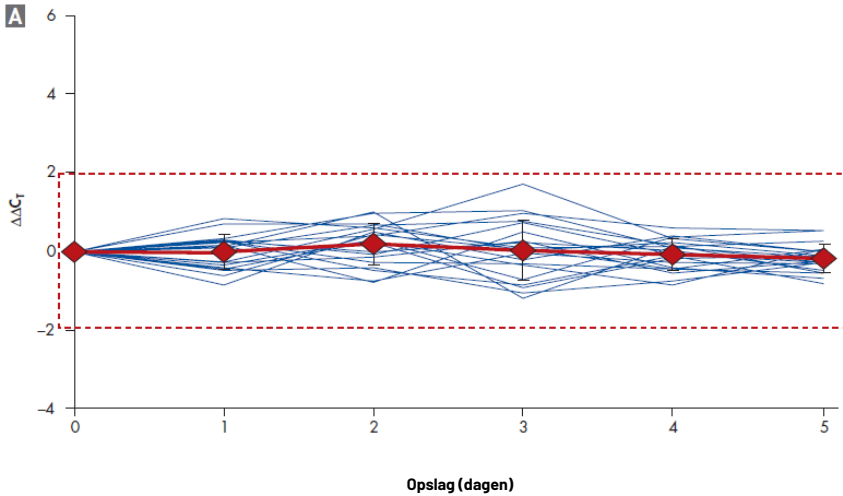
Afbeelding 4: RNA-stabiliteit in bloedmonsters bij 18-25 °C: FOS. Van 10 ogenschijnlijk gezonde donoren werd bloed afgenomen, met tweevoudige monsters, en opgeslagen bij 18-25 °C voor het aangegeven aantal dagen, gevolgd door isolatie van totaal-RNA. **[A]** Bloed werd afgenomen en opgeslagen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's) en totaal-RNA werd gezuiverd met behulp van de PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Bloed werd afgenomen en opgeslagen in standaard bloedafnamebuisjes met EDTA als antistollingsmiddel en totaal-RNA werd gezuiverd met behulp van een standaard organische isolatiemethode met op silicamembraan gebaseerde zuivering van RNA. Relatieve transcriptniveaus van FOS zijn bepaald door realtime, tweevoudige RT-PCR waarbij 18S rRNA is gebruikt als interne standaard. De waarden voor alle monsters zijn in kaart gebracht, waarbij van alle monsters de gemiddelden en deviaties worden getoond. De gestreepte lijnen tonen de $\pm 3\times$ totale precisie van de assay (2,34 C_t).



Afbeelding 5: RNA-stabiliteit in bloedmonsters bij 18-25 °C: IL1B. Bloed werd afgenomen en totaal-RNA werd gezuiverd, na opslag bij 18-25 °C, zoals weergegeven in afbeelding 4. Relatieve transcriptniveaus van IL1B zijn bepaald door realtime, tweevoudige RT-PCR waarbij 18S rRNA is gebruikt als interne standaard. De waarden voor alle monsters zijn in kaart gebracht, waarbij van alle monsters de gemiddelden en deviaties worden getoond. De gestreepte lijnen tonen de $\pm 3 \times$ totale precisie van de assay (1,93 C_t).



Afbeelding 6: RNA-stabiliteit in bloedmonsters bij 2-8 °C: FOS. Van 10 donoren werd bloed afgenomen, met tweevoudige monsters, en opgeslagen bij 2-8 °C voor het aangegeven aantal dagen, gevolgd door isolatie van totaal-RNA. [A] Bloed werd afgenomen en opgeslagen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's) en totaal-RNA werd gezuiverd met behulp van de PAXgene Blood RNA Kit. [B] Bloed werd afgenomen en opgeslagen in standaard bloedafnamebuisjes met EDTA als antistollingsmiddel en totaal-RNA werd gezuiverd met behulp van een standaard organische isolatiemethode met op silicamembraan gebaseerde zuivering van RNA. Relatieve transcriptniveaus van FOS zijn bepaald door realtime, tweevoudige RT-PCR waarbij 18S rRNA is gebruikt als interne standaard. De waarden voor alle monsters zijn in kaart gebracht, waarbij van alle monsters de gemiddelden en deviaties worden getoond. De gestreepte lijnen tonen de $\pm 3 \times$ totale precisie van de assay (2,34 C_t).



Afbeelding 7: RNA-stabiliteit in bloedmonsters bij 2-8 °C: IL1B. Bloed werd afgenomen en totaal-RNA werd gezuiverd, na opslag bij 2-8°C, zoals weergegeven in afbeelding 6. Relatieve transcriptniveaus van IL1B zijn bepaald door realtime, tweevoudige RT-PCR waarbij 18S rRNA is gebruikt als interne standaard. De waarden voor alle monsters zijn in kaart gebracht, waarbij van alle monsters de gemiddelden en deviaties worden getoond. De gestreepte lijnen tonen de $\pm 3\times$ totale precisie van de assay (1,93 C_T).

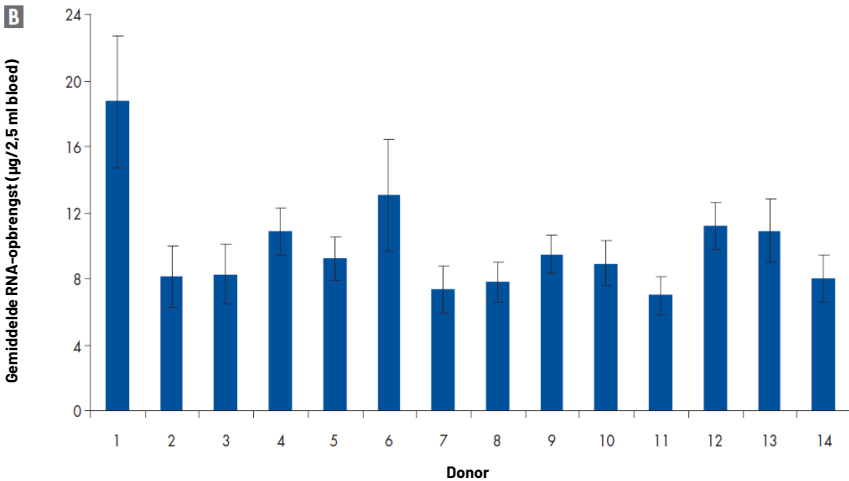
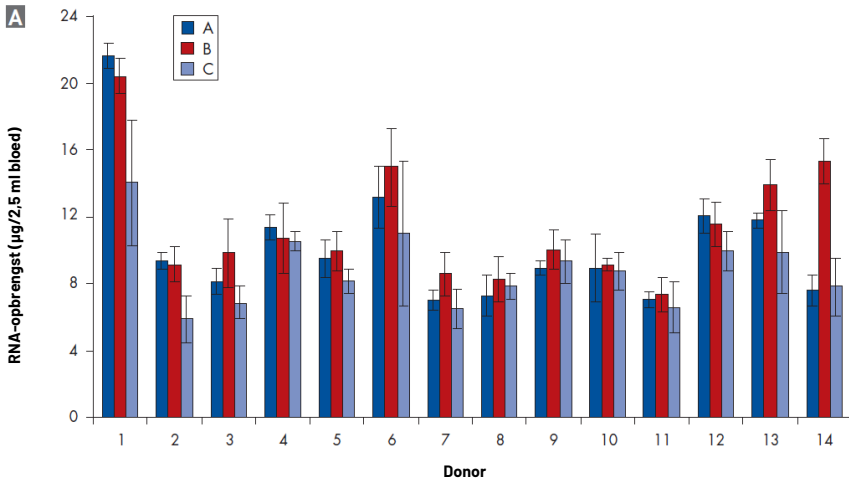
Handmatige RNA-isolatie

Totaal-RNA geïsoleerd met behulp van het PAXgene Blood RNA System is puur. Met behulp van het handmatige protocol liggen de waarden van A_{260}/A_{280} tussen 1,8 en 2,2, en is $\leq 1\%$ (w/w) genomisch DNA aanwezig in $\geq 95\%$ van alle monsters, gemeten met behulp van kwantitatieve real-time PCR van een sequentie van het gen voor bèta-actine. Bij minstens 95% van de monsters werd geen remming van RT-PCR gedetecteerd wanneer het eluaat garant stond voor maximaal 30% van het RT-PCR-reactievolume.

