

Februar 2023.

Komplet PAXgene[®] Blood RNA Kit (priručnik) Uputstvo za upotrebu



Verzija 3 (V3)

IVD

Za korišćenje u in vitro dijagnostici



REF

762174



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

Proizvodi QIAGEN[®] GmbH za PreAnalytiX GmbH

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NEMAČKA

R2

MAT

1130774-SR

Zaštićeni znakovi: 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. Ako nije drugačije naznačeno, PreAnalytiX, logotip PreAnalytiX i svi ostali zaštitni znakovi su vlasništvo PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH.

Ugovor o ograničenoj licenci za komplet PAXgene Blood RNA Kit

Korišćenje ovog proizvoda označava da je kupac ili korisnik ovog proizvoda saglasan sa sledećim uslovima:

1. Ovaj proizvod sme da se koristi samo u skladu sa protokolima navedenim uz proizvod i u ovom priručniku i samo sa komponentama koje se nalaze u okviru panela. PreAnalytiX® ne odobrava licencu u okviru svoje intelektualne svojine za korišćenje ili kombinovanje isporučenih komponenti sa komponentama koje nisu deo ovog panela, osim onako kako je opisano u protokolima navedenim uz proizvod, u ovom priručniku i dodatnim protokolima dostupnim na adresama <http://www.qiagen.com> i www.preanalytix.com.
2. Osim izričito navedenih licenci, kompanija PreAnalytiX ne garantuje da ovaj komplet i/ili njegovo korišćenje ne krše prava nezavisnih proizvođača.
3. Ovaj komplet je licenciran za jednokratnu upotrebu i ne sme da se ponovo koristi, doručuje ili ponovo prodaje.
4. Kompanija PreAnalytiX posebno se odriče svih drugih licenci, izričitih ili impliciranih, osim onih izričito navedenih.
5. Kupac i korisnik ovog kompleta saglasni su da neće preduzeti i da neće drugim licima dozvoliti da preduzmu korake koji bi mogli da prouzrokuju ili omoguće bilo koje postupke zabranjene u prethodnom tekstu.
6. PreAnalytiX može da primeni zabrane ovog Ugovora o ograničenoj licenci na bilo kom sudu i povratice sve svoje istražne i sudske troškove, uključujući advokatske troškove, koji su u vezi sa primenom ovog Ugovora o ograničenoj licenci ili prava na intelektualnu svojinu koja se odnose na komplet i/ili njegove komponente.

Ažurirane odredbe licence potražite na adresama www.qiagen.com i www.preanalytix.com.

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

PreAnalytiX distributeri

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

Sadržaj

Sadržaj.....	3
Namena	6
Predviđeni korisnik.....	6
Opis i princip rada.....	7
Uvod	7
Princip i procedura.....	7
Prikupljanje i stabilizacija uzoraka	8
Izolacija RNK.....	8
Ručna izolacija RNK.....	9
Automatizovana izolacija RNK	11
Obezbeđeni materijal.....	14
Sadržaj kompleta	14
Komponente u kompletu	15
Potreban materijal koji se ne isporučuje	16
Za sve protokole.....	16
Za ručni protokol.....	16
Za automatizovani protokol	17
Upozorenja i mere predostrožnosti	18
Informacije o bezbednosti	18
Informacije za hitne slučajeve	18
Mere predostrožnosti	19
Skladištenje i rukovanje reagensima.....	22

Stabilnost tokom upotrebe.....	22
Prikupljanje uzoraka, skladištenje i rukovanje	23
Protokol: Ručna izolacija ukupne RNK iz humane pune krvi prikupljene u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes.....	24
Protokol: Automatizovana izolacija ukupne RNK iz humane pune krvi prikupljene u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	32
Ograničenja upotrebe proizvoda	40
Kontrola kvaliteta	40
Karakteristike performansi.....	41
Prikupljanje i stabilizacija uzoraka	41
Ručna izolacija RNK.....	46
Automatizovana izolacija RNK	54
Stabilnost izolovane RNK	57
Važne napomene	58
Korišćenje instrumenta QIAcube Connect MDx	58
Pokretanje instrumenta QIAcube Connect MDx	58
Instaliranje protokola na QIAcube Connect MDx	60
Postavljanje u instrument QIAcube Connect MDx	61
Spin kolonice (PSC, PRC), MCT epruvete i QIAcube Connect MDx plastični pribor	64
Odlaganje u otpad.....	70
Reference	71
Vodič za rešavanje problema	72
Simboli.....	74
Kontakt informacije.....	76

Dodatak A: Opšte napomene o rukovanju sa RNK	77
Dodatak B: Kvantifikacija i određivanje kvaliteta ukupne RNK	78
Dodatak C: Rukovanje epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	80
Informacije o poručivanju	82
Istorija revizija dokumenta.....	84

Namena

Za korišćenje u in vitro dijagnostici.

Sistem PAXgene Blood RNA System sastoji se od epruvete za prikupljanje uzoraka krvi (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) i kompleta za prečišćavanje nukleinske kiseline (PAXgene Blood RNA Kit). Namenjen je za prikupljanje, skladištenje i transport krvi i stabilizaciju intracelularne RNK u zatvorenoj epruveti i naknadnu izolaciju i prečišćavanje RNK domaćina iz pune krvi za RT-PCR analizu koja se koristi u molekularnom dijagnostičkom testiranju.

Karakteristike performansi sistema PAXgene Blood RNA System su uspostavljene samo sa transkriptima gena FOS i IL1B. Korisnik je odgovoran za uspostavljanje odgovarajućih karakteristika performansi za PAXgene Blood RNA System za druge ciljne transkripte.

Indikacije za upotrebu

Komplet PAXgene Blood RNA Kit služi za prečišćavanje intracelularne RNK iz pune krvi prikupljene u epruvetu PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Kada se komplet koristi u kombinaciji sa epruvetom PAXgene Blood RNA Tube (BRT), sistem pruža prečišćenu intracelularnu RNK iz pune krvi za RT-PCR analizu koja se koristi u molekularnom dijagnostičkom testiranju.

Predviđeni korisnik

Namenjeno je da proizvod koriste stručni korisnici, npr. tehničari i lekari koji su obučeni za in vitro dijagnostičke procedure.

Komplet je predviđen za profesionalnu upotrebu.

Opis i princip rada

Uvod

Prikupljanje pune krvi je prvi korak u mnogim molekularnim ispitivanjima koja se koriste za proučavanje ćelijske RNK. Međutim, glavni problem u takvim eksperimentima je nestabilnost ćelijskog profila RNK in vitro. Studije u kompaniji PreAnalytiX su pokazale da se broj kopija pojedinačnih vrsta mRNK u punoj krvi može promeniti više od 1000 puta tokom skladištenja ili transporta na sobnoj temperaturi (Rainen et al., 2002). Ovo je uzrokovano i brзом razgradnjom RNK i indukovanom ekspresijom određenih gena nakon uzimanja uzorka krvi. Takve promene u profilu ekspresije RNK onemogućavaju pouzdane studije ekspresije gena. Metoda koja čuva profil ekspresije RNK tokom i posle flebotomije je stoga od suštinskog značaja za preciznu analizu ekspresije gena u humanoј punoj krvi.

Princip i procedura

Kompanija PreAnalytiX je razvila sistem koji omogućava prikupljanje, stabilizaciju, skladištenje i transport uzoraka humane pune krvi, zajedno sa brzim i efikasnim protokolom za izolaciju intracelularne RNK. Sistem zahteva upotrebu epruveta PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) za prikupljanje krvi i stabilizaciju RNK, nakon čega sledi ručna ili automatizovana izolacija RNK pomoću kompleta PAXgene Blood RNA Kit. I ručni i automatizovani protokoli pružaju suštinski ekvivalentne performanse u pogledu kvaliteta i prinosa RNK. Podaci o performansama za ručni protokol (počevši od strane 46 i automatizovani protokol (počevši od strane 54) su uključeni u ovaj priručnik.

PAXgene Blood RNA System omogućava standardizaciju predanalitičkih koraka toka rada od prikupljanja uzoraka krvi do izolacije ćelijske RNK prema standardu ISO 20186-1:2019, Molekularna in vitro dijagnostička ispitivanja – specifikacije za procese pre ispitivanja pune venske krvi – deo 1: Izolovana ćelijska RNK.

Prikupljanje i stabilizacija uzoraka

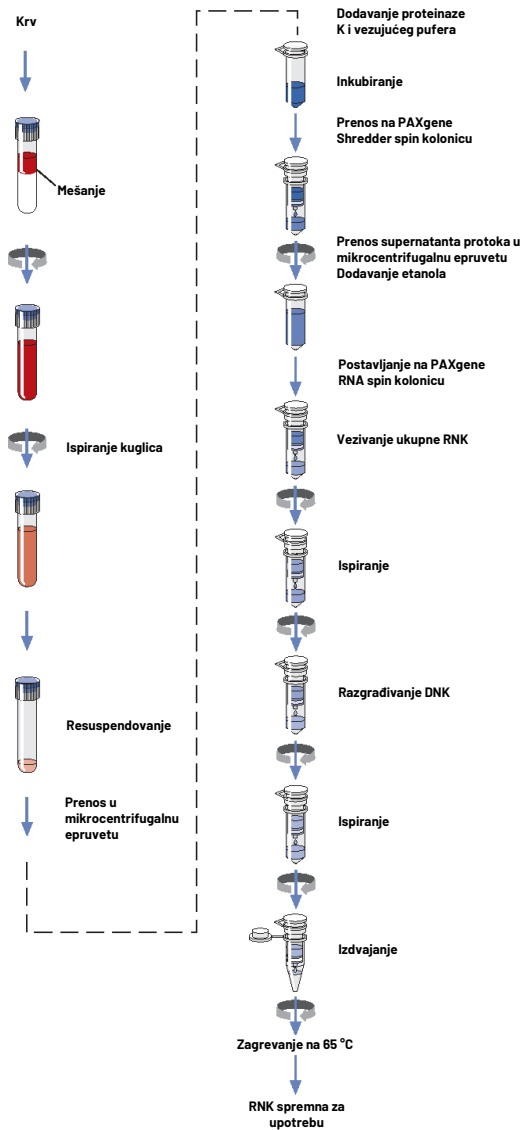
Epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) sadrže vlasnički reagens za stabilizaciju RNK. Ovaj aditiv štiti molekule RNK od degradacije od strane ribonukleaza i smanjuje ex vivo promene u ekspresiji gena na najmanju moguću meru. Karakteristike performansi sistema PAXgene Blood RNA System su uspostavljene sa transkriptima gena FOS i IL1B koji se mogu videti počevši od strane 41.

Izolacija RNK

Komplet PAXgene Blood RNA Kit služi za izolaciju ukupne RNK iz 2,5 ml humane pune krvi prikupljene u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Postupak je jednostavan i može se izvršiti korišćenjem ručnih ili automatizovanih procedura (pogledajte sliku 1 ili sliku 3, strana 10 ili 12, tim redom). U oba protokola izolacija počinje korakom centrifugiranja radi stvaranja kuglica nukleinskih kiselina u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Kuglice se ispiraju i resuspenduju, nakon čega sledi ručna ili automatizovana izolacija RNK. U principu, oba protokola prate iste korake protokola sa istim komponentama kompleta.

Ručna izolacija RNK

Detaljno, resuspendovane kuglice se inkubiraju u optimizovanim puferima zajedno sa proteinazom K (PK) kako bi se postigla razgradnja proteina. Obavlja se dodatno centrifugiranje kroz PAXgene Shredder spin kolonicu (PSC) radi homogenizacije lizata ćelija i uklanjanje zaostalih ostataka ćelija, a supernatant protočne frakcije se prenosi u svežu mikrocentrifugalnu epruvetu (MCT). Etanol se dodaje da bi se prilagodili uslovi vezivanja, a lizat se nanosi na spin kolonicu PAXgene RNA (PRC). Tokom kratkog centrifugiranja, RNK se selektivno vezuje za PAXgene silicijumsku membranu, dok kontaminatni prolaze. Zaostali kontaminanti se uklanjaju u nekoliko efikasnih koraka ispiranja. Između prvog i drugog koraka ispiranja, membrana se tretira dezoksiribonukleazom I (RNFD) kako bi se uklonili tragovi vezane DNK. Nakon koraka ispiranja, RNK se ispira u puferu za ispiranje (BR5) i denaturiše se toplotom. Karakteristike performansi ručne izolacije RNK pomoću sistema PAXgene Blood RNA System mogu se pogledati na stranici 46.



Slika 1: Ručna procedura za PAXgene Blood RNA.

Automatizovana izolacija RNK

Izolacija RNK u krvi je automatizovana na instrumentu QIAGEN QIAcube Connect MDx. Inovativni instrument koristi naprednu tehnologiju za obradu QIAGEN spin kolona, omogućavajući besprekornu integraciju automatizovane pripreme uzoraka niske propusnosti u laboratorijski tok posla. Priprema uzoraka pomoću QIAcube Connect MDx prati iste korake kao i ručni postupak (tj. liza, vezivanje, ispiranje i izdvajanje), i može se izvesti korišćenjem istog kompleta PAXgene Blood RNA Kit.

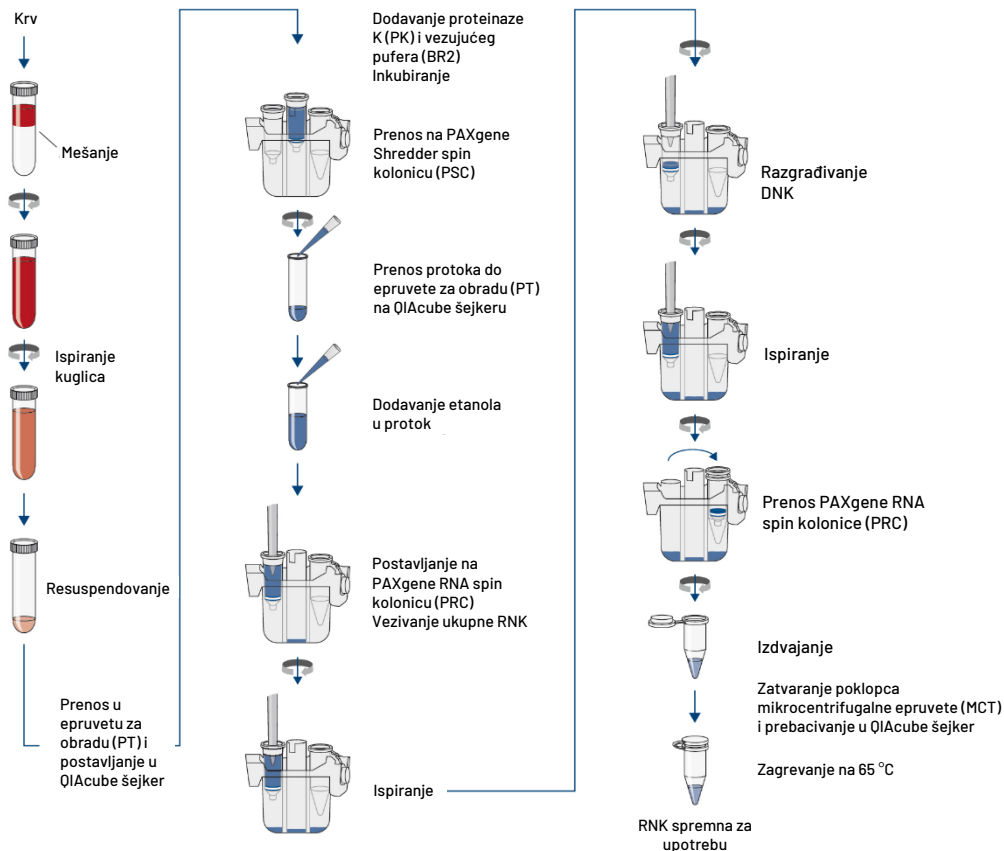


Slika 2: QIAcube Connect MDx.



Instrument QIAGEN QIAcube Connect MDx nije dostupan u svim zemljama. Obratite se tehničkoj službi kompanije QIAGEN za detaljnije informacije.

Automatizovani protokol izolacije RNK sastoji se od 2 dela (ili protokola), „PAXgene Blood RNA Part A“ (od krvi u epruveti PAXgene Blood RNA Tube do izdvajanja) i „PAXgene Blood RNA Part B“ (od perioda nakon izdvajanja do RNK spremne za upotrebu), sa kratkom ručnom intervencijom između 2 dela (pogledajte sliku 3).




Slika 3: Automatizovana procedura PAXgene Blood RNA.

Centrifugirane, isprane i resuspendovane kuglice nukleinske kiseline (pročitajte odeljak „Izolacija RNK“, strana 8) prenose se iz epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT) u epruvete za obradu (PT), koje se stavljaju u jedinicu termošejkera na radnom stolu instrumenta QIAcube Connect MDx. Rukovalac bira i pokreće protokol „PAXgene Blood RNA Part A“ iz menija. QIAcube Connect MDx obavlja korake protokola do izdvajanja RNK u puferu za izdvajanje (BR5). Rukovalac prenosi MCT epruvete koje sadrže prečišćenu RNK u jedinicu termošejkera instrumenta QIAcube Connect MDx. Rukovalac bira i pokreće protokol „PAXgene Blood RNA Part B“ iz menija i instrument QIAcube Connect MDx obavlja toplotnu denaturaciju. Karakteristike performansi automatizovane izolacije RNK pomoću sistema PAXgene Blood RNA System na instrumentu QIAcube Connect MDx mogu se pogledati na stranici 54.

Obezbeđeni materijal

Sadržaj kompleta

PAXgene Blood RNA Kit Kataloški br. Broj uređaja za prikupljanje			(50) 762174 50
Naziv komponente	Opis	Simbol	Količina
BR1	Pufer za resuspenziju	RES BUF	20 ml
BR2	Vezujući pufer*	BIND BUF	18 ml
BR3	Pufer za ispiranje 1*	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Pufer za ispiranje 2 (koncentrat) [†]	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Pufer za izdvajanje	ELU BUF	6 ml
RNFW	Voda bez ribonukleaze (boca)	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinaza K (zeleni poklopac)	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA spin kolonice (crvene) [‡]	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Epruvete za obradu (2 ml) [§]	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard™	Sekundarni BD Hemogard poklopci	SEC CLOS	50
MCT	Mikrocentrifugalne epruvete (1,5 ml) [§]	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	Dezoksiribonukleaza I, bez ribonukleaze (liofilizovana)	DNA REM	1500 Kunitz jedinica [¶]
RDD	Pufer za razgrađivanje DNK (beli poklopac)	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	Pufer za resuspenziju dezoksiribonukleaze (epruveta, ljubičasti poklopac)	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder spin kolonice (ljubičasto) [‡]	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Priručnik	Priručnik za komplet PAXgene Blood RNA Kit (verzija 3)		1

* Nije kompatibilno sa reagensima za dezinfekciju koji sadrže izbeljivač. Sadrži gvanidijumsku so. Informacije o bezbednosti potražite na stranici 18.

[†] Pufer za ispiranje 2 (BR4) se isporučuje kao koncentrat. Pre prvog korišćenja, dodajte 4 zapremine etanola (96–100% v/v, stepena čistoće p.a.), kao što je naznačeno na bočici da biste dobili radni rastvor.

[‡] Svaka kolonice je upakovana u blister koji je namenjen samo za jednokratnu upotrebu. Uputstva o odlaganju na otpad potražite u bezbednosnim informacijama.

⁸ Epruvete su dostupne u plastičnim vrećicama i svaka epruveta je namenjena samo za jednokratnu upotrebu. Uputstva o odlaganju na otpad potražite u bezbedosnim informacijama.

⁹ Kunitz jedinice su jedinice koje se često koriste za merenje dezoksiribonukleaze I, definisane kao količina dezoksiribonukleaze I koja uzrokuje povećanje vrednosti A_{260} od 0,001 u minuti po mililitru na 25 °C, pH 5,0, sa visoko polimerizovanom DNK kao supstratom (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* 33, 349 i 363).

Komponente u kompletu

Naziv komponente	Opis	Aktivni sastojak	Koncentracija
BR1	Pufer za resuspenziju	Nema	-
BR2	Vezujući pufer	Gvanidin tiocijanat	od ≥ 30 do $< 50\%$ w/w
BR3	Pufer za ispiranje 1	Gvanidin tiocijanat Etanol	od ≥ 10 do $< 20\%$ w/w od ≥ 3 do $< 10\%$ w/w
BR4	Pufer za ispiranje 2 (koncentrat)	Nema	-
BR5	Pufer za izdvajanje	Nema	-
RNFW	Voda bez ribonukleaze (boca)	Nema	-
PK	Proteinaza K (zeleni poklopac)	Proteinaza K	od ≥ 1 do $< 3\%$ w/w
RNFD	Dezoksiribonukleaza I, bez ribonukleaze (liofilizovana)	Dezoksiribonukleaza	od ≥ 90 do $\leq 100\%$ w/w
RDD	Pufer za razgrađivanje DNK (beli poklopac)	Nema	-
DRB	Pufer za resuspenziju dezoksiribonukleaze (epruveta, ljubičasti poklopac)	Nema	-

Potreban materijal koji se ne isporučuje

Kada radite sa hemikalijama, uvek nosite odgovarajući laboratorijski mantil, rukavice za jednokratnu upotrebu i zaštitne naočare. Više informacija potražite u odgovarajućim listovima sa bezbednosnim podacima (Safety Data Sheet, SDS) dostupnim kod dobavljača proizvoda.

Za sve protokole

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; kat. br. 762165)
- Etanol (96–100% v/v, stepena čistoće p.a.)
- Pipete* (10 µl – 4 ml)
- Sterilni pipetni nastavci bez ribonukleaze, sa aerosolnom barijerom[†]
- Graduisani cilindar[‡]
- Centrifuga* sposobna da postigne 3000–5000 × g i opremljena je rotorom promenljivog nagiba (engl. swing-bucket) za držanje epruveta PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Vrtložna mešalica*
- Drobljeni led
- Trajna olovka za označavanje

Za ručni protokol

- Mikrocentrifuga sa promenljivom brzinom* sposobna da postigne opseg od najmanje 1000–8000 × g, mada su primenljive niže i veće g-sile (detalje potražite u koracima protokola), i opremljena rotorom za MCT od 2 ml

* Uverite se da se uređaji i instrumenti redovno proveravaju, održavaju i kalibrišu u skladu sa preporukama proizvođača.

[†] Postarajte se za to da se upoznate sa smernicama o rukovanju sa RNK (Dodatak A, strana 75).

[‡] Za dodavanje etanola u koncentrat pufera BR4.

- Šejker-inkubator* sposoban za inkubaciju na 55 °C i 65 °C i protresanje na ≥ 400 o/min, ne premašujući 1400 o/min (npr. Eppendorf® Thermomixer Compact ili ekvivalent)

Za automatizovani protokol

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

Potrošni materijal za instrument QIAcube Connect MDx:

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

Dodatni pribor za instrument QIAcube Connect MDx:

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

QIAcube Connect MDx servisni paketi:

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

* Uverite se da su uređaj i instrument provereni, održavani i kalibrisani redovno u skladu sa preporukama proizvođača.

[†] Takođe uključen u Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, kat. br. 990395).

Upozorenja i mere predostrožnosti

Kupci u Evropskoj uniji treba da imaju u vidu da su u obavezi da svaki ozbiljni incident koji se desi u vezi sa medicinskim uređajem prijave proizvođaču i nadležnom organu države članice u kojoj se nalazi korisnik i/ili pacijent.

Kupci van Evropske unije treba da imaju u vidu da će možda morati da konsultuju lokalne propise kada proizvođaču i/ili njegovom ovlašćenom predstavniku i regulatornim telima koja su na snazi u zemlji u kojoj se nalazi korisnik i/ili pacijent prijavljuju ozbiljne incidente koji su se desili u vezi sa uređajem.

Informacije o bezbednosti

Kada radite sa hemikalijama i biološki opasnim materijalima, uvek nosite odgovarajući laboratorijski mantil, rukavice za jednokratnu upotrebu i zaštitne naočare. Više informacija potražite u odgovarajućim listovima sa bezbednosnim podacima (Safety Data Sheet, SDS). Dostupni su na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na adresi www.qiagen.com/safety, na kojoj možete da pronađete, pogledate i odštampate SDS-ove za svaki QIAGEN komplet i komponentu kompleta.

- Sve hemikalije i sav biološki materijal potencijalno su opasni. Uzorci krvi i analitički uzorci potencijalno su infektivni i moraju da se tretiraju kao biološki otpad.
- Odložite biološki otpad i otpad kompleta u skladu sa bezbednosnim postupcima koji su važeći u vašoj zemlji.

Informacije za hitne slučajeve

CHEMTREC

Van SAD i Kanade +1 703-527-3887

Mere predostrožnosti

Kada radite sa krvlju, primenjujte univerzalne mere predostrožnosti kako biste izbegli rizik od potencijalnog izlaganja patogenima koji se prenose krvlju (npr. HIV, hepatitis B i drugi virusi koji se prenose krvlju). Koristite rukavice, mantile, zaštitne naočare, drugu ličnu zaštitnu opremu i tehničke mere za zaštitu od izlaganja krvlju. Više informacija potražite u odgovarajućim listovima sa bezbednosnim podacima (Safety Data Sheet, SDS). Dostupni su na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na adresi www.preanalytix.com, na kojoj možete da pronađete, pogledate i odštampate SDS-ove za ovaj komplet.

OPREZ



NEMOJTE dodavati izbeljivač niti kisele rastvore direktno u otpad od pripreme uzorka.

Vezujući pufer (BR2) i pufer za ispiranje 1 (BR3) sadrže gvanidin tiocijanat, koji može formirati visoko reaktivna jedinjenja u kombinaciji sa izbeljivačem. Ako se vezujući pufer (BR2) ili pufer za ispiranje 1 (BR3) prosnu, očistite odgovarajućim laboratorijskim deterdžentom i vodom. Ako se prospe tečnost koja sadrži potencijalno infektivne agense, prvo očistite zahvaćeno područje laboratorijskim deterdžentom i vodom, a zatim natrijum hipohloritom od 1% (v/v) (izbeljivačem).

Rastvor za stabilizaciju RNK i mešavina krvi iz epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mogu se dezinfikovati korišćenjem 1 dela komercijalnog rastvora izbeljivača (5% natrijum hipohlorit) na 9 delova mešavine rastvora za stabilizaciju RNK i krvi.

Otpad od pripreme uzoraka, kao što su supernatanti iz koraka centrifugiranja u postupku izolacije RNK, treba smatrati potencijalno infektivnim. Koristite kontejnere

za biološku opasnost za odlaganje bioloških materijala. Odlaganje se mora obavljati u skladu sa lokalnim propisima i procedurama vašeg objekta.

Specifične komponente kompleta PAXgene Blood RNA Kit su namenjene samo za jednokratnu upotrebu. Informacije o pojedinačnim komponentama potražite pod stavkom Sadržaj kompleta na strani 14.

Sledeće izjave o opasnostima i merama opreza se odnose na komponente kompleta PAXgene Blood RNA Kit. Informacije o bezbednosti epruveta PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) potražite u *Priručniku za epruvete PAXgene Blood RNA Tube*.

Pufer BR2



Sadrži: gvanidin tiocijanat. Opasnost! Štetno ako se proguta. Može biti štetno u kontaktu sa kožom ili ako se udahne. Uzrokuje ozbiljno oštećenje oka. Štetno po vodene organizme sa dugoročnim posledicama. Kontakt sa kiselinama oslobađa veoma toksičan gas. Izbegavajte ispuštanje u okruženje. Nosite zaštitne rukavice / zaštitnu odeću / zaštitu za oči i zaštitu za lice. AKO UĐE U OČI: Pažljivo ispirajte vodom nekoliko minuta. Uklonite sočiva ako ih nosite i ako je to lako uraditi. Nastavite sa ispiranjem. Ako ste bili izloženi ili mislite da je došlo do toga: odmah pozovite lekara ili CENTAR ZA TROVANJE. Odložite sadržaj/kontejner na odobreno mesto za odlaganje otpada.

Pufer BR3



Sadrži: etanol; gvanidin tiocijanat. Opasnost! Zapaljiva tečnost i isparenje. Uzrokuje ozbiljno oštećenje oka. Kontakt sa kiselinama oslobađa veoma toksičan gas. Držite dalje od toplote / varnica / otvorenog plamena / toplih površina. Zabranjeno pušenje. Nosite zaštitne rukavice / zaštitnu odeću / zaštitu za oči i zaštitu za lice. AKO UĐE U OČI: Pažljivo ispirajte vodom nekoliko minuta. Uklonite sočiva ako ih nosite i ako je to lako uraditi. Nastavite sa ispiranjem. Odmah pozovite lekara ili CENTAR ZA TROVANJE.

Dezoksiribonukleaza I



Sadrži: dezoksiribonukleazu. Opasnost! Može da dovede do alergijske reakcije na koži. Može izazvati simptome alergije ili astme ili teškoće u disanju ako se udahne. Izbegavajte udisanje prašine. Nosite zaštitne rukavice / zaštitnu odeću / zaštitu za oči i zaštitu za lice. Nosite respiratornu zaštitu. Ako ste bili izloženi ili mislite da je došlo do toga: pozovite lekara ili CENTAR ZA TROVANJE. Izvedite osobu na svež vazduh i omogućite joj slobodno disanje. Operite kontaminiranu odeću pre ponovne upotrebe.

Skladištenje i rukovanje reagensima

PAXgene RNA spin kolonice (PRC), PAXgene Shredder spin kolonice (PSC), proteinazu K(PK) i puferne (BR1, BR2, BR3, BR4 i BR5) treba čuvati na suvom mestu, na temperaturi navedenoj na etiketi kompleta.

Set RNase-Free DNase Set, koji sadrži dezoksiribonukleazu I (RNFD), pufer za razlaganje DNK (RDD) i pufer za resuspenziju dezoksiribonukleaze (DRB), isporučuje se na sobnoj temperaturi. Čuvajte sve komponente seta RNase-Free DNase Set na temperaturi navedenoj na etiketi odmah po prijemu. Kada se pravilno skladišti, komplet je stabilan do isteka roka trajanja na kutiji kompleta.

Obratite pažnju na datume isteka roka upotrebe i uslove čuvanja koji su odštampani na kutiji i nalepnicama svih komponenti. Nemojte da koristite komponente kojima je istekao rok upotrebe ili koje su nepropisno čuvane.

Stabilnost tokom upotrebe

Nakon prve upotrebe kompleta, reagensi su stabilni u originalnim bocama na temperaturama i do datuma isteka roka navedenog na etiketi kutije kompleta.

Reagensi sipani u boce za reagense instrumenta QIAcube Connect MDx su stabilni tokom 3 meseca skladištenja na sobnoj temperaturi (15–25 °C).

Rekonstituisana dezoksiribonukleaza I (RNFD) je stabilna na temperaturi od 2–8 °C 6 nedelja u originalnoj staklenoj bočici (osnovni rastvor).

Alikvoti za jednokratnu upotrebu osnovnog rastvora u MCT epruветama od 1,5 ml (isporučuju se sa kompletom) stabilni su tokom 9 meseci skladištenja na -20 °C. Nakon odmrzavanja, alikvoti za jednokratnu upotrebu su stabilni tokom 6 nedelja skladištenja na 2-8 °C.

Prikupljanje uzoraka, skladištenje i rukovanje

Komplet PAXgene Blood RNA Kit je namenjen za upotrebu sa krvlju prikupljenom u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes. Krv se mora prikupljati u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) u skladu sa uputstvima u Priručniku za epruvete PAXgene Blood RNA Tube. Ako je potrebno, preporuke o rukovanju epruветama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) potražite u Dodatku C (strana 80). Svi uzorci treba da se tretiraju kao potencijalno opasni. Karakteristike performansi sistema PAXgene Blood RNA System su uspostavljene sa transkriptima gena FOS i IL1B koji se mogu videti na stranama 42-45.

Protokol: Ručna izolacija ukupne RNK iz humane pune krvi prikupljene u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes

Važne napomene pre početka

- Uverite se da kutija kompleta nije otvorena ni oštećena, kao i da puferi nisu procurili. Nemojte koristiti komplet koji je oštećen.
- Kada koristite pipetu, uverite se da je podešena na ispravnu zapreminu i da se tečnost pažljivo i potpuno aspirira i razliva.
- Da biste izbegli prenos uzoraka u pogrešnu epruvetu ili spin kolonicu, uverite se da su sve epruvete i spin kolonice pravilno označene pomoću trajne olovke. Označite poklopac i telo svake epruvete (PT, MCT). Za spin kolonice, označite telo njene PT epruvete. Zatvorite svaku epruvetu ili spin kolonicu nakon što se u nju prenese tečnost.
- Prolivanje uzoraka i pufera tokom postupka mogu smanjiti prinos i čistoću RNK.
- Ako nije drugačije naznačeno, svi koraci ovog protokola, uključujući korake centrifugiranja, treba da se izvode na sobnoj temperaturi (15–25 °C).

Zbog osetljivosti tehnologija amplifikacije nukleinske kiseline, neophodne su sledeće mere predostrožnosti prilikom rukovanja uzorcima kako bi se izbegla unakrsna kontaminacija:

- Pažljivo pipetirajte uzorak u spin kolonicu (PSC, PRC) bez vlaženja oboda kolonice.
- Uvek zamenite pipetne nastavke između prenosa tečnosti. Koristite pipetne nastavke sa aerosolnom barijerom.
- Izbegavajte dodirivanje membrane spin kolonice (PSC, PRC) pipetnim nastavkom.
- Nakon mešanja u vrtložnoj mešalici ili zagrevanja MCT epruvete, kratko je centrifugirajte da biste uklonili kapi sa unutrašnjosti poklopcu.

- Nosite rukavice tokom celog postupka. Odmah zamenite rukavice u slučaju kontakta između rukavica i uzorka.
- Zatvorite spin kolonicu (PSC, PRC) pre nego što je postavite stavite u mikrocentrifugu. Centrifugirajte kao što je opisano u postupku.
- Otvarajte jednu po jednu spin kolonicu (PSC, PRC) i vodite računa o tome da sprečite stvaranje aerosola.
- Za efikasnu paralelnu obradu više uzoraka, popunite nosač sa PT epruvetama na koje se spin kolonice (PSC, PRC) mogu preneti nakon centrifugiranja. Odbacite korišćene PT epruvete koje sadrže protok i postavite spin kolonice (PSC, PRC) u nove PT epruvete pre nego što ih vratite u mikrocentrifugu.