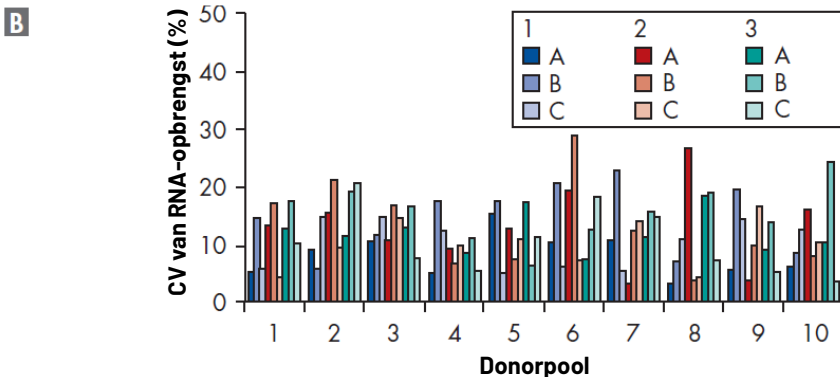
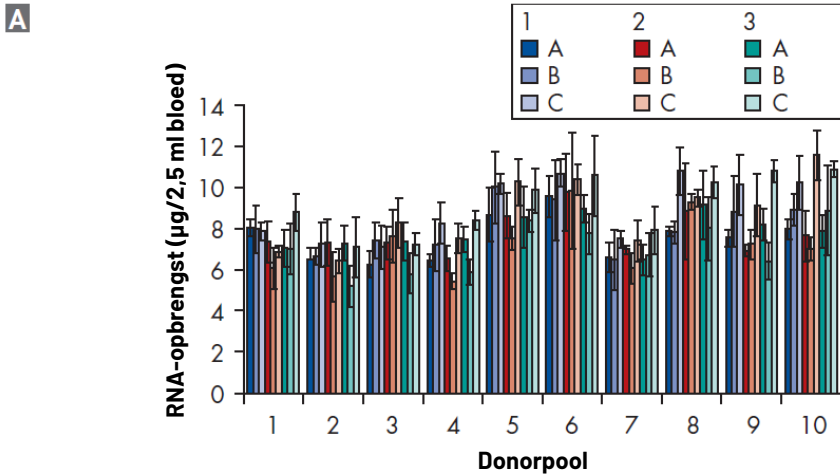
Met behulp van het handmatige protocol is de gemiddelde monsterbereidingstijd (op basis van gegevens uit 12 monsterbereidingsruns) ongeveer 90 minuten*, met slechts 40 minuten tijd voor handelingen van de gebruiker. RNA-opbrengst van 2,5 ml gezond menselijk volbloed is $\geq 3 \mu\text{g}$ bij $\geq 95\%$ van de verwerkte monsters. Aangezien opbrengsten sterk afhankelijk zijn van de donor, kunnen individuele opbrengsten variëren. Voor individuele donoren biedt het PAXgene Blood RNA System zeer reproduceerbare en herhaalbare opbrengsten (afbeelding 8 en afbeelding 9, respectievelijk pagina 47 en 48) en reproduceerbare en herhaalbare RT-PCR (afbeelding 10 en afbeelding 11, respectievelijk pagina 53 en 54), waardoor het zeer robuust is voor klinisch diagnostische tests.

Afbeelding 8 (pagina 47) toont de algehele herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van het PAXgene Blood RNA System. Aanvullende onderzoeken werden uitgevoerd om de invloed van verschillende partijen van de PAXgene Blood RNA Kit en verschillende operators op de reproduceerbaarheid van RNA-opbrengst en realtime RT-PCR-prestaties te tonen. Aangezien voor deze onderzoeken gepoolde bloedmonsters werden gebruikt in plaats van individuele PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's), weerspiegelen de resultaten niet de herhaalbaarheid van het systeem, inclusief schommelingen tussen individuele bloedafnames, maar alleen de herhaalbaarheid van de monsterbereiding (zie afbeelding 9, pagina 48).

* De totale looptijd van het protocol, inclusief de voorafgaande verwerking van PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugaties, pelletwassing en pelletresuspensie).



Afbeelding 8: Reproduceerbare en herhaalbare RNA-isolatie. Viervoudige bloedmonsters van 14 donoren werden handmatig verwerkt door elk van de 3 technici (A, B, C). Er zijn drie sets van apparatuur gebruikt en alle monsters die door een enkele technicus werden voorbereid, werden verwerkt met behulp van dezelfde apparatuur. [A] Gemiddelden en standaarddeviaties van RNA-opbrengst per replicaatmonsters van dezelfde donoren en verschillende technici worden getoond. [B] Twaalf replicaatbloedmonsters van alle 14 donoren werden verwerkt door de 3 verschillende technici. Gemiddelden en standaarddeviaties van RNA-opbrengst per monster van dezelfde donoren en alle technici worden getoond. Voor alle RNA-monsters varieerden de A_{280}/A_{260} -verhoudingen van 1,8 tot 2,2.



Afbeelding 9: Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van RNA-opbrengst voor verschillende operators en PAXgene Blood RNA Kit-partijen met behulp van gepoolde bloedmonsters. Bloedmonsters van 30 verschillende donoren werden afgenomen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's; 12 buisjes per donor, 360 buisjes in totaal). De inhoud van de buisjes van 3 donoren werden gepoold en vervolgens opnieuw verdeeld in 36 monsters. Deze 36 monsters per pool van 3 donoren werden handmatig verwerkt door 3 verschillende operators. Elke operator gebruikte 3 verschillende PAXgene Blood RNA Kit-partijen voor de isolatie van RNA en verwerkte viervoudige monsters van elk van de 10 donorpools.

[**A**] RNA-opbrengst en standaarddeviatie voor elke combinatie van operator en partij. Viervoudige bloedmonsters van 10 donorpools werden verwerkt door 3 verschillende operators (A, B, C) met elk 3 partijen kits (1, 2, 3). De gemiddelde opbrengst (kolommen) en standaarddeviatie (foutbalken) worden weergegeven per viervoudig monster van dezelfde donorpool voor een andere operator en een andere kit. [**B**] CV van de RNA-opbrengst per donorpool voor alle combinaties van operator en partij (A, B, C; 1, 2, 3) zoals berekend van de gemiddelde opbrengst en de standaarddeviatie van de opbrengst zoals getoond in afbeelding 9A.

Tabel 1A: Reproduceerbaarheid binnen elke partij en binnen elke gebruiker voor de geselecteerde donorpoolen (1, 6, 9, 10)

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

Tabel 1B: Reproduceerbaarheid binnen elke gebruiker en tussen alle partijen voor geselecteerde donorpoolen (1, 6, 9, 10)

Combineren van gegevens	Donorpool 1 ($5,1 \times 10^6$ cellen/ml)			Donorpool 6 ($6,5 \times 10^6$ cellen/ml)		
	Gemiddelde opbrengst (μg)	SD (μg)	CV (%)	Gemiddelde opbrengst (μg)	SD (μg)	CV (%)
Gebruiker A, alle partijen	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Gebruiker B, alle partijen	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Gebruiker C, alle partijen	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
	Donorpool 9 ($8,4 \times 10^6$ cellen/ml)			Donorpool 10 ($10,2 \times 10^6$ cellen/ml)		
	Gemiddelde opbrengst (μg)	SD (μg)	CV (%)	Gemiddelde opbrengst (μg)	SD (μg)	CV (%)
Gebruiker A, alle partijen	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Gebruiker B, alle partijen	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Gebruiker C, alle partijen	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

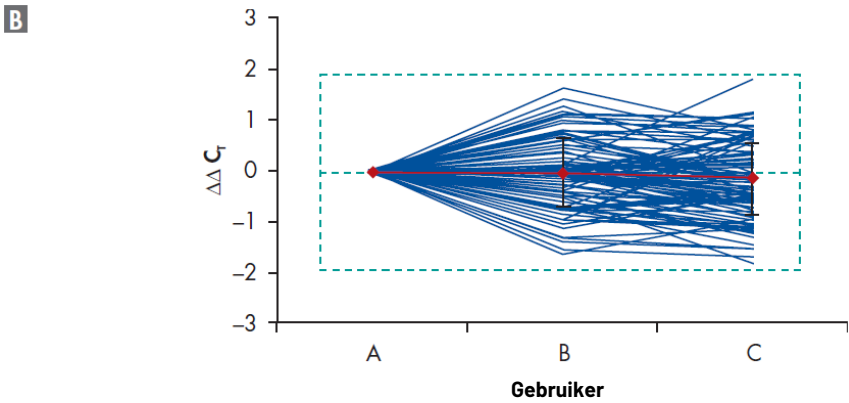
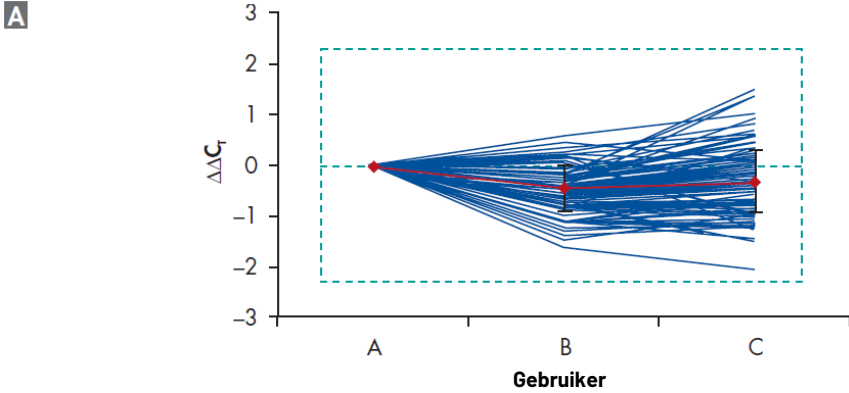
Tabel 1C: Reproduceerbaarheid binnen elke partij en tussen alle gebruikers voor de geselecteerde donorpoolen (1, 6, 9, 10)

Combineren van gegevens	Donorpool 1 ($5,1 \times 10^6$ cellen/ml)			Donorpool 6 ($6,5 \times 10^6$ cellen/ml)		
	Gemiddelde opbrengst (μg)	SD (μg)	CV (%)	Gemiddelde opbrengst (μg)	SD (μg)	CV (%)
Partij 1, alle gebruikers	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Partij 2, alle gebruikers	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Partij 3, alle gebruikers	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
	Donorpool 9 ($8,4 \times 10^6$ cellen/ml)			Donorpool 10 ($10,2 \times 10^6$ cellen/ml)		
	Gemiddelde opbrengst (μg)	SD (μg)	CV (%)	Gemiddelde opbrengst (μg)	SD (μg)	CV (%)
Partij 1, alle gebruikers	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Partij 2, alle gebruikers	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Partij 3, alle gebruikers	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

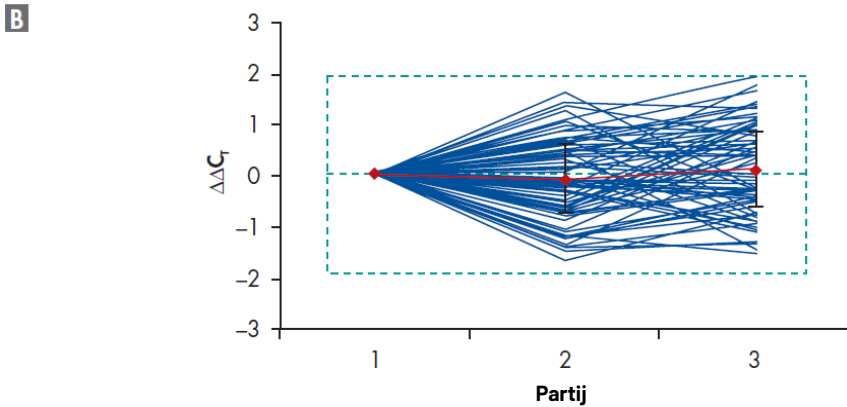
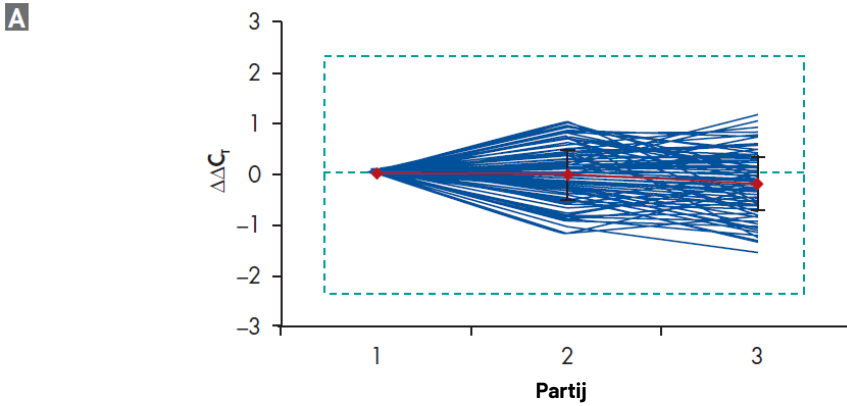
Tabel 1D: Reproduceerbaarheid tussen alle partijen en alle gebruikers voor de geselecteerde donorpoolen (1, 6, 9, 10)

Combineren van gegevens	Donorpool 1 ($5,1 \times 10^6$ cellen/ml)			Donorpool 6 ($6,5 \times 10^6$ cellen/ml)		
	Gemiddelde opbrengst (μg)	SD (μg)	CV (%)	Gemiddelde opbrengst (μg)	SD (μg)	CV (%)
Partij 1, alle gebruikers	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
	Donorpool 9 ($8,4 \times 10^6$ cellen/ml)			Donorpool 10 ($10,2 \times 10^6$ cellen/ml)		
	Gemiddelde opbrengst (μg)	SD (μg)	CV (%)	Gemiddelde opbrengst (μg)	SD (μg)	CV (%)
Partij 1, alle gebruikers	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Gedetailleerde analyse van 4 representatieve donorpoolen. De donorpoolen zijn geselecteerd aan de hand van het aantal witte bloedcellen en weerspiegelen de bovenste, middelste en onderste waarden van het normale bereik van het aantal witte bloedcellen ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocyten/ml). Het aantal witte bloedcellen geeft de gemiddelde waarde van de aantallen witte bloedcellen van de 3 donoren per donorpool weer.



Afbeelding 10: Reproduceerbaarheid van RT-PCR – tussen gebruikers. RNA gezuiverd in het in afbeelding 9 beschreven experiment is gebruikt voor realtime RT-PCR. Relatieve transcriptniveaus van **[A]** FOS en **[B]** IL1B zijn bepaald door realtime, tweevoudige RT-PCR waarbij 18S rRNA is gebruikt als internationale standaard. De waarden voor alle monsters zijn in kaart gebracht, in vergelijking met de waarden voor gebruiker A (10 donorpools \times 3 kitpartijen \times 4 replica's = 120 sets met gegevens voor elk gen), met gemiddelden (rode lijnen) en standaarddeviaties (zwarte balken) voor alle getoonde monsters. De gestreepte lijnen tonen de $\pm 3x$ totale precisie van de assays (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).



Afbeelding 11: Reproduceerbaarheid van RT-PCR – tussen kitpartijen. RNA gezuiverd in het in afbeelding 9 beschreven experiment is gebruikt voor realtime RT-PCR. Relatieve transcriptniveaus van **[A]** FOS en **[B]** IL1B zijn bepaald door realtime, tweevoudige RT-PCR waarbij 18S rRNA is gebruikt als internationale standaard. De waarden voor alle monsters zijn in kaart gebracht, in vergelijking met de waarden voor kitpartij 1 (10 donorpools \times 3 gebruikers \times 4 replica's = 120 sets met gegevens voor elk gen), met gemiddelden (rode lijnen) en standaarddeviaties (zwarte balken) voor alle getoonde monsters. De gestreepte lijnen tonen de $\pm 3x$ totale precisie van de assays (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

Tabel 2: Samenvatting van de RT-PCR-gegevens uit afbeelding 10 en afbeelding 11

Testsysteem	FOS/18S rRNA-assay		IL1B/18S rRNA-assay	
Vergelijking van gegevens	Gemiddelde ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Gemiddelde ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Reproduceerbaarheid binnen elke gebruiker en tussen alle partijen				
Alle gebruikers, partij 1-partij 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Alle gebruikers, partij 1-partij 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Alle gebruikers, partij 1-partij 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Reproduceerbaarheid binnen elke gebruiker en tussen alle partijen				
Alle partijen, gebruiker A-gebruiker A	0,00	0,00	0,00	0,00
Alle partijen, gebruiker A-gebruiker B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Alle partijen, gebruiker A-gebruiker C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Gebruiker: Technicus, heeft het onderzoek uitgevoerd.

Partij: Nummer van de in het onderzoek gebruikte kit.

SD: Standaarddeviatie.

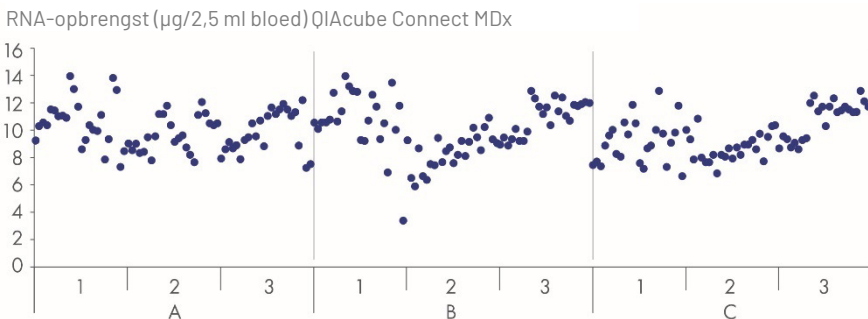
Gemiddelde $\Delta\Delta C_T$ -waarden (N = 120) en standaarddeviaties worden getoond voor de gegevens weergegeven in afbeelding 10 en afbeelding 11.