Šta je potrebno uraditi pre početka postupka?

- Krv se mora prikupljati u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) u skladu sa uputstvima u *Priručniku za epruvete PAXgene Blood RNA Tube*. Ako je potrebno, preporuke o rukovanju epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) potražite u Dodatku C (strana 80).
- Postarajte se za to da se epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkubiraju najmanje 2 sata na sobnoj temperaturi nakon prikupljanja krvi kako bi se osigurala potpuna liza krvnih ćelija i taloženje RNK. Inkubiranje epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT) preko noći može povećati prinose. Ako nije obavljena početna inkubacija krvi na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 sata pre skladištenja na 2–8 °C, –20 °C ili –70 °C, prvo uravnotežite epruvetu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) na sobnoj temperaturi, a zatim je inkubirajte na ovoj temperaturi 2 sata pre početka postupka.
- Pročitajte informacije o bezbednosti na strani 18.
- Pročitajte smernice o rukovanju sa RNK (Dodatak A, strana 77).
- Uverite se da se instrumenti, kao što su pipete i šejker-inkubator, redovno proveravaju i kalibrišu prema preporukama proizvođača.

- Za korake 5 i 20 potreban je šejker-inkubator. Podesite temperaturu šejker-inkubatora na 55 °C.
- Nakon skladištenja, vezujući pufer (BR2) može formirati talog. Ako je potrebno, zagrejte na 37 °C da se rastvori.
- Pufer za ispiranje 2 (BR4) se isporučuje kao koncentrat. Pre prvog korišćenja, dodajte 4 zapremine etanola (96–100% v/v, stepena čistoće p.a.), kao što je naznačeno na bočici da biste dobili radni rastvor.
- Ako prvi put koristite set RNase-Free DNase Set, pripremite osnovni rastvor dezoksiribonukleaze I. Rastvorite čvrstu dezoksiribonukleazu I (RNFD; 1500 Kunitz jedinica)* u 550 µl pufera za resuspenziju dezoksiribonukleaze (DRB) koji se isporučuje sa setom. Vodite računa o tome da se ne izgubi nimalo dezoksiribonukleaze I (RNFD) prilikom otvaranja bočice. Nemojte vrtložno mešati rekonstituisanu dezoksiribonukleazu I (RNFD). Dezoksiribonukleaza I je posebno osetljiva na fizičku denaturaciju. Mešanje treba vršiti samo laganim okretanjem bočice.
- Rekonstituisana dezoksiribonukleaza I (RNFD) može se čuvati na temperaturi od 2–8 °C u originalnoj staklenoj bočici (osnovni rastvor) ili na -20 °C nakon uklanjanja osnovnog rastvora iz staklene bočice i podele na alikvote za jednokratnu upotrebu (koristite MCT epruvetu od 1,5 ml koja se isporučuje sa kompletom; ima dovoljno za 5 alikvota). Odmrznuti alikvoti mogu se skladištiti na temperaturi od 2–8 °C. Nemojte ponovo zamrzavati alikvote nakon odmrzavanja.
- Prilikom rekonstituisanja i alikvotiranja dezoksiribonukleaze I (RNFD), obavezno pratite smernice za rukovanje sa RNK (Dodatak A, strana 77).

* Kunitz jedinice su jedinice koje se često koriste za merenje dezoksiribonukleaze I, definisane kao količina dezoksiribonukleaze I koja uzrokuje povećanje vrednosti A_{260} od 0,001 u minuti po mililitru na 25 °C, pH 5,0, sa visoko polimerizovanom DNK kao supstratom (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 i 363).

Postupak

1. Centrifugirajte epruvetu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 10 min na 3000–5000 × g rotorom sa promenljivim nagibom (engl. swing-bucket).



Postarajte se za to da se uzorak krvi inkubira u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT) najmanje 2 sata na sobnoj temperaturi (15–25 °C) kako bi se postigla potpuna liza krvnih ćelija i taloženje RNK.



Rotor mora da sadrži adaptore za epruvete sa okruglim dnom. Ako se koriste druge vrste adaptera za epruvete, epruvete se mogu slomiti tokom centrifugiranja.

2. Uklonite supernatant dekantiranjem ili pipetiranjem. Dodajte 4 ml vode bez ribonukleaze (RNFV) u kuglice i zatvorite epruvetu novim sekundarnim BD Hemogard zatvaračem (isporučuje se sa kompletom).

Ako se supernatant dekantira, vodite računa o tome da ne remetite kuglice i osušite obod epruvete čistim papirnim ubrusom.

3. Vrtložno mešajte dok se kuglice vidljivo ne rastvore i centrifugirajte 10 min na 3000–5000 × g rotorom sa promenljivim nagibom. Uklonite i bacite ceo supernatant.

Mali ostaci koji ostaju u supernatantu nakon vrtložnog mešanja, ali pre centrifugiranja, neće uticati na postupak.



Nepotpuno uklanjanje supernatanta će inhibirati lizu i razblažiti lizat, a samim tim uticati na uslove vezivanja RNK na membranu PAXgene.

4. Dodajte 350 µl pufera za resuspenziju (BR1) i vrtložno mešajte dok se kuglice vidljivo ne rastvore.
5. Pipetom premestite uzorak u MCT epruvetu od 1,5 ml. Dodajte 300 µl vezujućeg pufera (BR2) i 40 µl proteinaze K (PK). Vrtložno mešajte 5 s i inkubirajte 10 min na 55 °C koristeći šejker-inkubator na 400–1400 o/min. Nakon inkubacije, podesite temperaturu šejker-inkubatora na 65 °C (za korak 20).



Ne mešajte vezujući pufer (BR2) i proteinazu K (PK) zajedno pre nego što ih dodate u uzorak.

6. Pipetom prenesite lizat direktno u PSC kolonicu (ljubičasta) smeštenu u PT epruveti od 2 ml i centrifugirajte 3 min maksimalnom brzinom (ali ne prelazeći $20.000 \times g$).



Pažljivo pipetom prenesite lizat u spin kolonicu (PSC) i vizuelno proverite da li je lizat u potpunosti prenet u spin kolonicu (PSC).

Da biste sprečili oštećenje kolonica (PSC) i epruveta (PT), ne premašujte $20.000 \times g$.



Neki uzorci mogu proteći kroz PSC kolonicu bez centrifugiranja. Razlog za to je niska viskoznost nekih uzoraka i to ne treba ga uzimati kao pokazatelj kvara proizvoda.

7. Pažljivo prenesite ceo supernatant protočne frakcije u svežu MCT epruvetu od 1,5 ml MCT bez remećenja kuglica u PT epruveti.
8. Dodajte 350 μ l etanola (96–100% v/v, stepena čistoće p.a.). Vrtložno mešajte i centrifugirajte kratko (1–2 s na 500 – $1000 \times g$) da biste uklonili kapi sa unutrašnje strane poklopca epruvete.



Dužina centrifugiranja ne sme da premašuje 1–2 s, jer to može dovesti do peletiranja nukleinskih kiselina i smanjenih prinosa ukupne RNK.

9. Pipetom prenesite 700 μ l uzorka u PRC kolonicu (crvenu) smeštenu u PT epruvetu od 2 ml i centrifugirajte 1 min na 8000 – $20.000 \times g$. Postavite spin kolonicu (PRC) u novu PT epruvetu od 2 ml i odbacite staru PT epruvetu koja sadrži protok.
10. Pipetom premestite preostali uzorak u PRC kolonicu i centrifugirajte 1 min na 8000 – $20.000 \times g$. Postavite spin kolonicu (PRC) u novu PT epruvetu od 2 ml i odbacite staru PT epruvetu koja sadrži protok.



Pažljivo pipetom prenesite uzorak u spin kolonicu (PRC) i vizuelno proverite da li je uzorak u potpunosti prenet u spin kolonicu (PRC).

11. Pipetom prenesite 350 µl pufera za ispiranje 1 (BR3) u PRC. Centrifugirajte 1 min na $8000\text{--}20.000 \times g$. Postavite spin kolonicu (PRC) u novu PT epruvetu od 2 ml i odbacite staru PT epruvetu koja sadrži protok.
12. Dodajte 10 µl osnovnog rastvora dezoksiribonukleaze I (RNFD) u 70 µl pufera za razgradnju DNK (RDD) u MCT epruvetu od 1,5 ml. Pomešajte blagim udaranjem epruvete i kratko centrifugirajte da bi se prikupila zaostala tečnost sa bočnih strana epruvete.

Ako se obrađuje, na primer, 10 uzoraka, dodajte 100 µl osnovnog rastvora dezoksiribonukleaze (RNFD) u 700 µl pufera za razgradnju DNK (RDD). Koristite MCT epruvetu od 1,5 ml koja se isporučuju sa kompletom.



Dezoksiribonukleaza I je posebno osetljiva na fizičku denaturaciju. Mešanje treba vršiti samo laganim udaranjem epruvete. Nemojte vrtložno mešati.

13. Pipetom premestite mešavinu za inkubaciju dezoksiribonukleaze I (RNFD) (80 µl) direktno na membranu PRC kolonice i stavite na radnu površinu stola ($20\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$) 15 min.



Postarajte se za to da se mešavina za inkubaciju dezoksiribonukleaze I (RNFD) postavlja direktno na membranu. Razgrađivanje DNK neće biti potpuno ako se deo mešavine nanese na zidove ili na O-prsten spin kolonice (PRC) i tu ostane.

14. Pipetom prenesite 350 µl pufera za ispiranje 1 (BR3) u PRC i centrifugirajte 1 min na $8000\text{--}20.000 \times g$. Postavite spin kolonicu (PRC) u novu PT epruvetu od 2 ml i odbacite staru PT epruvetu koja sadrži protok.
15. Pipetom prenesite 500 µl pufera za ispiranje 2 (BR4) u PRC i centrifugirajte 1 min na $8000\text{--}20.000 \times g$. Postavite spin kolonicu (PRC) u novu PT epruvetu od 2 ml i odbacite staru PT epruvetu koja sadrži protok.



Pufer za ispiranje 2 (BR4) se isporučuje kao koncentrat. Postarajte se za to da se pre upotrebe doda etanol u pufer za ispiranje 2 (BR4) (pogledajte „Šta je potrebno uraditi pre početka procedure“, strana 25).

16. Dodajte još 500 µl pufera za ispiranje 2 (BR4) u PRC kolonicu. Centrifugirajte 3 min na 8000–20.000 × *g*.
17. Odbacite PT epruvetu koja sadrži protok i stavite PRC kolonicu u novu PT epruvetu od 2 ml. Centrifugirajte 1 min na 8000–20.000 × *g*.
18. Odbacite PT epruvetu koja sadrži protok. Postavite PRC kolonicu u MCT epruvetu od 1,5 ml i pipetom prenesite 40 µl pufera za izdvajanje (BR5) direktno na membranu PRC-a. Centrifugirajte 1 min na 8000–20.000 × *g* da biste izdvojili RNK. Važno je navlažiti celu membranu puferom za izdvajanje (BR5) kako bi se postigla maksimalna efikasnost izdvajanja.
19. Ponovite korak izdvajanja (korak 18) kao što je opisano, koristeći 40 µl pufera za izdvajanje (BR5) i istu MCT epruvetu.
20. Inkubirajte eluat 5 min na 65 °C u šejkeru-inkubatoru (od koraka 5) bez mućkanja. Nakon inkubacije, odmah ohladite na ledu.



Ova inkubacija uzoraka na 65 °C denaturiše RNK za naknadne primene. Čak i ako naknadna primena obuhvata korak toplotne denaturacije, nemojte izostaviti ovaj korak. Dovoljna denaturacija RNK u ovom trenutku je od suštinskog značaja za maksimalnu efikasnost u naknadnim primenama.

Nemojte prekoračivati vreme ili temperaturu inkubacije.

21. Ako se uzorci RNK neće odmah koristiti, čuvajte ih na -20 °C ili -70 °C.

Pošto RNK ostaje denaturisana nakon ponovljenog zamrzavanja i odmrzavanja, nije potrebno ponavljati inkubaciju na 65 °C. Ako koristite uzorke RNK u dijagnostičkom ispitivanju, sledite uputstva proizvođača.

Za tačnu kvantifikaciju RNK apsorpcijom na 260 nm, preporučujemo razblaživanje uzoraka sa 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Razblaživanje uzorka u vodi bez ribonukleaze može dovesti do netačno niskih vrednosti.

Nulirajte spektrofotometar koristeći prazni uzorak koji se sastoji od istog udela pufera za izdvajanje (BR5) i Tris-HCl pufera kao u uzorcima koji će se meriti. Pufer za izdvajanje (BR5) ima visoku apsorpciju na 220 nm, što može dovesti do visokih nivoa pozadinske apsorpcije ako spektrofotometar nije pravilno nuliran.



Za kvantifikaciju u Tris HCl puferu, koristite odnos $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$.
Pročitajte Dodatak B, strana 78.

22. Ponovo zatvorite sve boce koje sadrže puferu i vodu bez ribonukleaze, bočice i epruvete koje sadrže enzime i enzimске puferu, kao i vrećice koje sadrže plastične materijale iz kompleta koji se koristi za protokol. Preostali sadržaj kompleta čuvajte kao što je opisano u odeljku „Skladištenje i rukovanje reagensima“ (strana 22) i „Stabilnost tokom upotrebe“ (strana 22) do dalje upotrebe.

* Kada radite sa hemikalijama, uvek nosite odgovarajući laboratorijski mantil, rukavice za jednokratnu upotrebu i zaštitne naočare. Više informacija potražite u odgovarajućim listovima sa bezbednosnim podacima (Safety Data Sheet, SDS) dostupnim kod dobavljača proizvoda.

Protokol: Automatizovana izolacija ukupne RNK iz humane pune krvi prikupljene u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Važne napomene pre početka

- Uverite se da kutija kompleta nije otvorena ni oštećena, kao i da puferi nisu procurili. Nemojte koristiti komplet koji je oštećen.
- Kada koristite pipetu, uverite se da je podešena na ispravnu zapreminu i da se tečnost pažljivo i potpuno aspirira i razliva.
- Da biste izbegli prenos uzoraka u pogrešne epruvete i plastični potrošni materijal, postarajte se da su sve PT i MCT epruvete i adapteri rotora pravilno označeni trajnom olovkom. Označite poklopac i telo svake MCT i PT epruvete i spoljni zid svakog adaptera rotora.
- Prolivanje uzoraka i pufera tokom postupka mogu smanjiti prinos i čistoću RNK.
- Ako nije drugačije naznačeno, svi koraci ovog protokola, uključujući korake centrifugiranja, treba da se izvode na sobnoj temperaturi (15–25 °C).

Zbog osetljivosti tehnologija amplifikacije nukleinske kiseline, neophodne su sledeće mere predostrožnosti prilikom rukovanja uzorcima kako bi se izbegla unakrsna kontaminacija:

- Pažljivo pipetirajte uzorak u PT na dno epruvete bez vlaženja oboda epruvete.
- Uvek zamenite pipetne nastavke između prenosa tečnosti. Koristite pipetne nastavke sa aerosolnom barijerom.
- Izbegavajte dodirivanje membrane spin kolonice (PSC, PRC) pipetnim nastavkom.
- Nakon mešanja u vrtložnoj mešalici ili zagrevanja MCT epruvete, kratko je centrifugirajte da biste uklonili kapi sa unutrašnjosti poklopcu.

- Nosite rukavice tokom celog postupka. Odmah zamenite rukavice u slučaju kontakta između rukavica i uzorka.

Šta je potrebno uraditi pre početka postupka?

- Krv se mora prikupljati u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) u skladu sa uputstvima u *Priručniku za epruvete PAXgene Blood RNA Tube*. Ako je potrebno, preporuke o rukovanju epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) potražite u Dodatku C (strana 80).
- Postarajte se za to da se epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkubiraju najmanje 2 sata na sobnoj temperaturi nakon prikupljanja krvi kako bi se osigurala potpuna liza krvnih ćelija i taloženje RNK. Inkubiranje epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT) preko noći može povećati prinose. Ako je epruveta PAXgene Blood RNA Tube (BRT) bila skladištena na temperaturi 2–8 °C, –20 °C ili –70 °C nakon prikupljanja krvi, prvo je uravnotežite na sobnu temperaturu, a zatim je čuvajte na sobnoj temperaturi 2 h pre početka postupka.
- Pročitajte informacije o bezbednosti na strani 18.
- Pročitajte „Važne napomene“, strana 58.
- Pročitajte smernice o rukovanju sa RNK (Dodatak A, strana 77).
- Pročitajte odgovarajući Korisnički priručnik za QIAcube Connect MDx i sve dodatne informacije koje se isporučuju sa instrumentom, obraćajući pažnju na bezbednosne informacije.
- Uverite se da se uređaji i instrumenti, kao što su pipete i QIAcube Connect MDx, redovno proveravaju i kalibrišu prema preporukama proizvođača.
- Nakon skladištenja, vezujući pufer (BR2) može formirati talog. Ako je potrebno, zagrejte na 37 °C da se rastvori.
- Pufer za ispiranje 2 (BR4) se isporučuje kao koncentrat. Pre prvog korišćenja, dodajte odgovarajuću zapreminu etanola (96–100% v/v, stepena čistoće p.a.), kao što je naznačeno na bočici da biste dobili radni rastvor.

- Ako prvi put koristite set RNase-Free DNase Set, pripremite osnovni rastvor dezoksiribonukleaze I. Rastvorite čvrstu dezoksiribonukleazu I (RNFD; 1500 Kunitz jedinica)* u 550 µl pufera za resuspenziju dezoksiribonukleaze (DRB) koji se isporučuje sa setom. Vodite računa o tome da se ne izgubi nimalo dezoksiribonukleaze I (RNFD) prilikom otvaranja bočice. Nemojte vrtložno mešati rekonstituisanu dezoksiribonukleazu I (RNFD). Dezoksiribonukleaza I je posebno osetljiva na fizičku denaturaciju. Mešanje treba vršiti samo laganim okretanjem bočice.
- Rekonstituisana dezoksiribonukleaza I (RNFD) može se čuvati na temperaturi od 2–8 °C u originalnoj staklenoj bočici (osnovni rastvor) ili na –20 °C nakon uklanjanja osnovnog rastvora iz staklene bočice i podele na alikvote za jednokratnu upotrebu (koristite MCT epruvetu od 1,5 ml koja se isporučuje sa kompletom; ima dovoljno za 5 alikvota). Odmrznuti alikvoti mogu se skladištiti na temperaturi od 2–8 °C. Nemojte ponovo zamrzavati alikvote nakon odmrzavanja.
- Prilikom rekonstituisanja i alikvotiranja dezoksiribonukleaze I (RNFD), obavezno pratite smernice za rukovanje sa RNK (Dodatak A, strana 77).
- Instalirajte ispravan adapter za šejker (isporučuje se sa QIAcube Connect MDx; koristite adapter za safe-lock epruvete od 2 ml, označen sa „2”), i postavite nosač šejkera na vrh adaptera.
- Proverite fioku za otpad i ispraznite je ako je potrebno.
- Instalirajte sve srodne protokole ako to već nije učinjeno za prethodne cikluse. QIAcube Connect MDx zahteva preuzimanje svih protokola koji se nalaze u srodnoj zip datoteci. Pročitajte „Instaliranje protokola na QIAcube Connect MDx”, strana 60.

* Kunitz jedinice su jedinice koje se često koriste za merenje dezoksiribonukleaze I, definisane kao količina dezoksiribonukleaze I koja uzrokuje povećanje vrednosti A_{260} od 0,001 u minuti po mililitru na 25 °C, pH 5,0, sa visoko polimerizovanom DNK kao supstratom (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 i 363).

Postupak

1. Zatvorite poklopac instrumenta QIAcube Connect MDx i uključite instrument putem prekidača za napajanje (pogledajte sliku 15, strana 59).

Oglasiće se zvučni signal i prikazati početni ekran. Instrument automatski vrši testove inicijalizacije.

2. Otvorite poklopac instrumenta QIAcube Connect MDx i postavite potrebne reagense i plastični pribor u instrument. Pročitajte „Postavljanje u instrument QIAcube Connect MDx“, strana 61.

Da biste uštedeli vreme, postavljanje možete obaviti tokom jednog ili oba sledeća koraka centrifugiranja od 10 minuta (koraci 3 i 5).

3. Centrifugirajte epruvetu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 10 min na 3000–5000 × *g* rotorom sa promenljivim nagibom (engl. swing-bucket).



Postarajte se za to da se uzorak krvi inkubira u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT) najmanje 2 sata na sobnoj temperaturi (15–25 °C) kako bi se postigla potpuna liza krvnih ćelija i taloženje RNK.








Rotor mora da sadrži adaptere za epruvete sa okruglim dnom. Ako se koriste druge vrste adaptera za epruvete, epruvete se mogu slomiti tokom centrifugiranja.

4. Uklonite supernatant dekantiranjem ili pipetiranjem. Ako se supernatant dekantira, vodite računa o tome da ne remetite kuglice i osušite obod epruvete čistim papirnim ubrusom. Dodajte 4 ml vode bez ribonukleaze (RNFV) u kuglice i zatvorite epruvetu novim sekundarnim BD Hemogard zatvaračem (isporučuje se sa kompletom).

5. Vrtložno mešajte dok se kuglice vidljivo ne rastvore i centrifugirajte 10 min na 3000–5000 × *g* rotorom sa promenljivim nagibom. Uklonite i bacite ceo supernatant.

Mali ostaci koji ostaju u supernatantu nakon vrtložnog mešanja, ali pre centrifugiranja, neće uticati na postupak.

-  Nepotpuno uklanjanje supernatanta će inhibirati lizu i razblažiti lizat, a samim tim uticati na uslove vezivanja RNK na membranu PAXgene.
6. Dodajte 350 µl pufera za resuspenziju (BR1) i vrtložno mešajte dok se kuglice vidljivo ne rastvore.
7. Pipetom premestite uzorak u PT epruvetu od 2 ml.
-  Koristite PT epruvete od 2 ml uključene u komplet PAXgene Blood RNA Kit.
8. Postavite otvorene PT epruvete koje sadrže uzorak u QIAcube Connect MDx šejker (pogledajte sliku 18, strana 63). Pozicije uzoraka su numerisane radi lakšeg postavljanja. Postavite zapušače šejkera nosača (uključene u QIAcube Connect MDx) u otvore na ivici nosača šejkera kraj svake PT epruvete. Time se omogućava otkrivanje uzoraka tokom provere postavljanja.
-  Postarajte se za to da je instaliran ispravan adapter za šejker (adapter za šejker, 2 ml, safe-lock epruvete, označene sa „2“, uključene u QIAcube Connect MDx).
-  Ako se obrađuje manje od 12 uzoraka, postarajte se za to da postavite nosač šejkera kao što je prikazano na slici 22, strana 67. Nije moguće obraditi jedan (1) ili 11 uzoraka. Brojevi pozicija u nosaču šejkera odgovaraju brojevima pozicija u centrifugi.
9. Zatvorite poklopac instrumenta QIAcube Connect MDx (pogledajte sliku 15, strana 59).
10. Izaberite protokol „PAXgene Blood RNA Part A“ i pokrenite ga.
Pratite uputstva data na ekranu osetljivom na dodir instrumenta QIAcube Connect MDx.
-  Postarajte se za to da su oba programska dela (deo A i deo B) instalirana na instrumentu QIAcube Connect MDx (pročitajte „Instaliranje protokola na QIAcube Connect MDx“, strana 60).



Instrument će vršiti provjere postavljanja za uzorke, nastavke, adaptere rotora i boce reagensa.

11. Po završetku protokola „PAXgene Blood RNA Part A“, otvorite poklopac instrumenta QIAcube Connect MDx (pogledajte sliku 15, stranica 59). Uklonite i odbacite PRC kolonice iz adaptera rotora i prazne PT epruvete iz šejkera.



Tokom ciklusa, instrument prenosi spin kolonice iz pozicije adaptera rotora 1 (pozicija poklopca L1) na poziciju adaptera rotora 3 (pozicija poklopca L2) od strane instrumenta (pogledajte sliku 20, stranica 65).

12. Zatvorite poklopce svih MCT epruveta od 1,5 ml koji sadrže prečišćenu RNK u adapterima rotora (pozicija 3, pozicija poklopca L3, pogledajte sliku 20, stranica 65). Prenesite MCT epruvete od 1,5 ml na QIAcube Connect MDx šejker adapter (pogledajte sliku 18, stranica 63).
13. Zatvorite poklopac instrumenta QIAcube Connect MDx (pogledajte sliku 15, strana 59).
14. Izaberite protokol „PAXgene Blood RNA Part B“ i pokrenite ga.

Pratite uputstva data na ekranu osjetljivom na dodir instrumenta QIAcube Connect MDx.



Ovaj program inkubira uzorke na 65 °C i denaturiše RNK za naknadne primene. Čak i ako naknadna primena obuhvata korak toplotne denaturacije, nemojte izostaviti ovaj korak. Dovoljna denaturacija RNK u ovom trenutku je od suštinskog značaja za maksimalnu efikasnost u naknadnim primenama.

15. Po završetku programa „PAXgene Blood RNA Part B“, otvorite poklopac instrumenta QIAcube Connect MDx (pogledajte sliku 15, stranica 59). Odmah stavite MCT epruvete koje sadrže prečišćenu RNK na led.



UPOZORENJE: Vruća površina. Šejker može da dostigne temperaturu do 70 °C (158 °F). Nemojte da ga dodirujete dok je vruć.



Ne dozvolite da prečišćena RNK ostane u QIAcube Connect MDx. Pošto se uzorci ne rashlađuju, prečišćena RNK se može oštetiti. Zbog toga se ne preporučuje priprema uzoraka za obradu sutradan bez nadzora.

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

Pošto RNK ostaje denaturisana nakon ponovljenog zamrzavanja i odmrzavanja, nije potrebno ponavljati protokol toplotne inkubacije („PAXgene Blood RNA Part B“). Ako koristite uzorke RNK u dijagnostičkom ispitivanju, sledite uputstva proizvođača.

Za tačnu kvantifikaciju RNK apsorbacijom na 260 nm, preporučujemo razblaživanje uzoraka sa 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Razblaživanje uzorka u vodi bez ribonukleaze može dovesti do netačno niskih vrednosti.

Nulirajte spektrofotometar koristeći prazni uzorak koji se sastoji od istog udela pufera za izdvajanje (BR5) i Tris-HCl pufera kao u uzorcima koji će se meriti. Pufer za izdvajanje (BR5) ima visoku apsorbaciju na 220 nm, što može dovesti do visokih nivoa pozadinske apsorbacije ako spektrofotometar nije pravilno nuliran.



Za kvantifikaciju u Tris-HCl puferu, koristite odnos

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44\text{ }\mu\text{g/ml}$. Pročitajte Dodatak B, strana 78.

17. Uklonite nosač reagens boce sa radnog stola QIAcube Connect MDx (pogledajte sliku 18, stranica 63) i zatvorite sve reagens boce sa odgovarajuće označenim poklopcima. Ponovo zatvorite sve boce koje sadrže pufer i vodu bez ribonukleaze, bočice i epruvete koje sadrže enzime i enzimске pufer, kao i vrećice koje sadrže plastične materijale iz kompleta koji se koristi za protokol. Preostali sadržaj kompleta i reagens boca čuvajte kao što je opisano u odeljku „Skladištenje i rukovanje reagensima“ (strana 22) i „Stabilnost tokom upotrebe“ (strana 22) do dalje upotrebe.

* Kada radite sa hemikalijama, uvek nosite odgovarajući laboratorijski mantil, rukavice za jednokratnu upotrebu i zaštitne naočare. Više informacija potražite u odgovarajućim listovima sa bezbednosnim podacima (Safety Data Sheet, SDS) dostupnim kod dobavljača proizvoda.

Uklonite i odbacite preostale reagense u PT epruvetama u otvorima za MCT kolonice instrumenta QIAcube Connect MDx. Uklonite i odbacite adaptore rotora iz centrifuge. Ispraznite fioku za otpad instrumenta QIAcube Connect MDx (pogledajte sliku 15, stranica 60). Zatvorite poklopac instrumenta i isključite instrument prekidačem za napajanje.

Ograničenja upotrebe proizvoda

Komplet PAXgene Blood RNA Kit namenjen je izolaciji intracelularne RNK iz ljudske pune krvi ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocita/ml) za in vitro dijagnostičke aplikacije. Nije namenjen za izolaciju genomske DNK ili virusnih nukleinskih kiselina iz ljudske pune krvi. Zbog ograničenog broja transkripata potvrđenih za specifikacije stabilizacije (transkripti gena FOS i IL1B), karakteristike performansi nisu utvrđene za sve transkripte. Korisnici bi trebalo da pregledaju podatke proizvođača i sopstvene podatke kako bi utvrdili da li je potrebno potvrđivanje za druge transkripte. Komponente kompleta su namenjene isključivo za upotrebu u priručniku i automatizovanom protokolu opisanom u ovom uputstvu za upotrebu.

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

Kontrola kvaliteta

U skladu sa QIAGEN ISO Sistemom upravljanja kvalitetom, svaka serija kompleta PAXgene Blood RNA Kit testirana je prema prethodno utvrđenim specifikacijama kako bi se osigurao stalni kvalitet proizvoda.

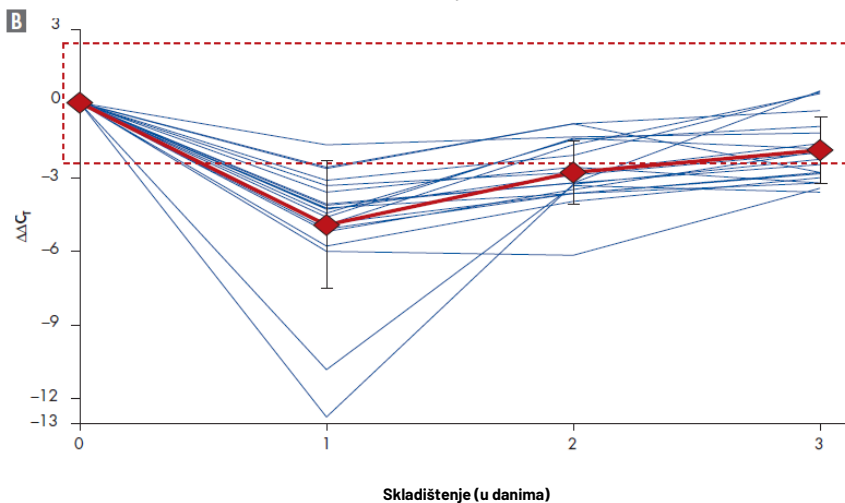
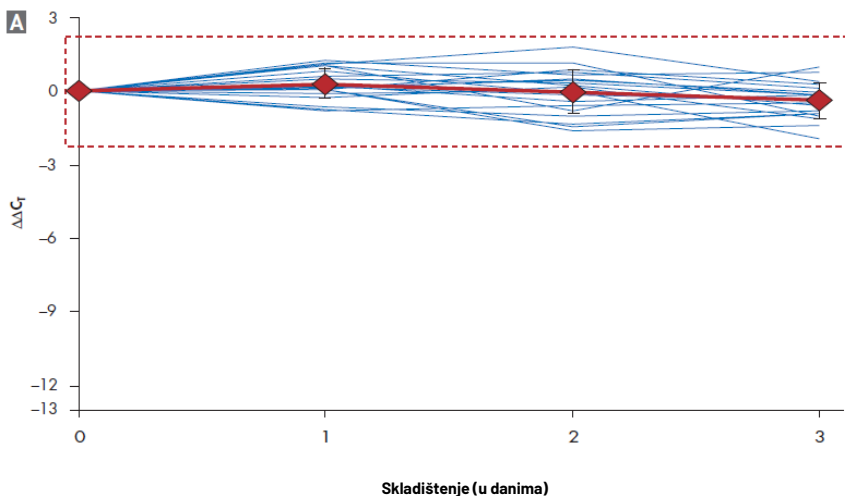
Karakteristike performansi

Prikupljanje i stabilizacija uzoraka

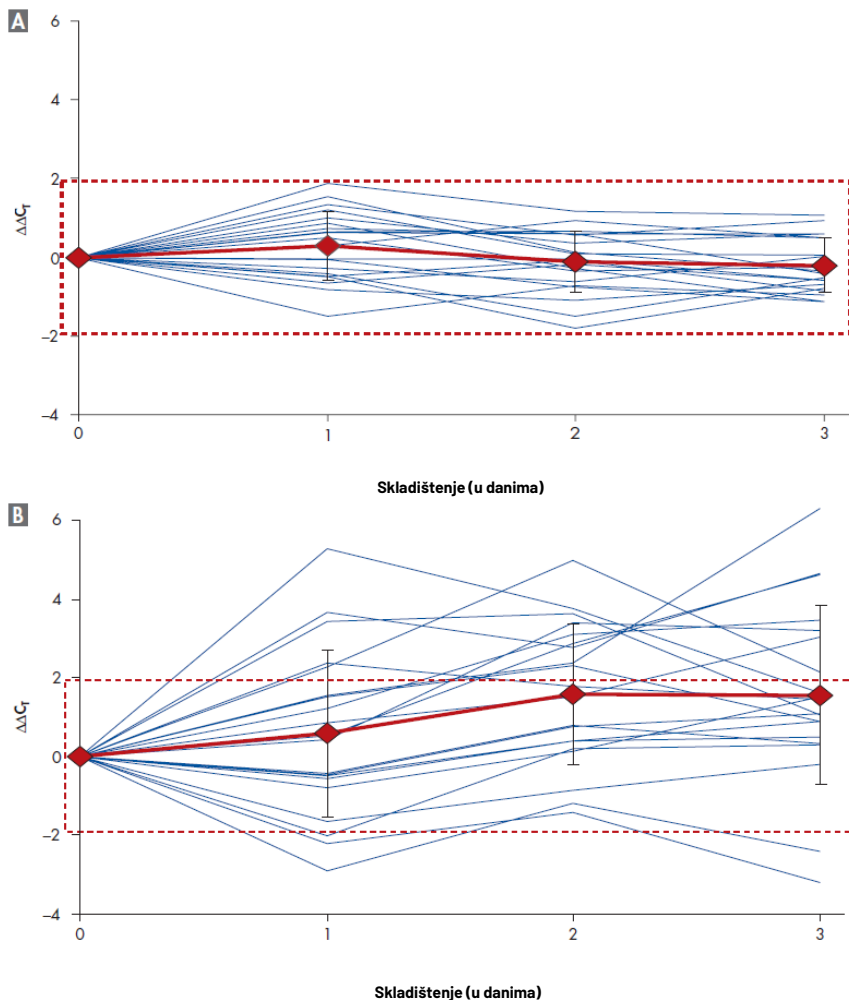
Epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) sadrže vlasnički reagens za stabilizaciju RNK. Ovaj aditiv štiti molekule RNK od degradacije od strane ribonukleaza i smanjuje ex vivo promene u ekspresiji gena na najmanju moguću meru. Epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) su namenjene za prikupljanje humane pune krvi i stabilizaciju ćelijske RNK do najduže 3 dana na temperaturi 18–25 °C (slika 4 i slika 5, strana 42, odnosno 43) ili do najduže 5 dana na temperaturi 2–8 °C (slika 6 i slika 7, strane 44 i 45). Pored toga, stabilizovana krv se može skladištiti zamrznuta. Trenutno dostupni podaci pokazuju stabilizaciju ćelijske RNK najmanje 11 godina na -20 °C ili -70 °C*. Za više informacija iz tekućih studija koje procenjuju stabilnost u dužem vremenskom periodu, posetite www.preanalytix.com ili se obratite tehničkim uslugama QIAGEN-a.