Geautomatiseerde RNA-isolatie

RNA-opbrengst van 2,5 ml gezond menselijk volbloed is $\geq 3 \mu\text{g}$ bij $\geq 95\%$ van de verwerkte monsters. Afbeelding 12 (pagina 56) toont de RNA-opbrengsten uit totaal 216 monsters die zijn geprepareerd met behulp van het geautomatiseerde protocol met 3 kitpartijen door 3 operators. Aangezien voor deze onderzoeken gepoolde bloedmonsters werden gebruikt in plaats van individuele PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's), weerspiegelen de resultaten niet de RNA-opbrengst die wordt verwacht van enkele monsters van individuele bloedafnames. Aangezien opbrengsten sterk afhankelijk zijn van de donor kunnen individuele opbrengsten variëren (afbeelding 12, pagina 56).

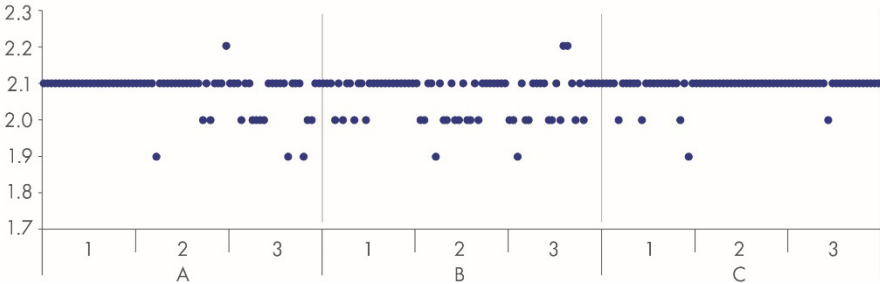
Bij minstens 95% van de monsters werd geen remming van RT-PCR gedetecteerd wanneer het eluaat garant stond voor maximaal 30% van het RT-PCR-reactievolumen. Met behulp van het geautomatiseerde protocol is kruiscontaminatie tussen monsters niet detecteerbaar, zoals gemeten door kwantitatieve, realtime RT-PCR van sequenties van de ABL1- en FOS-transcripten in RNA-negatieve monsters (water) gecombineerd met RNA-positieve monsters (menselijk volbloed) in dezelfde run.

RNA geïsoleerd met het PAXgene Blood RNA System en het geautomatiseerde protocol is puur, zoals wordt aangetoond door het gebrek aan remming van RT-PCR en de waarden van A_{260}/A_{280} tussen 1,8 en 2,2. Genomisch DNA van $\leq 1\%$ (w/w) is aanwezig in $\geq 95\%$ van alle monsters, gemeten met behulp van kwantitatieve realtime PCR van een sequentie van het gen voor bèta-actine. Afbeelding 13 en afbeelding 14 (pagina 57) tonen de A_{260}/A_{280} -waarden en relatief genomisch DNA uit totaal 216 monsters die zijn bereid met behulp van het geautomatiseerde protocol met 3 kitpartijen door 3 operators.



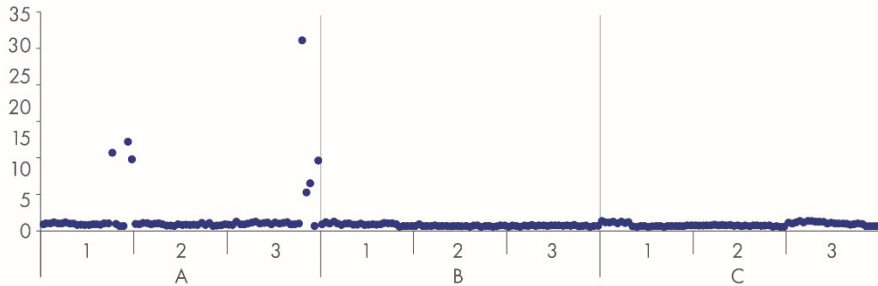
Afbeelding 12: RNA-opbrengst – geautomatiseerde verwerking met QIAcube Connect MDx. Bloedmonsters van individuele donors werden afgenomen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's). De inhoud van de buisjes werden gepoold in 6 donorpoolen en vervolgens opnieuw verdeeld. In totaal werden 216 buisjes (d.w.z. 36 per pool) verwerkt door 3 verschillende operators (A, B, C). Elke operator gebruikte 3 verschillende partijen (1, 2, 3) van de PAXgene Blood RNA Kit voor de geautomatiseerde isolatie met meerdere QIAcube Connect MDx en verwerkte viervoudige monsters van elk van de 6 donorpoolen. RNA-opbrengsten van alle individuele monsters worden getoond voor elke combinatie van operator en partij.

RNA-zuiverheid (A_{260}/A_{280}) QIAcube Connect MDx



Afbeelding 13: RNA-zuiverheid (A_{260}/A_{280} -waarden) – geautomatiseerde verwerking met QIAcube Connect MDx. RNA is gezuiverd door 3 verschillende operators (A, B, C) met behulp van 3 verschillende partijen (1, 2, 3) van de PAXgene Blood RNA Kit met QIAcube Connect MDx in het experiment dat wordt beschreven in afbeelding 12. A_{260}/A_{280} -waarden van alle individuele monsters worden getoond voor elke combinatie van operator en partij.

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



Afbeelding 14: RNA-zuiverheid (% contaminatie van genomisch DNA) – geautomatiseerde verwerking met QIAcube Connect MDx. RNA is gezuiverd door 3 verschillende operators (A, B, C) met behulp van 3 verschillende partijen (1, 2, 3) van de PAXgene Blood RNA Kit met QIAcube Connect MDx in het experiment dat wordt beschreven in afbeelding 12. Hoeveelheden genomisch DNA (w/w) in alle individuele monsters worden getoond voor elke combinatie van operator en partij.

Het geautomatiseerde protocol van RNA-isolatie met behulp van het PAXgene Blood RNA System biedt zeer reproduceerbare en herhaalbare RT-PCR-resultaten, waardoor het zeer robuust is voor klinisch diagnostische tests.

Stabiliteit van geïsoleerd RNA

RNA-monsters die geïsoleerd zijn uit met bloed gevulde PAXgene Blood RNA Tubes met de PAXgene Blood RNA Kit zijn gedurende 5 jaar stabiel indien opgeslagen bij -20°C en gedurende 7 jaar indien opgeslagen bij -70°C (eindpunt van onderzoeken).

Belangrijke opmerkingen

De QIAcube Connect MDx gebruiken

Zorg dat u bekend bent met het bedienen van de QIAcube Connect MDx. Lees de gebruikershandleiding bij het instrument en de aanvullende informatie die bij het instrument wordt meegeleverd, schenk hierbij met name aandacht aan de veiligheidsinformatie, voordat het geautomatiseerde PAXgene Blood RNA-protocol wordt gestart.

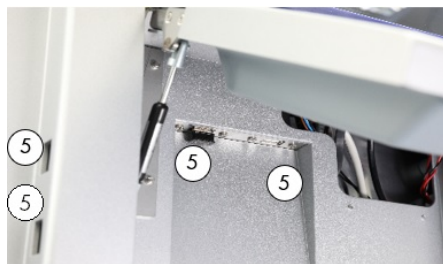
De QIAcube Connect MDx opstarten

Sluit de kap van de QIAcube Connect MDx en schakel het instrument in met de aan-uitschakelaar (zie afbeelding 15, pagina 60).

Er klinkt een piep en het startscherm verschijnt. Het instrument voert automatisch de initialisatietests uit.



Voorzijde van de QIAcube Connect MDx



Uitgetrokken aanraakscherm



Achterzijde van de QIAcube Connect MDx (linkerzijde)



Achterzijde van de QIAcube Connect MDx (rechterzijde)

Afbeelding 15: Externe eigenschappen van de QIAcube Connect MDx.

- | | |
|---|---|
| <p>① Aanraakscherm</p> <p>② Kap</p> <p>③ Afvallade</p> <p>④ Aan-uitschakelaar</p> | <p>⑤ 2 USB-poorten aan de linkerzijde van het aanraakscherm; 2 USB-poorten achter het aanraakscherm (wifi-module in 1 USB-poort geplaatst)</p> <p>⑥ RJ-45-ethernetpoort</p> <p>⑦ Netsnoeraansluiting</p> <p>⑧ Ventilatieopening</p> |
|---|---|

Aanraakscherm

De QIAcube Connect MDx wordt bediend met een aanraakscherm. Met het aanraakscherm kan de gebruiker het instrument bedienen en de gebruiker via een werktafel-opstelling begeleiden. Wanneer er een monster wordt verwerkt, worden de protocolstatus en de resterende tijd op het aanraakscherm weergegeven.