Stvarno trajanje stabilizacije RNK može varirati u zavisnosti od vrste ćelijske RNK i naknadnih primena koje se koriste. Zbog ograničenog broja transkripata potvrđenih za specifikacije stabilizacije (transkripti gena FOS i IL1B), karakteristike performansi nisu utvrđene za sve transkripte. Korisnici bi trebalo da pregledaju podatke proizvođača i sopstvene podatke kako bi utvrdili da li je potrebno potvrđivanje za druge transkripte.

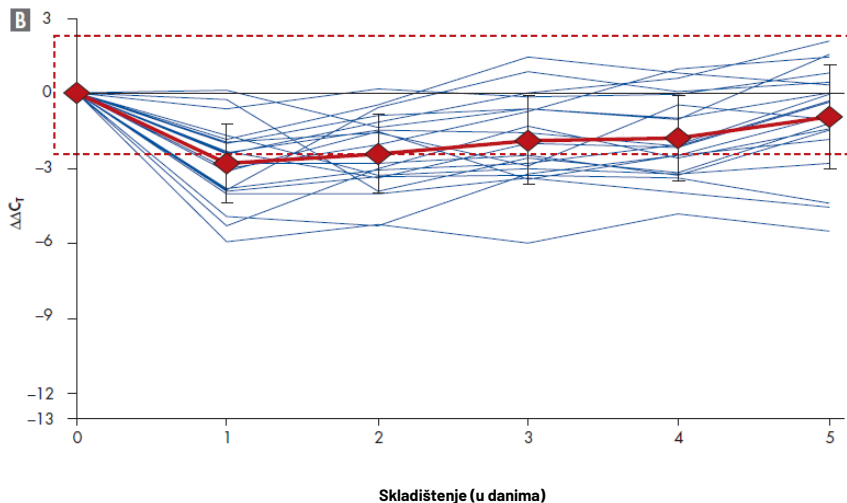
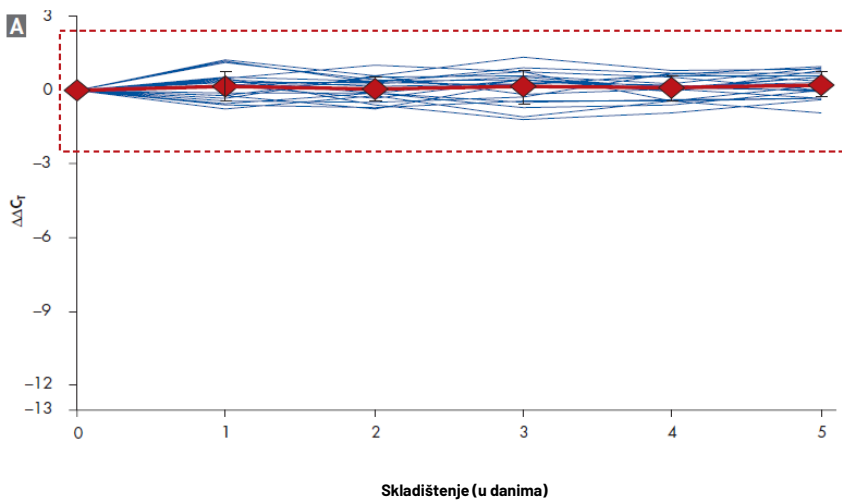
* U toku je dugoročna studija skladištenja krvi u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes.



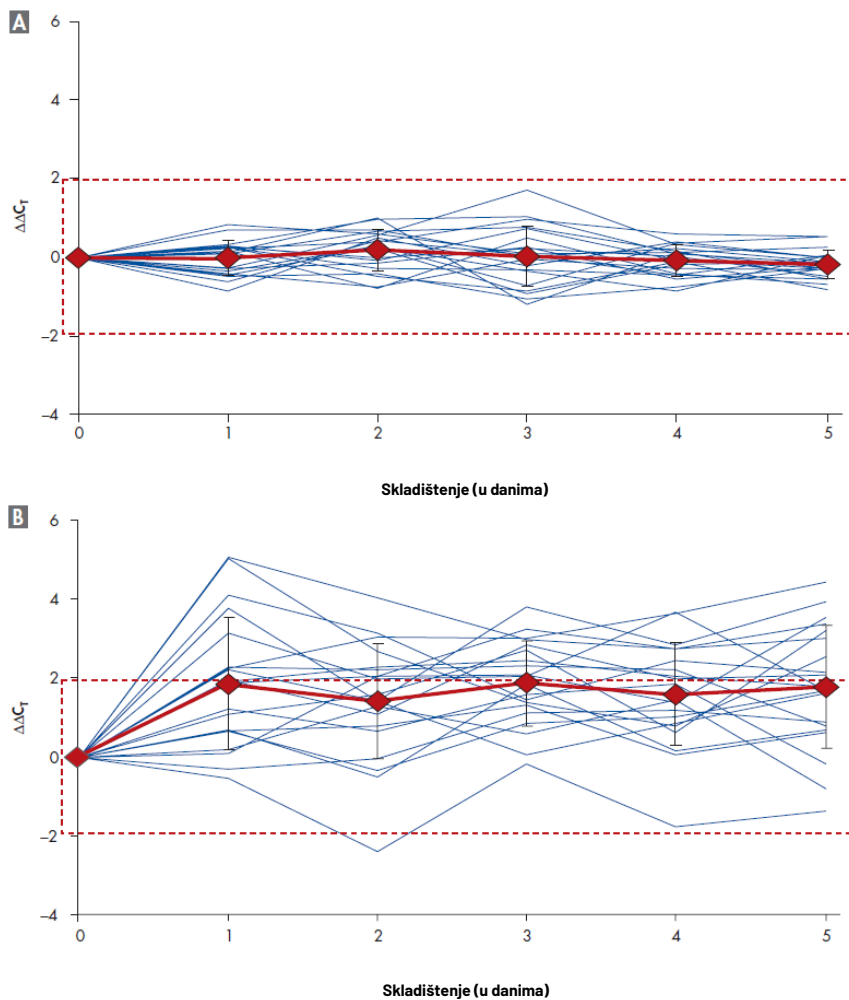
Slika 4: Stabilnost RNK u uzorcima krvi na 18–25 °C: FOS. Uzeta je krv od 10 naizgled zdravih donora, sa dupliranim uzorcima, i skladištena je na temperaturi 18–25 °C navedeni broj dana, nakon čega je usledila izolacija ukupne RNK. **[A]** Krv je prikupljena i skladištena u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), a ukupna RNK je prečišćena kompletom PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Krv je prikupljena i skladištena u standardnim epruvetama za prikupljanje krvi sa EDTA kao antikoagulansom i ukupna RNK je prečišćena standardnim metodom za izolaciju organskih materija sa čišćenjem RNK na bazi silicijumske membrane. Relativni nivoi transkripta FOS-a određeni su dupleskim RT-PCR-om u realnom vremenu, koristeći 18S rRNK kao interni standard. Vrednosti za sve uzorke su iscrtane, sa prikazanom srednjom vrednošću i standardnim odstupanjima svih uzoraka. Isprekidane linije ukazuju na $\pm 3\times$ ukupnu preciznost ispitivanja ($2,34 C_t$).



Slika 5: Stabilnost RNK u uzorcima krvi na 18–25 °C: IL1B. Krv je uzeta i ukupna RNK prečišćena, nakon skladištenja na 18–25 °C, kao što je opisano na slici 4. Relativni nivoi transkripta IL1B određeni su duplesnim RT-PCR-om u realnom vremenu, koristeći 18S rRNK kao interni standard. Vrednosti za sve uzorke su iscrtane, sa prikazanom srednjom vrednošću i standardnim odstupanjima svih uzoraka. Isprekidane linije ukazuju na $\pm 3\times$ ukupnu preciznost ispitivanja ($1,93 C_T$).



Slika 6: Stabilnost rNK u uzorcima krvi na 2–8 °C: FOS. Uzeta je krv od 10 donora, sa dupliranim uzorcima, i skladištena je na temperaturi 2–8 °C navedeni broj dana, nakon čega je usledila izolacija ukupne rNK. **[A]** Krv je prikupljena i skladištena u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), a ukupna rNK je prečišćena kompletom PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Krv je prikupljena i skladištena u standardnim epruvetama za prikupljanje krvi sa EDTA kao antikoagulansom i ukupna rNK je prečišćena standardnim metodom za izolaciju organskih materija sa čišćenjem rNK na bazi silicijumske membrane. Relativni nivoi transkripta FOS-a određeni su duplesnim RT-PCR-om u realnom vremenu, koristeći 18S rRNK kao interni standard. Vrednosti za sve uzorke su iscrtane, sa prikazanom srednjom vrednošću i standardnim odstupanjima svih uzoraka. Isprekidane linije ukazuju na $\pm 3\times$ ukupnu preciznost ispitivanja ($2,34 C_7$).



Slika 7: Stabilnost RNK u uzorcima krvi na 2–8 °C: IL1B. Krv je uzeta i ukupna RNK prečišćena, nakon skladištenja na 2–8 °C, kao što je opisano na slici 6. Relativni nivoi transkripta IL1B određeni su duplesnim RT-PCR-om u realnom vremenu, koristeći 18S rRNK kao interni standard. Vrednosti za sve uzorke su iscrtane, sa prikazanom srednjom vrednošću i standardnim odstupanjima svih uzoraka. Isprekidane linije ukazuju na $\pm 3\times$ ukupnu preciznost ispitivanja ($1,93 C_T$).

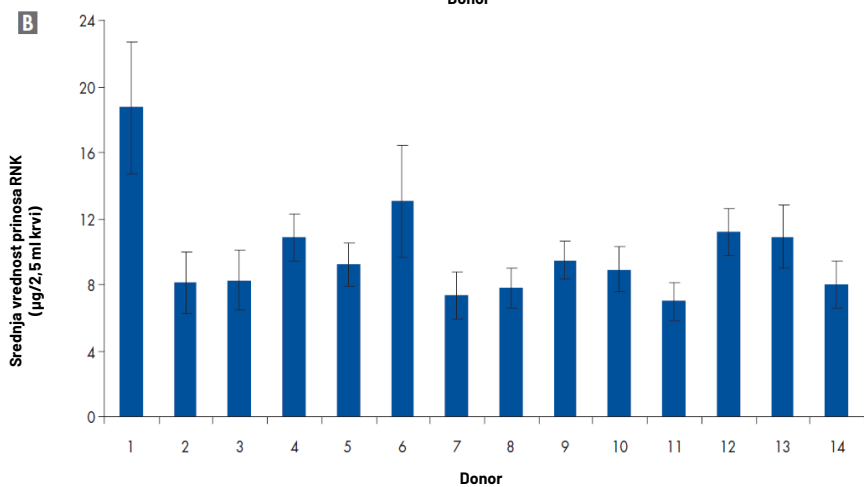
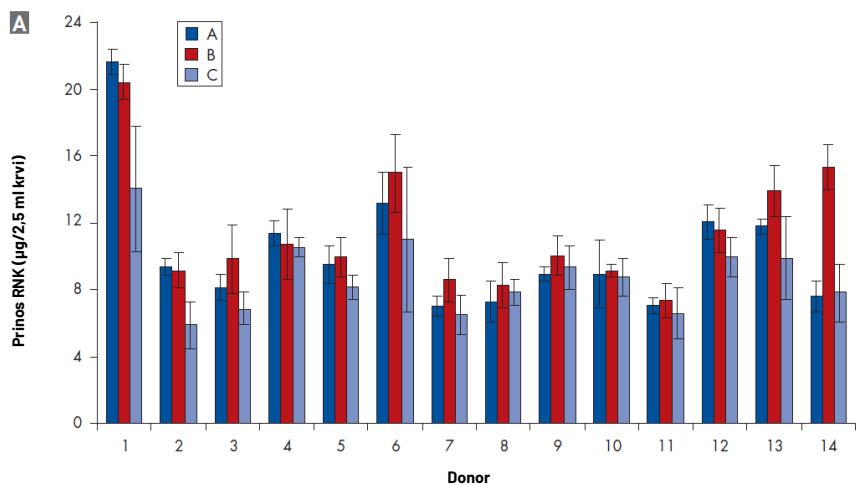
Ručna izolacija RNK

Ukupna RNK izolovana korišćenjem sistema PAXgene Blood RNA System je čista. Koristeći ručni protokol, vrednosti A_{260}/A_{280} su između 1,8 i 2,2, a $\leq 1\%$ (w/w) genomske DNK je prisutno u $\geq 95\%$ svih uzoraka, mereno kvantitativnim real-time PCR-om sekvence beta-aktinskog gena. Najmanje 95% uzoraka ne pokazuje inhibiciju u RT-PCR-u kada eluat čini do 30% reakcione zapremine RT-PCR-a.

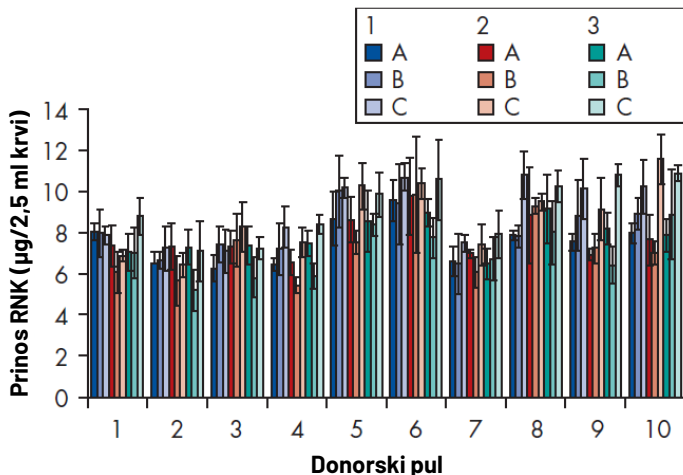
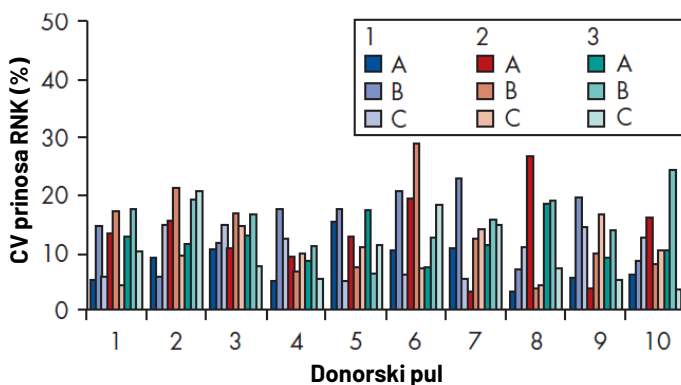
Koristeći ručni protokol, prosečno vreme pripreme uzorka (na osnovu podataka iz 12 ciklusa pripreme uzoraka) iznosi približno 90 min*, sa samo 40 min praktičnog rada. Prinosi RNK od 2,5 ml zdrave humane pune krvi su $\geq 3 \mu\text{g}$ za $\geq 95\%$ obrađenih uzoraka. Pošto prinosi u velikoj meri zavise od donora, pojedinačni prinosi mogu varirati. Za pojedinačne donore, sistem PAXgene Blood RNA System obezbeđuje ponovljive prinose sa velikom mogućnošću reprodukcije (slika 8 i slika 9, stranice 47 odnosno 48) i ponovljive RT-PCR sa mogućnošću reprodukcije (slika 10 i slika 11, stranice 52 odnosno 53), što ga čini veoma robusnim za kliničke dijagnostičke testove.

Slika 8 (strana 47) ukazuje na ukupnu ponovljivost i mogućnost reprodukcije sistema PAXgene Blood RNA System. Sprovedene su dodatne studije kako bi se pokazao uticaj različitih serija kompleta PAXgene Blood RNA Kit i različitih rukovaoca na mogućnost reprodukcije prinosa RNK i performanse RT-PCR u realnom vremenu. Budući da su za te studije korišćeni objedinjeni uzorci krvi umesto pojedinačnih epruveta PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), rezultati ne odražavaju ponovljivost sistema, uključujući fluktuaciju između pojedinačnih vađenja krvi, već samo mogućnost reprodukcije pripreme uzorka (pogledajte sliku 9, strana 48).