Afbeelding 16: Uitgetrokken aanraakscherm van QIAcube Connect MDx.

Protocollen installeren op de QIAcube Connect MDx

Een initiële installatie van protocollen kan vereist zijn voordat de eerste RNA-bereidingsrun op de QIAcube Connect MDx kan worden uitgevoerd. Installeer de protocollen van zowel 'PAXgene Blood RNA Part A' als 'PAXgene Blood RNA Part B'.

Protocollen voor de QIAcube Connect MDx worden verstrekt via www.qiagen.com en moeten naar de USB-stick worden gedownload die bij het instrument is meegeleverd. Deze protocollen worden overgedragen naar het instrument via de USB-poort.

De USB-poort (die zich op de zijkant van het aanraakscherm bevindt; zie afbeelding 15, pagina 60) maakt een verbinding mogelijk tussen de QIAcube Connect MDx en de USB-stick die bij het instrument is meegeleverd. Gegevensbestanden, zoals logbestanden of rapporten, kunnen ook via de USB-poort van het instrument naar de USB-stick worden overgezet.



Gebruik de USB-poort alleen voor de USB-stick die door QIAGEN wordt geleverd. Sluit geen andere apparatuur aan op deze poort.



Verwijder de USB-stick niet tijdens het downloaden van protocollen of tijdens het overzetten van gegevensbestanden of tijdens het uitvoeren van een protocol.

Raadpleeg de gerelateerde gebruiksaanwijzing van het instrument voor meer informatie over het uploaden van protocollen naar de QIAcube Connect MDx.

De QIAcube Connect MDx laden

Om tijd te besparen, kan het laden worden uitgevoerd tijdens een of beide van de 10-minuten centrifugatiestappen (stap 3 en 5) in 'Protocol: Geautomatiseerde isolatie van totaal-RNA uit menselijk volbloed afgenomen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's)', pagina 32.

Reagensflessen

Vul voor elke run op de QIAcube Connect MDx de 4 reagensflessen voorzichtig met de reagentia uit tabel 3 (pagina 63). Vul ze tot het maximale indicatieniveau of, wanneer dit niet mogelijk is, tot het niveau dat is toegestaan door de buffervolumes die worden geleverd met de PAXgene Blood RNA Kit. Voorzie de flessen en deksels duidelijk van een etiket met buffernamen en plaats de gevulde reagensflessen op de juiste posities in het reagensflessenrek. Laad het rek in de werktafel van het instrument zoals getoond (afbeelding 17 en afbeelding 18, respectievelijk pagina 63 en 64).



Het geleverde volume van buffer BR2 vult de reagensfles niet tot het indicatieniveau. Buffers BR3 en BR4 vullen de fles mogelijk niet tot het indicatieniveau na het verwerken van meerdere monsters in eerdere runs.



Verwijder de deksels van de flessen voordat u deze in de werktafel plaatst.



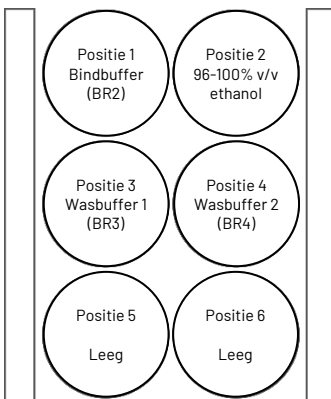
Buffervolumes die zijn geleverd in de PAXgene Blood RNA Kit (50) zijn voldoende voor maximaal 7 RNA-bereidingsruns met de QIAcube Connect MDx, met 2 tot 12 monsters per run. Runs met een kleiner aantal monsters per run moeten over het algemeen worden vermeden om 50 monsters per kit te kunnen verwerken. Meer dan 7 RNA-bereidingsruns kan zorgen voor onvoldoende buffervolumes voor het verwerken van de laatste monsters.

Tabel 3: Posities in het reagensflessenrek

Positie	Reagens
1	Bindbuffer (BR2)
2	Ethanol (96-100% v/v)
3	Wasbuffer 1 (BR3)
4	Wasbuffer 2 (BR4)*
5	– (leeg laten)
6	– (leeg laten)

* Wasbuffer 2 (BR4) wordt geleverd als concentraat. Voeg 4 volumes ethanol (96-100% v/v, zuiverheidsgraad p.a.) toe volgens de instructies op de fles om een werkoplossing te verkrijgen voordat u het concentraat voor de eerste keer gebruikt.

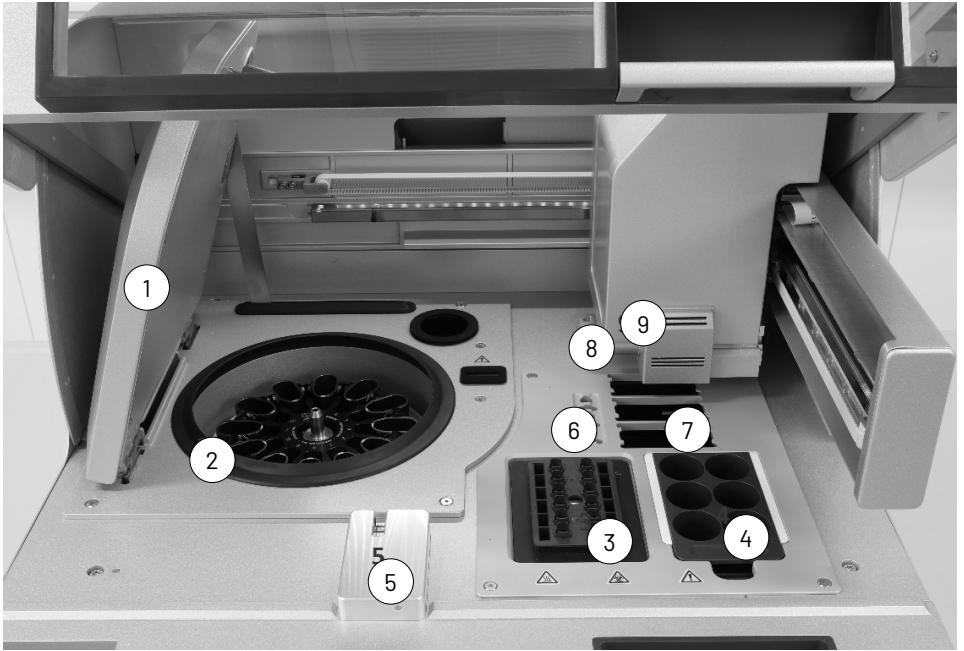
A



B



Afbeelding 17: Het reagensflessenrek laden. [A] Schematische weergave van de posities en inhoud van de flessen in het reagensflessenrek. **[B]** Het rek in de QIAcube Connect MDx laden.



Afbeelding 18: Binnenkant van de QIAcube Connect MDx.

- | | | | |
|---|-------------------------------|---|---|
| ① | Centrifugedeksel | ⑥ | MCT-sleuven |
| ② | Centrifuge | ⑦ | 3 sleuven voor puntrekken |
| ③ | Schudder | ⑧ | Afvoersleuven voor punten en kolommen |
| ④ | Reagensflessenrek | ⑨ | Robotarm (omvat 1 kanaalpipet, grijper, ultrasone en optische sensor en uv-led) |
| ⑤ | Tipsensor en kapvergrendeling | | |

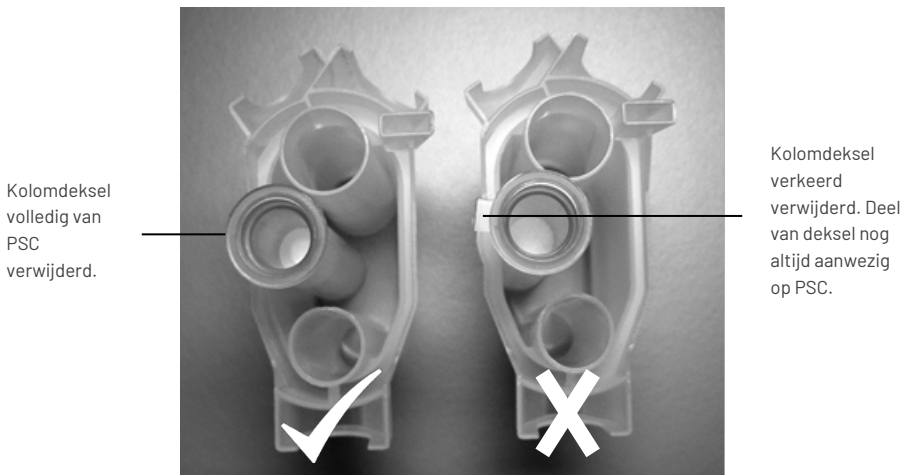
Spinkolommen (PSC, PRC), MCT en plastic artikelen voor QIAcube Connect MDx

Plaats 2 tiprekken gevuld met Filter-Tips 1000 µl op de QIAcube Connect MDx (zie afbeelding 18, pagina 64). Vul de rekken zo nodig bij met tips.

i Gebruik alleen 1000µl-filtertips die zijn ontworpen voor gebruik met de QIAcube Connect MDx.