* Ukupno trajanje ciklusa protokola, uključujući prethodno rukovanje epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugiranje, ispiranje kuglica i resuspenzija kuglica).



Slika 8: Ponovljiva izolacija RNK sa mogućnošću reprodukcije. Četvorostruki uzorci krvi od 14 donora ručno je obradio svaki od 3 tehničara (A, B, C). Korišćena su tri seta opreme, a svi uzorci koje je pripremio jedan tehničar obrađeni su istom opremom. [A] Prikazane su srednje vrednosti i standardna odstupanja prinosa RNK po repliciranim uzorcima istih donora i različitih tehničara. [B] Dvanaest repliciranih uzoraka krvi od svakog od 14 donora obrađeno je od strane 3 različita tehničara. Prikazane su srednja vrednost i standardna odstupanja prinosa RNK po uzorcima istih donora i svih tehničara. Za sve uzorke RNK, odnosi A_{260}/A_{280} su se kretali od 1,8 do 2,2.

A**B**

Slika 9: Ponovljivost i mogućnost reprodukcije prinosa RNK za različite rukovaoce i serije kompleta PAXgene Blood RNA Kit koristeći objedinjene uzorke krvi. Uzorci krvi od 30 različitih donora prikupljeni su u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 epruveta po donoru, ukupno 360 epruveta). Sadržaj epruveta od 3 donora je objedinjen i naknadno realikvotiran u 36 uzoraka. Tih 36 uzoraka po pulu od 3 donora ručno je obradilo 3 različita rukovaoca. Svaki rukovalac je koristio 3 različite serije kompleta PAXgene Blood RNA Kit za izolaciju RNK i obrađene četverostruke uzorke iz svakog od 10 donorskih pulova. **[A]** RNK prinos i standardno odstupanje za svaku kombinaciju rukovalac-serija. Četverostruki uzorci krvi iz 10 donorskih pulova obrađeno je od strane 3 različita rukovaoca (A, B, C) sa svakim od 3 serije kompleta (1, 2, 3). Prikazani su srednji prinosi (kolone) i standardna odstupanja (trake grešaka) po četverostrukom uzorku iz istog donorskog pula za različite rukovaoce i različite serije kompleta. **[B]** CV RNK prinosa po donorskom pulu za sve kombinacije rukovalac-serija (A, B, C; 1, 2, 3), izračunat iz srednjeg prinosa i standardnog odstupanja prinosa prikazanog na slici 9A.

Tabela 1A: Mogućnost reprodukcije unutar svake serije i unutar svakog korisnika za odabrane donorske pulove (1, 6, 9, 10)

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

Tabela 1B: Mogućnost reprodukcije unutar svakog od korisnika i unutar svih serija za odabrane donorske pulove (1, 6, 9, 10)

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

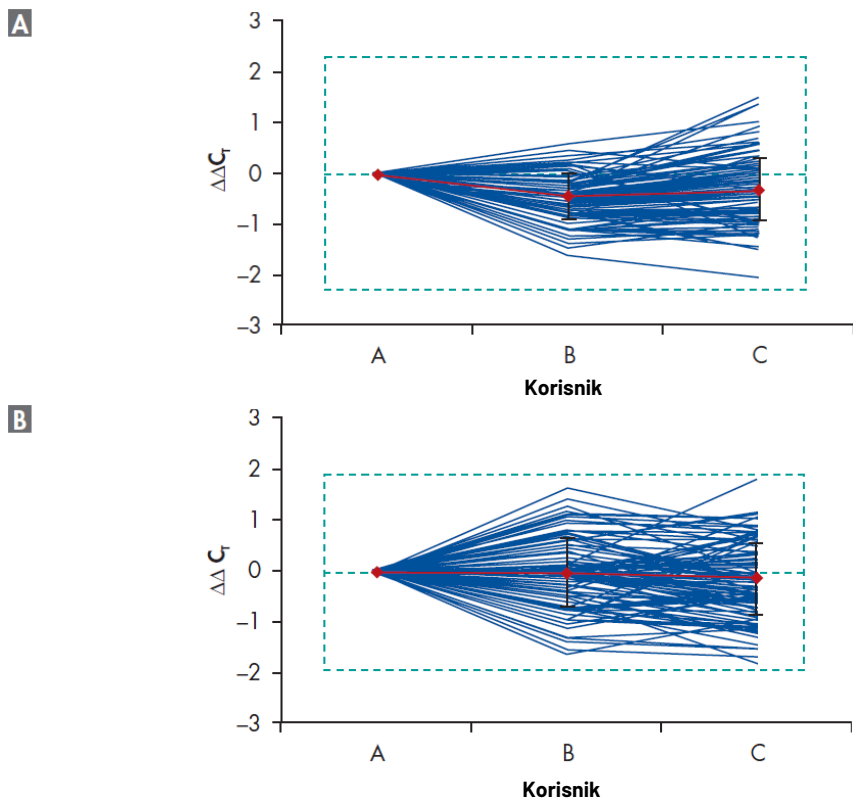
Tabela 1C: Mogućnost reprodukcije unutar svake serije i između svih korisnika za odabrane donorske pulove (1, 6, 9, 10)

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

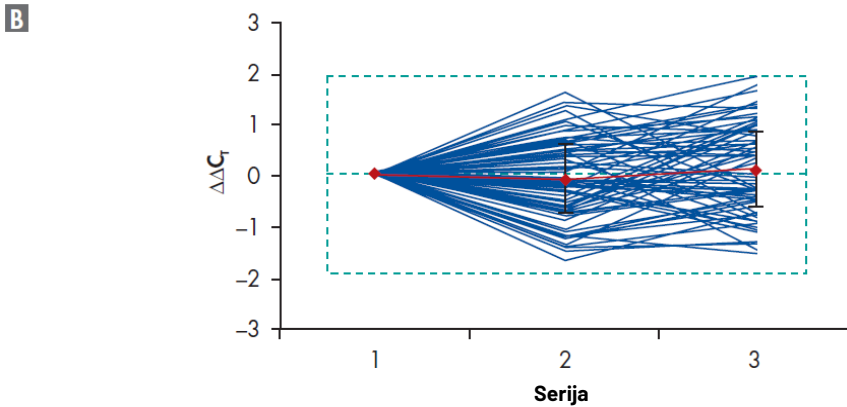
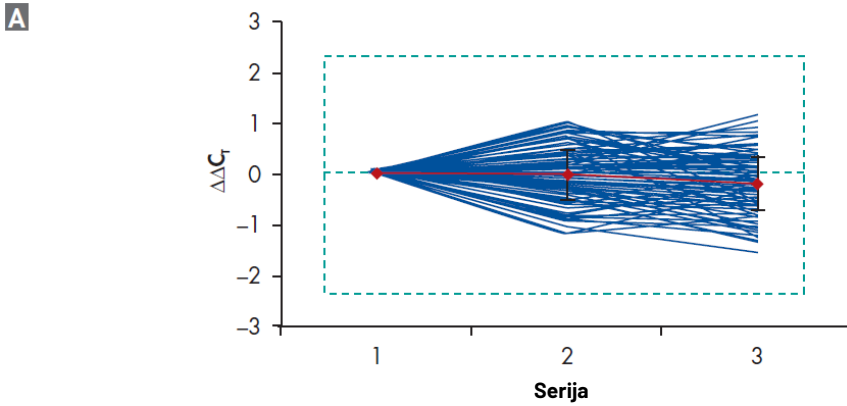
Tabela 1D: Mogućnost reprodukcije između svih serija i svih korisnika za odabrane donorske pulove (1, 6, 9, 10)

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

Detaljna analiza 4 reprezentativna donorska pula. Pulovi su odabrani prema broju belih krvnih zrnaca i odražavaju gornje, srednje i niže vrednosti normalnog opsega broja belih krvnih zrnaca ($4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$ leukocita/ml). Broj belih krvnih zrnaca predstavlja srednju vrednost 3 broja belih krvnih zrnaca od 3 donora po donorskom pulu.



Slika 10: Mogućnost reprodukcije RT-PCR-a – između korisnika. RNK prečišćena u eksperimentu opisanom na slici 9 korišćena je za RT-PCR u realnom vremenu. Relativni nivoi transkripta **[A]** FOS i **[B]** IL1B određeni su dupleksnim RT-PCR-om u realnom vremenu, koristeći 18S rRNK kao interni standard. Vrednosti za sve uzorke su iscrtnane, u odnosu na vrednosti za korisnika A (10 donorskih pulova × 3 serije kompleta × 4 replikata = 120 skupova podataka za svaki gen), sa srednjim vrednostima (crvene linije) i standardnim odstupanjima (crne trake) za sve prikazane uzorke. Isprekidane linije ukazuju na $\pm 3\times$ ukupnu preciznost ispitivanja (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).



Slika 11: Mogućnost reprodukcije RT-PCR-a – između serija kompleta. RNK prečišćena u eksperimentu opisanom na slici 9 korišćena je za RT-PCR u realnom vremenu. Relativni nivoi transkripta **[A]** FOS i **[B]** IL1B određeni su dupleksnim RT-PCR-om u realnom vremenu, koristeći 18S rRNK kao interni standard. Vrednosti za sve uzorke su iscrtnane, u odnosu na vrednosti za seriju kompleta 1 (10 donorskih pulova × 3 korisnika × 4 replikata = 120 skupova podataka za svaki gen), sa srednjom vrednošću (crvene linije) i standardnim odstupanjima (crne trake) za sve prikazane uzorke. Isprekidane linije ukazuju na ±3x ukupnu preciznost ispitivanja (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).

Tabela 2: Rezime RT-PCR podataka sa slike 10 i slike 11

Sistem testiranja	FOS/18S rRNK ispitivanje		IL1B / 18S rRNK ispitivanje	
Poređenje podataka	Srednja vrednost ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Srednja vrednost ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Ponovljivost u okviru svakog korisnika i između svih serija				
Svi korisnici, serija 1-serija 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Svi korisnici, serija 1-serija 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Svi korisnici, serija 1-serija 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Ponovljivost u okviru svakog korisnika i između svih serija				
Sve serije, korisnik A-korisnik A	0,00	0,00	0,00	0,00
Sve serije, korisnik A-korisnik B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Sve serije, korisnik A-korisnik C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Korisnik: tehničar, izvršio studiju.

Serija: broj serije kompleta upotrebljenog koristi u ovoj studiji.

SD: standardno odstupanje.

Srednja $\Delta\Delta C_T$ vrednosti (N = 120) i standardna odstupanja su prikazani za podatke predstavljene na slici 10 i slici 11.

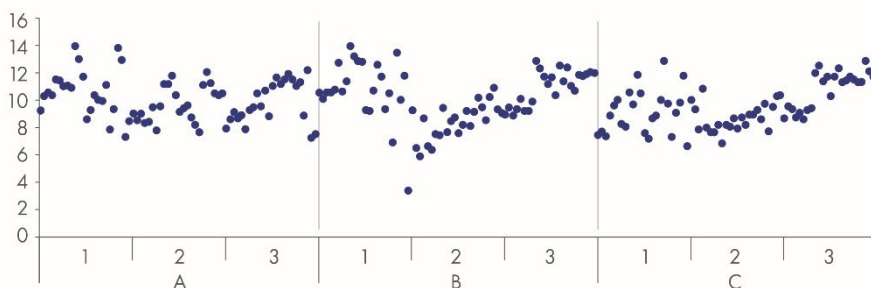
Automatizovana izolacija RNK

Prinosi RNK od 2,5 ml zdrave humane pune krvi su $\geq 3 \mu\text{g}$ za $\geq 95\%$ obrađenih uzoraka. Slika 12 (strana 55) ukazuje na prinose RNK od ukupno 216 uzoraka pripremljenih korišćenjem automatizovanog protokola sa 3 serije kompleta od strane 3 rukovaoca. Budući da su za te studije korišćeni objedinjeni uzorci krvi umesto pojedinačnih epruveta PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), rezultati ne odražavaju prinos RNK očekivan od pojedinačnih uzoraka pojedinačnih uzimanja krvi. Pošto prinosi u velikoj meri zavise od donora, pojedinačni prinosi mogu varirati (slika 12, strana 55).

Najmanje 95% uzoraka ne pokazuje inhibiciju u RT-PCR-u kada eluat čini do 30% reakcione zapremine RT-PCR-a. Korišćenjem automatizovanog protokola, unakrsnu kontaminaciju između uzoraka nije moguće otkriti, merenjem kvantitativnim RT-PCR-om u realnom vremenu sekvenci ABL1 i FOS transkripata u RNK-negativnim uzorcima (voda) uparenim sa RNK-pozitivnim uzorcima (humana puna krv) u istom ciklusu.

RNK izolovana sistemom PAXgene Blood RNA System i automatizovanim protokolom je čista, što pokazuje nedostatak inhibicije RT-PCR i vrednosti A_{260}/A_{280} između 1,8 i 2,2. Genomska DNK je prisutna kod $\leq 1\%$ (w/w) $\geq 95\%$ svih uzoraka, mereno kvantitativnim real-time PCR-om sekvence beta-aktinskog gena. Slika 13 i slika 14 (strana 56) pokazuju vrednosti A_{260}/A_{280} i relativnu genomsku DNK od ukupno 216 uzoraka pripremljenih korišćenjem automatizovanog protokola sa 3 serije kompleta od strane 3 rukovaoca.

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



Slika 12: Prinos RNK – automatizovana obrada pomoću instrumenta QIAcube Connect MDx. Uzorci krvi od pojedinačnih donora prikupljeni su u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Sadržaj epruveta je objedinjen u 6 donorskih pulova i naknadno ponovo alikvotiran. Ukupno 216 epruveta (tj. 36 po pulu) obradila su 3 različita rukovaoca (A, B, C). Svaki rukovalac je koristio 3 različite serije (1, 2, 3) kompleta PAXgene Blood RNA Kit za automatizovanu izolaciju sa QIAcube Connect MDx i obrađene četverostruke uzorke iz svakog od 6 donorska pula. Prinosi RNK svih pojedinačnih uzoraka prikazani su za svaku kombinaciju rukovalac-serija.

Stabilnost izolovane RNK

Uzorci RNK izolovani iz epruveta PAXgene Blood RNA Tubes napunjenih krvlju sa kompletom PAXgene Blood RNA Kit stabilni su tokom 5 godina skladištenja na -20°C i 7 godina skladištenja na -70°C (krajnja tačka studija).

Važne napomene

Korišćenje instrumenta QIAcube Connect MDx

Postarajte se za to da budete upoznati sa radom instrumenta QIAcube Connect MDx. Pročitajte uputstvo za upotrebu instrumenta i sve dodatne informacije koje se isporučuju sa instrumentom, obraćajući pažnju na bezbednosne informacije, pre započinjanja automatizovanog protokola PAXgene Blood RNA.

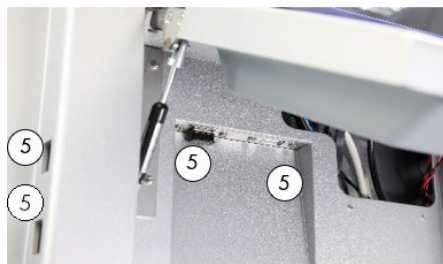
Pokretanje instrumenta QIAcube Connect MDx

Zatvorite poklopac instrumenta QIAcube Connect MDx i uključite instrument putem prekidača za napajanje (pogledajte sliku 15, strana 59).

Oglašiće se zvučni signal i prikazati početni ekran. Instrument automatski vrši testove inicijalizacije.



Prikaz instrumenta QIAcube Connect MDx sa prednje strane



Izvučen ekran osetljiv na dodir



Prikaz instrumenta QIAcube Connect MDx sa zadnje strane (leva strana)



Prikaz instrumenta QIAcube Connect MDx sa zadnje strane (desna strana)

Slika 15: Spoljne karakteristike instrumenta QIAcube Connect MDx.

- | | |
|---|--|
| <p>1 Ekran osetljiv na dodir</p> <p>2 Poklopac</p> <p>3 Fioka za otpad</p> <p>4 Prekidač za napajanje</p> | <p>5 2 USB porta na levoj strani ekrana osetljivog na dodir; 2 USB porta iza ekrana osetljivog na dodir (Wi-Fi modul priključen u 1 USB port)</p> <p>6 RJ-45 Ethernet port</p> <p>7 Utičnica kabla za napajanje</p> <p>8 Izlaz vazduha za hlađenje</p> |
|---|--|

Ekran osetljiv na dodir

Instrumentom QIAcube Connect MDx upravlja se putem ekrana osetljivog na dodir. Ekran osetljiv na dodir omogućava korisniku da upravlja instrumentom i vodi korisnika kroz podešavanje radnog stola. Tokom obrade uzorka, ekran osetljiv na dodir prikazuje status protokola i preostalo vreme.




Slika 16: Izvučen ekran osetljiv na dodir instrumenta QIAcube Connect MDx.


Instaliranje protokola na QIAcube Connect MDx

Možda će biti potrebna inicijalna instalacija protokola da bi se mogao izvesti prvi ciklus pripreme RNK na instrumentu QIAcube Connect MDx. Instalirajte protokole „PAXgene Blood RNA Part A” i „PAXgene Blood RNA Part B”.

Protokoli za instrument QIAcube Connect MDx su navedeni na adresi **www.qiagen.com** i potrebno ih je preuzeti na USB stik koji se isporučuje sa instrumentom. Ovi protokoli će se preneti na instrument preko USB porta.