Voorzie voor elk monster de rotoradapters en MCT van etikettering met een permanente pen. Open de te gebruiken PSC en knip de deksels volledig af met behulp van een schaar (zie afbeelding 19).

i Voor de juiste bediening van de robotgrijper van de QIAcube Connect MDx, verwijdert u de deksels volledig (knip deze af) en verwijdert u ook alle plastic onderdelen waarmee de deksels vastzitten aan de PSC (zie afbeelding 19). Anders kan de robotgrijper de PSC niet goed vastgrijpen.



Afbeelding 19: De PSC laden. De PSC wordt in de middelste positie van de rotoradapter geladen. Knip de deksel van de PSC af voordat de kolom wordt geladen.

Laad de PSC (zonder deksel, zie afbeelding 19, pagina 65), PRC en het geëtiketteerde MCT in de juiste posities in elke gelabelde rotoradapter, zoals getoond in tabel 4 en afbeelding 20.

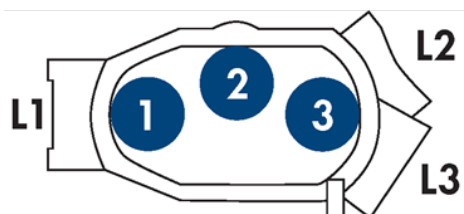


Controleer of de deksels van de spinkolom (PRC) en het MCT volledig naar beneden in de sleuven gedrukt zijn aan de rand van de rotoradapter, anders breken de deksels af tijdens de centrifugatie.

Tabel 4: Plastic verbruiksartikelen in de rotoradapter

Positie	Reagens	Positie van de deksel
1	PAXgene RNA-spinkolom (rood, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder-spinkolom (lila, PSC)(knip de deksel af voor het plaatsen in de rotoradapter)	–
3	MCT*	L3

* Gebruik de MCT's (1,5 ml) die met de PAXgene Blood RNA Kit worden geleverd.



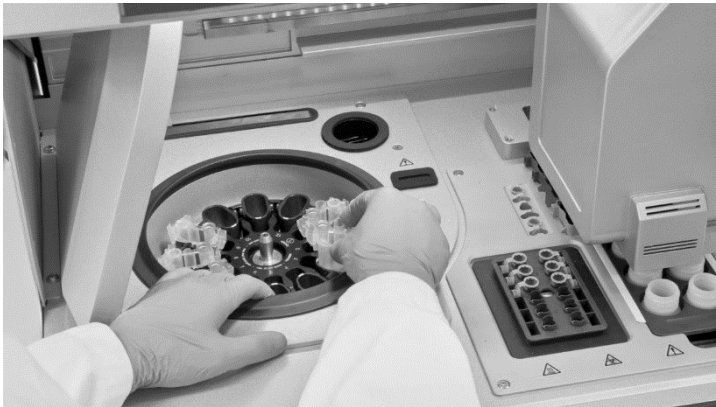
Afbeelding 20: Posities in de rotoradapter. De rotoradapter heeft drie posities voor buisjes (1–3) en drie posities voor de deksel (L1–L3).

De centrifuge laden

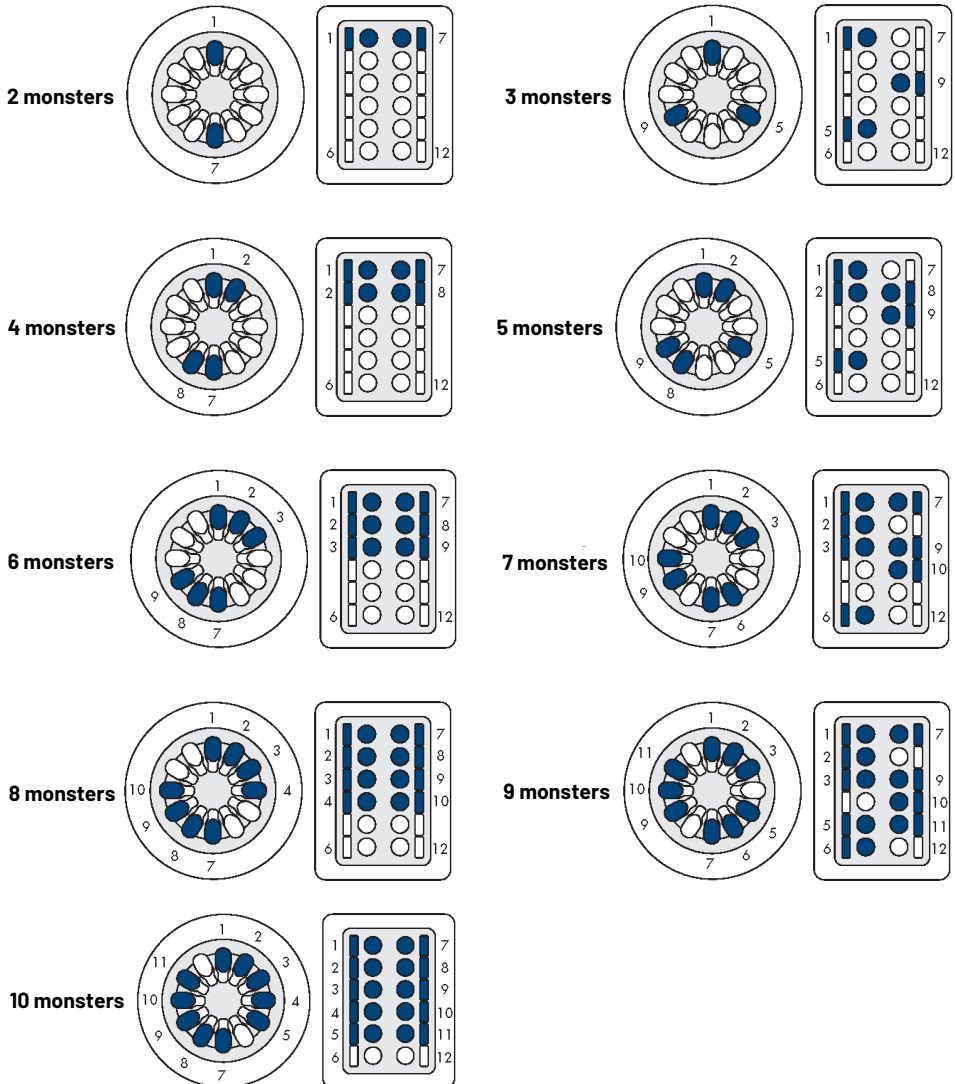
Laad de samengestelde rotoradapters in de centrifuge-emmers van de QIAcube Connect MDx zoals hieronder getoond in afbeelding 21.



Zorg er bij het laden voor dat de centrifuge-rotor radiaal wordt gebalanceerd wanneer er minder dan 12 monsters worden verwerkt (zie afbeelding 22, pagina 68). Alle centrifuge-emmers moeten worden bevestigd voordat een protocolrun wordt gestart, ook al worden er minder dan 12 monsters verwerkt. Eén monster of 11 monsters kunnen niet worden verwerkt.



Afbeelding 21: De centrifuge op de QIAcube Connect MDx laden. Laad de samengestelde rotoradapters in de centrifuge-emmers.



Afbeelding 22: De centrifuge en de schouder laden. De posities van de centrifuge en de schouder worden getoond van twee (2) tot tien (10) monsters. Eén (1) of elf (11) monsters kunnen niet worden verwerkt. Voor het verwerken van 12 monsters zijn alle centrifuge- en schouderposities geladen (afbeelding niet weergegeven).

Verwerkingsbuisjes

Verwijder de PT's van de eerdere runs aan de linkerkzijde in de MCT-sleuven (zie afbeelding 18, pagina 64). Vul 3 PT's met de hoeveelheid reagentia die wordt aangegeven in tabel 5, overeenkomstig het aantal monsters in de run.

Pipetteer het aangegeven volume DNA-digestiebuffer (RDD) in een PT voor het DNase I-incubatiemengsel en voeg het aangegeven volume van DNase I (RNFD)-voorraadoplossing toe. Pipetteer het volledige mengsel 3 maal voorzichtig op en neer met behulp van een 1000µl-pipetpunt om te mengen.



Gebruik de PT's van 2 ml die met de PAXgene Blood RNA Kit worden geleverd. Voorzie de buisjes duidelijk van etikettering met reagensnamen en plaats ze in de juiste positie in de MCT-sleuven, zoals weergegeven in tabel 6 (pagina 70).



DNase I (RNFD) is met name gevoelig voor fysieke denaturatie. Meng alleen door te pipetteren en gebruik pipetpunten met een wijde opening om afbraak te voorkomen. Niet vortexen.

Pipetteer alleen het vereiste volume zoals weergegeven in tabel 5 hieronder.

Tabel 5: Volume van reagentia vereist voor de PT's voor de MCT-sleuven

Aantal monsters	Reagensvolume voor het aangegeven aantal monsters (µl)		
	Proteïnase K (PK)	DNase I-incubatiemengsel	Elutiebuffer (BR5)
2	126	187 (23 DNase I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNase I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNase I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNase I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNase I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNase I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNase I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNase I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNase I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNase I + 806 Buffer RDD)	1177

Tabel 6: MCT-sleuven

	Positie		
	A	B	C
Inhoud	Proteïnase K	DNase I-incubatiemengsel	Elutiebuffer (BR5)
Vat	Verwerkingsbuisje*	Verwerkingsbuisje*	Verwerkingsbuisje*

* Gebruik de PT's van 2 ml die met de PAXgene Blood RNA Kit worden geleverd.

Afvoer

Voor veilige afvoer na specimenafname en handmatige RNA-isolatie dient u de veiligheidsinformatie en voorzorgsmaatregelen op pagina 18 en 19 respectievelijk te raadplegen.

Voor geautomatiseerde RNA-isolatie met behulp van QIAcube Connect MDx raadpleegt u afbeelding 21 en afbeelding 22, respectievelijk pagina 67 en 68, waarin de toegewezen sleuven voor gebruikte punten en kolommen voor afvoer staan aangegeven.

Referentias

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.

Probleemoplossingsgids

Dit gedeelte kan nuttig zijn bij het oplossen van eventuele problemen. Raadpleeg de pagina met veelgestelde vragen in ons centrum voor technische ondersteuning voor meer informatie: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. De wetenschappers bij de technische diensten van QIAGEN beantwoorden altijd graag uw vragen over de informatie en de protocollen in deze handleiding of over monster- en assaytechnologieën (zie de laatste pagina van deze handleiding voor contactgegevens of ga naar www.qiagen.com).

Opmerkingen en suggesties	
RNA afgebroken	
a) RNase-contaminatie	 Zorg ervoor dat er geen RNasen aan de reagentia wordt toegevoegd tijdens de procedure of latere handelingen (zie bijlage A, pagina 78).
Lage RNA-opbrengst	
b) Er is minder dan 2,5 ml bloed afgenomen in PAXgene Blood RNA Tube (BRT)	 Zorg ervoor dat er 2,5 ml bloed is afgenomen in de PAXgene Blood RNA Tube (BRT; zie de <i>Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Tube</i>)
c) Er is RNA-concentratie gemeten in water	 RNA moet worden verdund met 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* voor de juiste kwantificering (zie bijlage B, pagina 79).
d) Er zijn celresten overgebracht naar de PRC in stap 9 en 10 van het handmatige protocol	 Vermijd het overbrengen van grote deeltjes bij het pipetteren van het supernatant in stap 7 van het handmatige protocol (het overbrengen van kleine celresten heeft geen invloed op de procedure).
e) Het supernatant is niet volledig verwijderd in stap 3	 Zorg ervoor dat al het supernatant is verwijderd. Als het supernatant is gedecanteerd, verwijdert u druppels van de rand van de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) door te deppen met een papieren doek. Neem de juiste voorzorgsmaatregelen om kruisbesmetting te voorkomen.
f) Na de afname in de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) is het bloed minder dan 2 uur geïncubeerd	 Incubeer het bloed in de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) minimaal 2 uur na afname.




* Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Opmerkingen en suggesties	
Lage A_{260}/A_{280}-waarde	
g) Er is water gebruikt om RNA te verdunnen voor de A_{260}/A_{280} -meting	 Gebruik 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 om RNA te verdunnen voor de zuiverheidsmeting* (zie bijlage B, pagina 79).
h) De spectrofotometer is niet goed genuld	 Zet de spectrofotometer op nul met een blanco die bestaat uit dezelfde verhouding met elutiebuffer (BR5) en 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, als in de te meten monsters. De elutiebuffer (BR5) heeft een hoge absorptiewaarde bij 220 nm, wat kan leiden tot hoge niveaus van achtergrondabsorptie als de spectrofotometer niet goed is genuld.
Instrumentstoring	
i) De QIAcube Connect MDx werkte niet naar behoren	Lees de <i>Gebruikershandleiding bij de QIAcube Connect MDx</i> , schenk hierbij met name aandacht aan de het hoofdstuk voor probleemoplossing. Zorg ervoor dat het instrument juist is onderhouden, zoals wordt beschreven in de gebruikershandleiding.

* 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.

Symbolen

De volgende symbolen kunnen in de gebruiksaanwijzing of op de verpakking en etiketten zijn weergegeven. Aanvullende symbolen worden uitgelegd in Inhoud van de kit (pagina 6).

Symbol	Symbooldefinitie
V<N1>	Versie <N1> van het product
 <N2>	Bevat voldoende reagentia voor <N2> tests
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Uiterste gebruiksdatum
IVD	In-vitrodiagnostisch medisch hulpmiddel
REF	Catalogusnummer
LOT	Partijnummer
MAT	Materiaalnummer
COMP	Componenten
NUM	Nummer
KU	Kunitz-eenheden
ADD	Toevoegen
CONT	Bevat

RCNS

Gereconstitueerd

DNase

Deoxyribonuclease I

EtOH

Ethanol

GITC

Guanidine-isothiocynaat

RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

GTIN

Global Trade Item Number



Temperatuurbepering



Maximale temperatuur



Fabrikant

EC REP

Europese geautoriseerde vertegenwoordiger volgens Verordening (EU) 2017/746



Belangrijke opmerking



Toevoeging van ethanol



CE-markering. Dit product voldoet aan de vereisten van Verordening (EU) 2017/746 inzake in-vitrodiagnostische medische hulpmiddelen.

UDI

Uniek hulpmiddel-identificatienummer



Voorzichtig



WAARSCHUWING: Heet oppervlak

Contactgegevens

Bij QIAGEN staan de kwaliteit en beschikbaarheid van onze technische ondersteuning hoog in het vaandel. Bij onze technische afdelingen werken ervaren wetenschappers met uitgebreide praktische en theoretische ervaring en deskundigheid in moleculaire biologie en het gebruik van PreAnalytiX-producten. Neemt u gerust contact met ons op als u vragen hebt over de PAXgene Blood RNA Kit.

Neem voor technische ondersteuning en aanvullende informatie contact op met ons centrum voor technische ondersteuning via **www.qiagen.com/Support**. U kunt ook bellen naar 00800-22-44-6000 of contact opnemen met de afdeling technische diensten van QIAGEN of de plaatselijke distributeur (zie achterzijde of ga naar **www.qiagen.com**).

Bijlage A: Algemene opmerkingen over de verwerking van RNA

Verwerking van RNA



Ribonucleasen (RNasen) zijn zeer stabiele en actieve enzymen die doorgaans geen cofactoren nodig hebben om te functioneren. Gebruik geen kunststof of glazen instrumenten zonder verontreiniging met RNasen uit te sluiten. RNasen kunnen namelijk moeilijk worden geïnactiveerd en zelfs een zeer kleine hoeveelheid is voldoende om RNA af te breken. Let er goed op dat er tijdens of na de isolatieprocedure geen RNasen onopzettelijk in het RNA-monster terechtkomen. Neem voorzorgsmaatregelen tijdens de voorbehandeling en het gebruik van wegwerpbare en niet-wegwerpbare houders en oplossingen wanneer u met RNA werkt, zodat de omgeving RNase-vrij is en blijft.

Algemeen werk



Gebruik altijd de juiste microbiologische aseptische techniek wanneer u met RNA werkt. Op de handen en op stofdeeltjes kunnen bacteriën en schimmels aanwezig zijn; dit zijn de meest voorkomende bronnen van contaminatie met RNasen. Draag altijd latex of vinyl handschoenen bij het verwerken van reagentia en RNA-monsters, om contaminatie met RNasen via de huid of stof van laboratoriumapparatuur te voorkomen. Trek regelmatig schone handschoenen aan en houd alle buisjes zo veel mogelijk gesloten. Bewaar gezuiverd RNA op ijs als aliquots gepipetteerd zijn voor vervolgtoeepassingen.