USB port (nalazi se na strani ekrana osetljivog na dodir; pogledajte sliku 15, strana 59) omogućava povezivanje instrumenta QIAcube Connect MDx na USB stik koji se isporučuje sa instrumentom. Datoteke sa podacima, kao što su datoteke evidencije ili datoteke izveštaja, takođe se mogu preneti preko USB porta sa instrumenta na USB stik.

 USB port je samo za upotrebu sa USB stikom koji obezbeđuje QIAGEN. Ne povezujte druge uređaje sa ovim portom.

 Ne uklanjajte USB stik tokom preuzimanja protokola ili prenosa datoteka sa podacima ili tokom ciklusa protokola.


Više detalja o procesu otpremanja protokola na QIAcube Connect MDx potražite u korisničkom priručniku za instrument.


Postavljanje u instrument QIAcube Connect MDx

Da biste uštedeli vreme, postavljanje možete obaviti tokom jednog ili oba koraka centrifugiranja od 10 minuta (koraci 3 i 5) navedenih u odeljku „Protokol: Automatizovana izolacija ukupne RNK iz humane pune krvi prikupljene u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)“ stranica 32.

Reagens boce

Pre svakog ciklusa na instrumentu QIAcube Connect MDx, pažljivo napunite 4 reagens boce sa reagensima navedenim u tabeli 3 (stranica 62) do indikatora maksimalnog nivoa ili, ako to nije moguće, do nivoa koji dozvoljavaju zapremine pufera isporučene u kompletu PAXgene Blood RNA Kit. Jasno označite boce i poklopce nazivima pufera i stavite napunjene reagens boce na odgovarajuće položaje na nosaču za reagens boce. Postavite nosač na radni sto instrumenta kao što je prikazano (slika 17 i slika 18, stranice 62 odnosno 63).

 Isporučena zapremina pufera BR2 neće napuniti bocu reagensa do nivoa indikatora. Puferi BR3 i BR4 ne mogu napuniti bocu do nivoa indikatora nakon obrade više uzoraka u prethodnim ciklusima.

 Obavezno skinite poklopce sa boca pre stavljanja na radni sto.



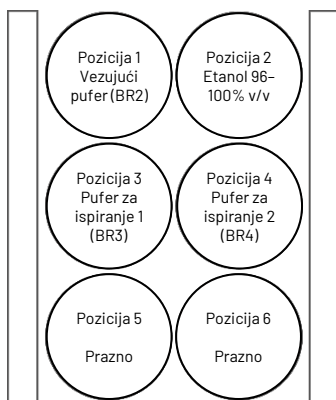
Zapremine pufera isporučenih u kompletu PAXgene Blood RNA Kit (50) dovoljne su za najviše 7 ciklusa pripreme RNK na instrumentu QIACube Connect MDx sa od 2 do 12 uzoraka po ciklusu. Opšte gledano, cikluse sa malim brojem uzoraka po ciklusu bi trebalo izbegavati, kako bi se obradilo ukupno 50 uzoraka po kompletu. Više od 7 ciklusa pripreme RNK može uzrokovati nedovoljnu količinu pufera za obradu poslednjih uzoraka.

Tabela 3: Pozicije u nosaču reagens boca

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

* Pufer za ispiranje 2 (BR4) se isporučuje kao koncentrat. Pre prvog korišćenja, dodajte 4 zapremine etanola (96–100% v/v, stepena čistoće p.a.), kao što je naznačeno na bočici da biste dobili radni rastvor.

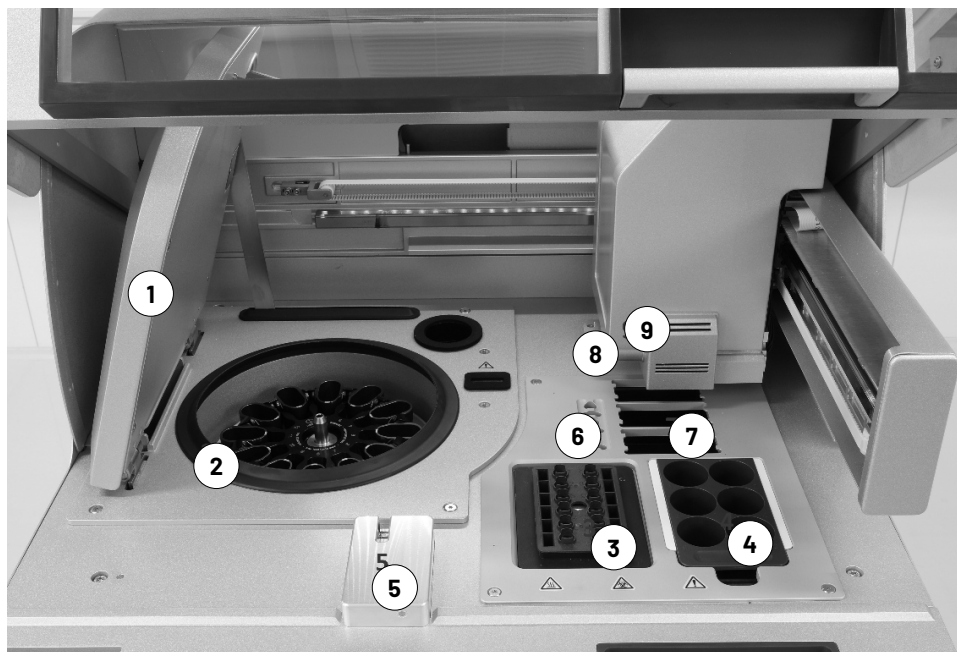
A



B



Slika 17: Postavljanje na nosač za reagens boce. [A] Šematski prikaz pozicija i sadržaja boca na nosaču za reagens boce. [B] Postavljanje nosača na QIACube Connect MDx.



Slika 18: Prikaz unutrašnjosti instrumenta QIAcube Connect MDx.

- | | | | |
|---|----------------------------------|---|--|
| ① | Poklopac centrifuge | ⑥ | Otvori za MCT epruvete |
| ② | Centrifuga | ⑦ | 3 otvora za nosače nastavaka |
| ③ | Šejker | ⑧ | Otvori za odlaganje nastavaka i kolonica |
| ④ | Nosač za reagens boce | ⑨ | Robotska ruka (uključuje 1-kanalni pipetor, hvatajliku, ultrazvučni i optički senzor i UV LED) |
| ⑤ | Senzor nastavka i brava poklopca | | |

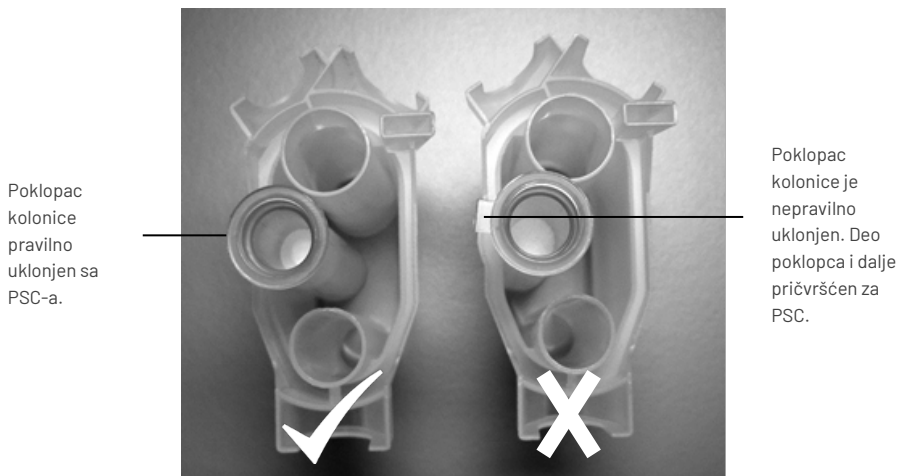
Spin kolonice (PSC, PRC), MCT epruvete i QIAcube Connect MDx plastični pribor

Postavite 2 nosača nastavaka napunjena sa nastavcima Filter-Tips 1000 μ L na QIAcube Connect MDx (pogledajte slika 18, stranica 63). Po potrebi ponovo napunite nosače nastavcima.

i Koristite samo nastavke sa filterima od 1000 μ l projektovane za upotrebu sa instrumentom QIAcube Connect MDx.

Trajnom olovkom označite adaptere rotora i MCT za svaki uzorak. Otvorite PSC koji će se koristiti i makazama potpuno odrežite poklopac (pogledajte sliku 19).

i Za pravilan rad robotske hvataljke instrumenta QIAcube Connect MDx, potpuno uklonite (odsecite) poklopce i sve plastične delove koji povezuju poklopac sa PSC-om (pogledajte sliku 19). U suprotnom, robotska hvataljka neće moći pravilno uhvatiti PSC.



Slika 19: Postavljanje PSC-a. PSC se postavlja na srednju poziciju adaptera rotora. Odrežite poklopac PSC-a pre postavljanja kolonice.

Postavite PSC kolonicu (bez poklopca, pogledajte sliku 19, strana 64), PRC kolonicu i označenu MCT epruvetu u odgovarajuće pozicije na svakom označenom adapteru rotora kao što je prikazano u tabeli 4 i slici 20.

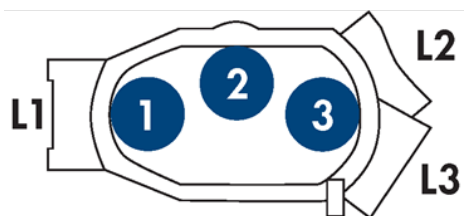


Uverite se da su poklopci spin kolonice (PRC) i MCT epruveta gurnuti skroz do dna otvora na ivici adaptera rotora. U suprotnom će se poklopci odlomiti tokom centrifugiranja.

Tabela 4: Plastični potrošni materijal u adapteru rotora

Pozicija	Reagens	Položaj poklopca
1	PAXgene RNA spin kolonica (crvena, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder spin kolonica (ljubičasta, PSC)(odrežite poklopac pre stavljanja u adapter rotora)	-
3	MCT*	L3

* Koristite MCT (1,5 ml) uključen u komplet PAXgene Blood RNA Kit.



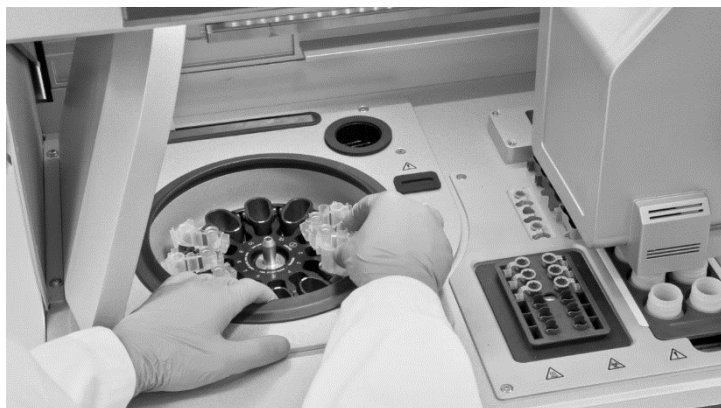
Slika 20: Pozicije u adapteru rotora. Adapter rotora ima 3 položaja epruvete (1–3) i tri položaja poklopca (L1–L3).

Postavljanje u centrifugu

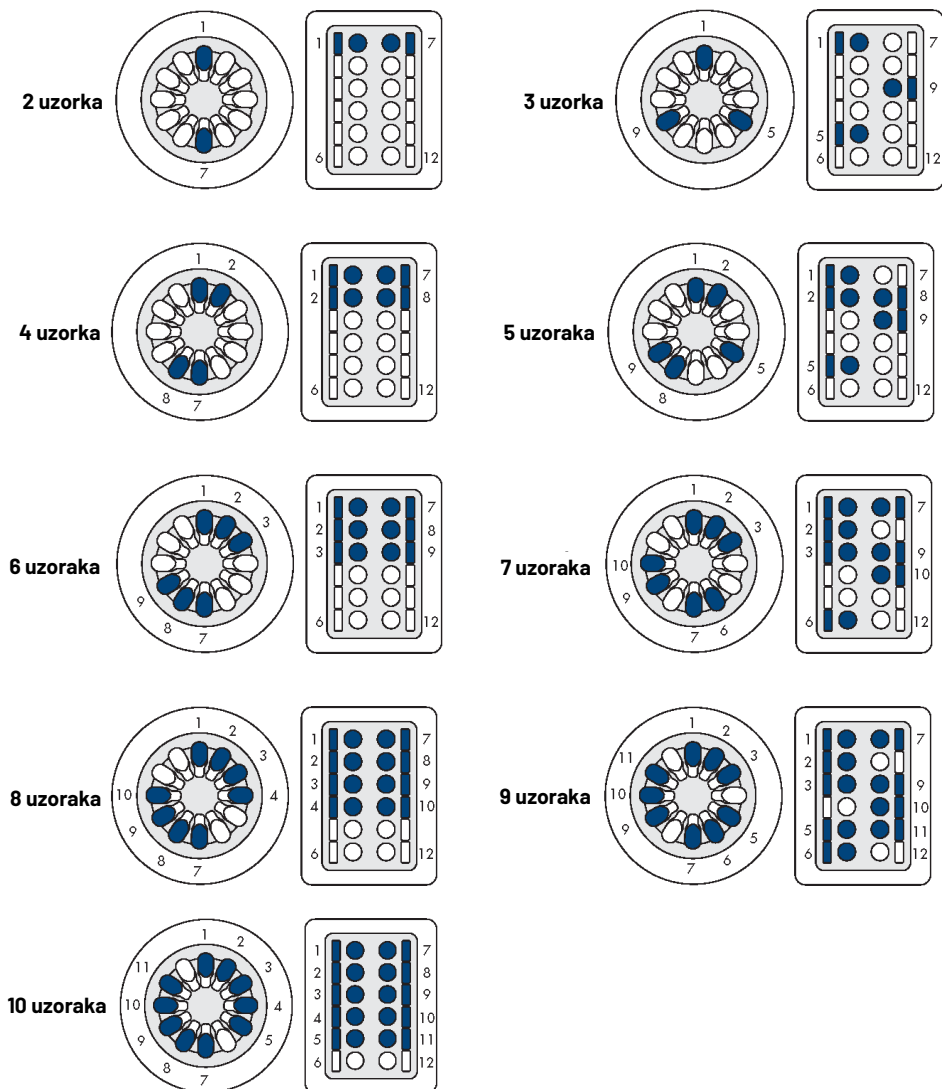
Postavite sklopljene adaptore rotora u posude centrifuge instrumenta QIAcube Connect MDx kao što je prikazano na slici 21 u nastavku.



Ako se obrađuje manje od 12 uzoraka, postarajte se za to da postavite rotor centrifuge tako da bude radijalno izbalansirana (pogledajte sliku 22, stranica 67). Sve posude centrifuge moraju da se montiraju pre pokretanja ciklusa protokola, čak i ako se obrađuje manje od 12 uzoraka. Nije moguće obraditi pojedinačan (jedan) ili 11 uzoraka.



Slika 21: Postavljanje u centrifugu na instrumentu QIAcube Connect MDx. Postavite sklopljene adaptore rotora u posude centrifuge.



Slika 22: Postavljanje u centrifugu i šejker. Pozicije na centrifugi i šejkeru se prikazuju za obradu od dva (2) do deset (10) uzoraka. Nije moguće obraditi jedan (1) ili 11 uzoraka. Za obradu 12 uzoraka, postavlja se na sve pozicije centrifuge i šejkera (slika se ne prikazuje).

Obrada epruveta

Uklonite sve PT epruvete ostale u otvorima za MCT epruvete iz prethodnih ciklusa (pogledajte sliku 18, strana 63). Popunite 3 PT epruvete sa količinom reagensa navedenom u tabeli 5 prema broju uzoraka u ciklusu.

Za mešavinu za inkubaciju dezoksiribonukleaze I, pipetom prenesite naznačenu zapreminu pufera za razlaganje DNK (RDD) u PT epruvetu i dodajte naznačenu zapreminu osnovnog rastvora dezoksiribonukleaze I (RNFD). Mešajte laganim pipetiranjem kompletne mešavine nagore i nadole 3 puta pipetnim nastavkom od 1000 µl.



Koristite PT epruvete od 2 ml uključene u komplet PAXgene Blood RNA Kit. Jasno označite epruvete imenima reagensa i stavite ih u odgovarajuću poziciju u otvorima MCT-a, kao što je naznačeno u tabeli 6 (strana 69).



Dezoksiribonukleaza I (RNFD) je posebno osetljiva na fizičku denaturaciju. Mešajte isključivo pipetiranjem, pipetnim nastavcima sa širokim otvorom kako biste smanjili smicanje. Nemojte vrtložno mešati.

Pipetom prenesite isključivo potrebnu zapreminu kao što je navedeno u tabeli 5 u nastavku.

Tabela 5: Zapremina reagensa potrebnih u PT epruветama za otvore za MCT epruветe

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

Tabela 6: Otvori za MCT epruветe

	Pozicija		
	A	B	C
Sadržaj	Proteinaza K	Mešavina za inkubaciju dezoksiribonukleaze I	Pufer za izdvajanje (BR5)
Posuda	Epruветa za obradu*	Epruветa za obradu*	Epruветa za obradu*

* Koristite PT epruветe od 2 ml uključene u komplet PAXgene Blood RNA Kit.