Protocollen om contaminatie met RNase te verwijderen van glazen instrumenten en oplossingen kunnen worden gevonden in algemene richtlijnen voor moleculaire biologie, zoals Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Bijlage B: Kwantificatie en bepaling van de kwaliteit van totaal RNA

Kwantificatie van RNA

De RNA-concentratie moet worden bepaald door de absorptie bij 260 nm te meten (A_{260}) in een spectrofotometer. Om de significantie te waarborgen, moeten de waarden in het lineaire bereik van de spectrofotometer liggen. Een absorptie van 1 eenheid bij 260 nm komt overeen met 44 µg RNA per ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$). Dit verband is alleen geldig voor metingen in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Daarom is het noodzakelijk om het RNA-monster te verdunnen; dit moet worden gedaan met 10 mM Tris-HCl. Zoals hieronder wordt besproken (zie 'Zuiverheid van RNA', pagina 80), geeft de verhouding tussen de absorptiewaarden bij 260 en 280 nm een schatting van de RNA-zuiverheid. Zorg ervoor dat cuvettes RNase-vrij zijn bij het meten van RNA-monsters. Zet de spectrofotometer op nul met een blanco die bestaat uit dezelfde verhouding met elutiebuffer (BR5) en Tris-HCl-buffer als in de te meten monsters. De elutiebuffer (BR5) heeft een hoge absorptiewaarde bij 220 nm, wat kan leiden tot hoge niveaus van achtergrondabsorptie als de spectrofotometer niet goed is genuld. Een voorbeeld van een berekening van RNA-kwantificatie wordt hieronder getoond.

Volume van RNA-monster = 80 µl
Verdunning (1/15) = 10 µl RNA-monster + 140 µl 10 mM Tris-HCl, Ph 7,5

Meet de absorptie van het verdunde monster in een cuvette (RNase-vrij).

A_{260} = 0,3
Concentratie van het monster = $44 \times A_{260} \times \text{verdunningsfactor}$
= $44 \times 0,3 \times 15$

* Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

$$\begin{aligned}
 &= 198 \mu\text{g/ml} \\
 \text{Totale opbrengst} &= \text{concentratie} \times \text{volume van het monster in} \\
 &\quad \text{milliliters} \\
 &= 198 \mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml} \\
 &= 15,8 \mu\text{g RNA}
 \end{aligned}$$

Zuiverheid van RNA

De verhouding van de waarden bij 260 en 280 nm (A_{260}/A_{280}) geeft een schatting van de zuiverheid van RNA met betrekking tot verontreinigingen die in het UV absorberen, zoals proteïne. De verhouding A_{260}/A_{280} wordt echter aanzienlijk beïnvloed door pH. Een lagere pH-waarde resulteert in een lagere A_{260}/A_{280} -verhouding en verminderde gevoeligheid voor proteïnecontaminatie.* Voor nauwkeurige waarden raden wij aan om de absorptie te meten in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Zuiver RNA heeft een A_{260}/A_{280} -verhouding van 1,8-2,2 in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Zet de spectrofotometer op nul met een blanco die bestaat uit dezelfde verhouding met elutiebuffer (BR5) en Tris-HCl-buffer als in de te meten monsters. De elutiebuffer (BR5) heeft een hoge absorptiewaarde bij 220 nm, wat kan leiden tot hoge niveaus van achtergrondabsorptie als de spectrofotometer niet goed is genuld.

* 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.

Bijlage C: Verwerking van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's)



De volgende aanbevelingen van BD kunnen helpen bij de verwerking van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's). Raadpleeg de *Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Tube* voor meer informatie over de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's).

Instructies voor het verwijderen van de BD Hemogard-sluiting

1. Pak de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) met één hand vast en plaats uw duim onder de BD Hemogard-sluiting. (Plaats uw arm op een stevige ondergrond voor meer stabiliteit.) Draai met uw andere hand de BD Hemogard-sluiting terwijl u tegelijkertijd met uw duim van de andere hand omhoog drukt, uitsluitend totdat de buisstop los is.
2. Haal uw duim weg voordat u de sluiting optilt. Gebruik uw duim niet om de sluiting van de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's) af te drukken. Voorzichtig: er bestaat een gevaar voor blootstelling als de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's) bloed bevatten. Om letsel bij het verwijderen van de sluiting te helpen voorkomen, is het belangrijk dat de duim die wordt gebruikt om de dop naar boven te duwen, geen contact meer maakt met de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) zodra de BD Hemogard-sluiting los is gemaakt.
3. Til de sluiting van de PAXgene Blood RNA Tube (BRT). In het onwaarschijnlijke geval dat de plastic afscherming zich scheidt van de rubberen stop, de sluiting niet opnieuw in elkaar zetten. Verwijder de rubberen stop voorzichtig van de PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Instructies voor het plaatsen van de secundaire BD Hemogard-sluiting

1. Plaats de sluiting op de PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Draai en duw de stop stevig naar beneden totdat deze volledig is bevestigd. Het opnieuw plaatsen van de stop is noodzakelijk om ervoor te zorgen dat de sluiting stevig op de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) blijft zitten tijdens de verwerking.

Bestelgegevens

Product	Inhoud	Cat.nr.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, verwerkingsbuisjes, RNase-vrij DNase I, RNase-vrije reagentia en buffers. Voor gebruik in combinatie met de PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 bloedafnamebuizen	762165
Gerelateerde producten die bij QIAGEN kunnen worden besteld voor geautomatiseerde RNA-isolatie op QIAcube		
Starter Pack, QIAcube	Verpakking bevat: reagensflessenrekken (3); strips met reketiketten (8); 200µl-filtertips (1024); 1000µl-filtertips (1024); 1000µl-filtertips, wijde opening (1024); 30 ml-reagensflessen (18); rotoradapters (240); rotoradapterhouder	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Steriele, wegwerpfiltertips, in een rek	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Reagensflessen (30 ml) met deksels; 6 in verpakking; voor gebruik met het QIAcube-reagensflessenrek	990393
Rotor Adapters (10 × 24)	Voor 240 bereidingen: 240 wegwerprotoradapters; voor gebruik met QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Rek geschikt voor 6 × 30 ml-reagensflessen op de QIAcube-werktafel	9026197
Rotor Adapter Holder	Houder voor 12 wegwerprotoradapters; voor gebruik met QIAcube	990392

Product	Inhoud	Cat.nr.
Gerelateerde producten die bij BD kunnen worden besteld voor bloedafname met PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's)*		
BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set	21G, 0,75 inch (0,8 x 19 mm) naald, 12 inch (305 mm) slang met luer-adapter; 50 per box, 200 per kist	367286/ 367281
BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set	21G 3/4 inch (0,8 x 19 mm) naald, 12 inch (305 mm) slang met luer-adapter. 50/doos, 200/kist	367344
BD Vacutainer One-Use Holder	Kist alleen voor een diameter van 13 mm en 16 mm; 1000/kist	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm 4 ml afname met rode BD Hemogard-sluiting en papieren etiket; 100/doos, 1000/kist	368975/ 367812
BD Vacutainer EST Tube	13 x 75 mm 3,0 ml afname met doorzichtige BD Hemogard-sluiting en doorzichtig etiket; 100/doos, 1000/kist	362725
BD Vacutainer No Additive (Z) Tube	13 x 75 mm 3,0 ml afname met doorzichtige BD Hemogard-sluiting en papieren etiket; 100/doos, 1000/kist	366703

* Deze accessoires voor bloedafname zijn typische producten die kunnen worden gebruikt met de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT's). Om meer te weten over deze accessoires en over hoe u ze kunt bestellen, gaat u naar www.preanalytix.com.

Revisiegeschiedenis van document

Datum	Wijzigingen
[R1] april 2022	Eerste IVDR-uitgave
[R2] februari 2023	Adres van PreAnalytiX GmbH veranderd van 'Feldbachstrasse' naar 'Garstligweg 8'. BD-producten toegevoegd onder Bestelgegevens. Veiligheidsinformatie bijgewerkt.

Opmerkingen



Zie de (gebruikers)handleiding van de betreffende PreAnalytiX- en QIAGEN-kit voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules. PreAnalytiX en QIAGEN Handleidingen en gebruikershandleidingen van QIAGEN-kits zijn verkrijgbaar via www.preanalytix.com en www.qiagen.com of kunnen worden aangevraagd bij de technische dienst van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur.

**Better samples
More to explore**



Bekijk meer informatie op: www.preanalytix.com

HB-3009-002 02/2023