Odlaganje u otpad

Informacije o bezbednom odlaganju nakon prikupljanja uzoraka i ručne izolacije RNK potražite u bezbednosnim informacijama i merama predostrožnosti na stranici 18, odnosno 19.

Pored toga, za automatizovanu izolaciju RNK pomoću instrumenta QIAcube Connect MDx, pogledajte sliku 21 i sliku 22, stranica 66, odnosno 67, koje prikazuju namenske otvore za korišćene nastavke i kolonice za odlaganje na otpad.

Reference

Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S, Wyrich R, Ballas C, Schram J, Herdman C, Bankaitis-Davis D, Nicholls N, Trollinger D, Tryon V (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin. Chem.* 48, 1883-90.







Sambrook J and Russell D W (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

International Organization for Standardization (2019) *Molecular in vitro diagnostic examinations – Specifications for pre-examination processes for venous whole blood – Part 1: Isolated cellular RNA (ISO Standard No. 20186-1:2019)*.



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

Vodič za rešavanje problema

Ovaj vodič za rešavanje problema može da bude koristan pri rešavanju svih problema do kojih može doći. Dodatne informacije potražite na strani „Frequently Asked Questions“ (Često postavljana pitanja) našeg Centra za tehničku podršku: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Naučnici tehničke službe kompanije QIAGEN uvek sa zadovoljstvom odgovaraju na svako pitanje koje možda imate u vezi sa informacijama i protokolima iz ovog priručnika ili tehnologijama uzorkovanja i ispitivanja (za podatke o kontaktu pogledajte poslednju stranicu ili posetite veb-stranicu www.qiagen.com).

Komentari i sugestije	
Degradirana RNK	
a) Kontaminirana ribonukleaza	 Pazite da ne unesete nimalo ribonukleaze u reagense tokom postupka ili kasnijeg rukovanja (pogledajte Dodatak A, stranica 77).
Nizak prinos RNK	
b) Manje od 2,5 ml krvi prikupljene u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT)	 Postarajte se za to da se prikupi 2,5 ml krvi u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT; pogledajte <i>Priručnik za epruvete PAXgene Blood RNA Tube</i>)
c) Izmerena koncentracija RNK u vodi	 RNK mora da se razblaži u 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* da bi se postigla tačna kvantifikacija (pogledajte Dodatak B, stranica 78).
d) Čelijski ostaci prebačeni u PRC kolonicu u koracima 9 i 10 ručnog protokola	 Izbegavajte prenos krupnih čestica prilikom prenosa supernatanta pipetom u koraku 7 ručnog protokola (prenos sitnih ostataka neće uticati na proceduru).
e) Supernatant nije u potpunosti uklonjen u koraku 3	 Postarajte se za to da se ukloni sav supernatant. Ako je supernatant dekantiran, uklonite kapi sa oboda epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tako što ćete tapkati epruvetu uz papirni ubrus. Preduzmite odgovarajuće mere predostrožnosti kako biste sprečili unakrsnu kontaminaciju.
f) Nakon prikupljanja u epruvetu PAXgene Blood RNA Tube (BRT), krv se inkubira kraće od 2 h	 Inkubirajte krv u epruvetu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) najmanje 2 sata nakon prikupljanja.




* Kada radite sa hemikalijama, uvek nosite odgovarajući laboratorijski mantil, rukavice za jednokratnu upotrebu i zaštitne naočare. Više informacija potražite u odgovarajućim listovima sa bezbednosnim podacima (Safety Data Sheet, SDS) dostupnim kod dobavljača proizvoda.

Komentari i sugestije	
Niska vrednost A_{260}/A_{280}	
g) Voda se koristi za razblaživanje RNK za merenje vrednosti A_{260}/A_{280}	 <p>Koristite 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 da razblažite RNK pre merenja čistoće* (pogledajte Dodatak B, stranica 78).</p>
h) Spektrofotometar nije pravilno nuliran	 <p>Nulirajte spektrofotometar koristeći prazan uzorak koje se sastoji od istog udela pufera za izdvajanje (BR5) i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, kao u uzorcima koji će se meriti. Pufer za izdvajanje (BR5) ima visoku apsorpciju na 220 nm, što može dovesti do visokih nivoa pozadinske apsorpcije ako spektrofotometar nije pravilno nuliran.</p>
Kvar instrumenta	
i) Instrument QIAcube Connect MDx nije pravilno radio	Pročitajte <i>Korisnički priručnik za QIAcube Connect MDx</i> , obraćajući pažnju na odeljak Rešavanje problema. Postarajte se za to da je instrument pravilno održavan, kao što je opisano u korisničkom priručniku.

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

Simboli

Simboli u nastavku mogu da se nalaze u uputstvu za upotrebu ili na pakovanju i nalepnicama. Dodatni simboli su objašnjeni u odeljku Sadržaj kompleta (stranica 6).

Simbol	Definicija simbola
V<N1>	Verzija <N1> proizvoda
 <N2>	Sadrži reagense dovoljne za <N2> testova
	Pogledajte uputstvo za upotrebu.
	Upotrebiti do
IVD	Medicinsko sredstvo za in vitro dijagnostiku
REF	Kataloški broj
LOT	Broj serije
MAT	Broj materijala
COMP	Komponente
NUM	Broj
KU	Kunitz jedinice
ADD	Dodavanje
CONT	Sadrži
RCNS	Rekonstituisani

DNase

Dezoksiribonukleaza I

EtOH

Etanol

GITC

Gvanidin izotiocijanat

RNase-Free DNase Set

Set dezoksiribonukleaze bez ribonukleaze

GTIN

Globalni broj trgovinske jedinice



Temperaturno ograničenje



Gornja granica temperature



Proizvođač

EC REP

Ovlašćeni predstavnik za Evropu u skladu sa Uredbom (EU) 2017/746



Važna napomena



Dodavanje etanola



Oznaka CE. Ovaj proizvod ispunjava zahteve Uredbe (EU) 2017/746 o medicinskim sredstvima za in vitro dijagnostiku.

UDI

Jedinstveni identifikator uređaja



Opres



UPOZORENJE: Vruća površina

Kontakt informacije

Mi u kompaniji QIAGEN ponosimo se kvalitetom i dostupnošću naše tehničke podrške. U našim odeljenjima tehničke službe radeiskusni naučnici sa opsežnom praktičnom i teorijskom ekspertizom u oblasti molekularne biologije i korišćenja proizvoda kompanije PreAnalytiX. Ako imate bilo kakvih pitanja u vezi sa kompletom PAXgene Blood RNA Kit, ne ustručavajte se da nam se obratite.

Tehničku pomoć i više informacija potražite u našem centru za tehničku podršku na adresi **www.qiagen.com/Support**, telefon 00800-22-44-6000 ili se obratite jednom od QIAGEN odeljenja za tehničku pomoć ili lokalnim dobavljačima (pogledajte poleđinu ili posetite adresu **www.qiagen.com**).

Dodatak A: Opšte napomene o rukovanju sa RNK

Rukovanje RNK



Ribonukleaze su veoma stabilni i aktivni enzimi koji suštinski ne zahtevaju veliki broj kofaktora za funkcionisanje. Budući da je teško inaktivirati ribonukleaze i da su samo veoma male količine potrebne za degradaciju RNK, nemojte da koristite plastični ili stakleni pribor a da pre toga ne eliminišete mogućnost kontaminacije ribonukleazom. Naročito vodite računa da slučajno ne uvedete ribonukleaze u uzorak RNK tokom procedure izolacije ili nakon nje. Da biste uspostavili okruženje koje ne sadrži ribonukleaze i da biste ga održali u tom stanju, prilikom rada sa RNK morate da preduzmete mere predostrožnosti tokom predtretmana i korišćenja sudova i rastvora za jednokratnu upotrebu i više upotreba.

Opšte rukovanje



Prilikom rada sa RNK uvek morate da primenite pravilnu mikrobiološku i aseptičnu tehniku. Šakama i česticama prašine prenose se bakterije i buđi koje predstavljaju najčešći uzrok kontaminacije ribonukleazom. Uvek nosite rukavice od lateksa ili vinila kada rukujete reagensima i uzorcima RNK da biste sprečili kontaminaciju ribonukleaze preko površine kože ili prašnjave laboratorijske opreme. Redovno menjajte rukavice i držite epruvete zatvorenim kada je god to moguće. Držite prečišćenu RNK na ledu kada se pipetiraju alikvoti za naknade primene.

Protokoli za uklanjanje kontaminacije ribonukleazom iz staklenog posuđa i rastvora mogu se naći u opštim vodičima molekularne biologije, kao što su Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Dodatak B: Kvantifikacija i određivanje kvaliteta ukupne RNK

Kvantifikacija RNK

Koncentraciju RNK treba odrediti merenjem apsorpcije na 260 nm (A_{260}) u spektrofotometru. Da bi se obezbedio značaj, očitavanja treba da budu u linearnom opsegu spektrofotometra. ApSORpcija od 1 jedinice na 260 nm odgovara 44 µg RNK po ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$). Ovaj odnos važi samo za merenja u 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Stoga, ako je potrebno razblažiti uzorak RNK i to treba uraditi u 10 mM Tris-HCl. Kao što je objašnjeno u nastavku (pročitajte odeljak „Čistoća RNK“, stranica 79), odnos između vrednosti apsorpcije na 260 i 280 nm pruža procenu čistoće RNK. Prilikom merenja uzoraka RNK, budite sigurni da kivete ne sadrže ribonukleazu. Nulirajte spektrofotometar koristeći prazni uzorak koji se sastoji od istog udela pufera za izdvajanje (BR5) i Tris-HCl pufera kao u uzorcima koji će se meriti. Puffer za izdvajanje (BR5) ima visoku apsorpciju na 220 nm, što može dovesti do visokih nivoa pozadinske apsorpcije ako spektrofotometar nije pravilno nuliran. Primer proračuna koji je uključen u kvantifikaciju RNK je prikazan u nastavku.

Zapremina RNK uzorka	=	80 µl
Razblaživanje (1/15)	=	10 µl uzorka RNK + 140 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Izmerite apsorpciju razblaženog uzorka u kiveti (bez ribonukleaze).		
A_{260}	=	0,3
Koncentracija uzorka	=	$44 \times A_{260} \times \text{faktor razblaživanja}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 µg/ml
Ukupni prinos	=	koncentracija \times zapremina uzorka u mililitrima
	=	198 µg/ml \times 0,08 ml
	=	15,8 µg RNK

* Kada radite sa hemikalijama, uvek nosite odgovarajući laboratorijski mantil, rukavice za jednokratnu upotrebu i zaštitne naočare. Više informacija potražite u odgovarajućim listovima sa bezbednosnim podacima (Safety Data Sheet, SDS) dostupnim kod dobavljača proizvoda.

Čistoća RNK

Odnos očitavanja na 260 i 280 nm (A_{260}/A_{280}) daje procenu čistoće RNK u odnosu na zagađivače koji se apsorbuju u UV, kao što su proteini. Međutim, pH vrednost značajno utiče na odnos A_{260}/A_{280} . Niža pH vrednost uzrokuje niži odnos A_{260}/A_{280} i smanjenu osetljivost kontaminaciju proteinima.* Da biste dobili tačne vrednosti, preporučujemo merenje apsorpcije u 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Čista RNK ima odnos A_{260}/A_{280} od 1,8–2,2 u 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Nulirajte spektrofotometar koristeći prazni uzorak koji se sastoji od istog udela pufera za izdvajanje (BR5) i Tris-HCl pufera kao u uzorcima koji će se meriti. Pufer za izdvajanje (BR5) ima visoku apsorpciju na 220 nm, što može dovesti do visokih nivoa pozadinske apsorpcije ako spektrofotometar nije pravilno nuliran.

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

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



Sledeće preporuke kompanije BD mogu biti od pomoći pri rukovanju epruветama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Više informacija o epruветama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) potražite u *Priručniku za epruветe PAXgene Blood RNA Tube*.

Uputstvo za uklanjanje BD Hemogard poklopca

1. Jednom rukom uhvatite epruветu PAXgene Blood RNA Tube (BRT), stavlajući palac ispod BD Hemogard poklopca. (Radi dodatne stabilnosti oslonite ruku na čvrstu površinu.) Drugom rukom, okrećite BD Hemogard poklopac dok istovremeno gurate palcem druge ruke samo dok se čep epruветe ne olabavi.
2. Pomerite palac pre nego što podignete zatvarač. Nemojte koristiti palac da biste skinuli zatvarač sa epruветe PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Oprez: Ako epruвета PAXgene Blood RNA Tube (BRT) sadrži krv, postoji opasnost od izlaganja. Da bi se sprečile povrede tokom uklanjanja zatvarača, važno je da se palac koji se koristi za guranje poklopca nagore odvoji od epruветe PAXgene Blood RNA Tube (BRT) čim se BD Hemogard zatvarač olabavi.
3. Podignite zatvarač epruветe PAXgene Blood RNA Tube (BRT). U malo verovatnom slučaju da se plastični štitnik odvoji od gumenog čepa, nemojte ponovo sastavljati zatvarač. Pažljivo uklonite gumeni čep sa epruветe PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Uputstvo za umetanje sekundarnog BD Hemogard zatvarača

1. Vratite zatvarač na epruvetu PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Okrenite i snažno pritisnite da čep ponovo potpuno nalegne. Kompletno ponovno umetanje čepa je neophodno da bi zatvarač sigurno ostao na epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tokom rukovanja.

Informacije o poručivanju

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene spin kolonica, 50 Shredder spin kolonica, epruvete za obradu, dezoksiribonukleaza bez ribonukleaze I, reagensi i puferi bez ribonukleaze. Za korišćenje u kombinaciji sa epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 epruveta za prikupljanje uzoraka krvi	762165
Srodni proizvodi koji mogu da se poruče od kompanije QIAGEN za automatizovanu izolaciju RNK na QIAcube		
Starter Pack, QIAcube	Paket sadrži: nosače za reagens boce (3); trake za označavanje nosača (8); nastavke sa filterima od 200 µl (1024); nastavke sa filterima od 1000 µl (1024); nastavke filtera od 1000 µl, sa širokim otvorom (1024); reagens boce od 30 ml (18); adaptere rotora (240); držač adaptera rotora	990395
Filter-Tips, 1000 µL (1024)	Nastavci sa filterom, sterilni, na nosaču	990352
Reagent Bottles, 30 mL (6)	Reagens boce (30 ml) sa poklopcima; 6 komada u pakovanju; za korišćenje sa nosačem za reagens boce instrumenta QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 × 24)	Za 240 priprema: 240 adaptera rotora za jednokratnu upotrebu; za korišćenje sa QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Nosač za postavljanje 6 reagens boca od 30 ml na radni sto instrumenta QIAcube	9026197
Rotor Adapter Holder	Držač za 12 adaptera rotora za jednokratnu upotrebu; za korišćenje sa instrumentom QIAcube	990392

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
Povezani proizvodi koji se mogu poručiti od kompanije BD za prikupljanje krvi sa epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)*		
BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set	Igla od 21 G, 0,75 inča (0,8 × 19 mm), epruveta od 12 inča (305 mm,) Luer adapterom; 50 komada u kutiji, 200 komada u pakovanju	367286/367281
BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set	Igla od 21 G, 3/4 inča (0,8 × 19 mm), epruveta od 12 inča (305 mm) Luer adapterom. 50 kom./kutija, 200 kom./pakovanje	367344
BD Vacutainer One-Use Holder	Pakovanje samo sa prečnikom od 13 mm i 16 mm; 1000 kom./pakovanje	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 × 75 mm 4,0 ml zapremina izvlačenja, sa crvenim BD Hemogard zatvaračem i papirnom nalepnicom; 100 kom./kutija, 1000 kom./pakovanje	368975/367812
BD Vacutainer EST Tube	13 × 75 mm 3,0 ml zapremina izvlačenja sa providnim BD Hemogard zatvaračem i prozirnom nalepnicom; 100 kom./kutija, 1000 kom./pakovanje	362725
BD Vacutainer No Additive (Z) Tube	13 × 75 mm 3,0 ml zapremina izvlačenja, sa providnim BD Hemogard zatvaračem i papirnom nalepnicom; 100 kom./kutija, 1000 kom./pakovanje	366703

* Ovi dodaci za prikupljanje krvi predstavljaju tipične proizvode koji se mogu koristiti sa epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Da biste saznali više o ovim dodacima, uključujući i kako ih poručiti, posetite www.preanalytix.com.

Istorija revizija dokumenta

Datum	Promene
[R1] april 2022.	Inicijalno IVDR izdanje
[R2] februar 2023.	Adresa kompanije PreAnalytiX GmbH promenjena iz „Feldbachstrasse“ u „Garstligweg 8“. Dodani BD proizvodi u odeljak Informacije o poručivanju. Ažurirane informacije o bezbednosti.

Napomene



Najnovije informacije o licenciranju i odricanjima od odgovornosti za konkretan proizvod potražite u odgovarajućem priručniku za komplet kompanije PreAnalytiX ili QIAGEN ili korisničkom priručniku. Priručnici za komplet i korisnički priručnici kompanija PreAnalytiX i QIAGEN dostupni su na adresama www.preanalytix.com i www.qiagen.com, a možete da ih zatražite i od tehničke službe kompanije QIAGEN ili svog lokalnog distributera.

**Better samples
More to explore**



Istražite više na adresi: www.preanalytix.com

HB-3009-002 02/2023