

Şubat 2023

PAXgene® Blood RNA Kit (EI Kitabı) Kullanım Talimatları



Versiyon 3 (V3)

IVD

İn Vitro Tanı Amaçlı Kullanım İçindir



REF

762174



PreAnalytiX® GmbH
Garstligweg 8, 8634 Hombrechtikon, Switzerland

PreAnalytiX GmbH için QIAGEN® GmbH tarafından üretilmiştir

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALMANYA

R2

MAT

1130774TR

Ticari Markalar: 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. Aksi bildirilmedikçe PreAnalytiX, PreAnalytiX Logosu ve diğer tüm ticari markalar PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH'ye aittir.

PAXgene Blood RNA Kit için Sınırlı Lisans Sözleşmesi

Bu ürünün kullanımı herhangi bir alıcının veya ürün kullanıcısının aşağıdaki koşulları kabul ettiği anlamına gelir:

1. Ürün yalnızca ürünle birlikte ve bu el kitabında verilen protokollere uygun olarak kullanılabilir ve yalnızca panelin içinde bulunan bileşenlerle kullanım içindir. PreAnalytiX® ürünle sağlanan protokoller el kitabı ve www.qiagen.com ve www.preanalytix.com adresinde bulunan ek protokollerde tanımlananlar dışında bu panele dahil edilmemiş herhangi bir bileşen ile panelin içindeki bileşenleri kullanma veya birleştirme açısından herhangi bir fikri mülkiyeti altında bir lisans vermez.
2. Açıkça ifade edilen lisansların haricinde, PreAnalytiX bu kitin ve/veya kullanımının/kullanımlarının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmediğine ilişkin herhangi bir garanti vermez.
3. Bu kit tek kullanım için lisanslanmıştır ve tekrar kullanılamaz, yenilenemez veya tekrar satılamaz.
4. PreAnalytiX özellikle açıkça ifade edilenlerin haricinde açık veya zımnî diğer lisansları kabul etmez.
5. Kitin satın alıcısı ve kullanıcısı yukarıda yasaklanan herhangi bir eyleme neden olabilecek veya bunları kolaylaştırabilecek herhangi bir adım atmamayı veya başkasının atmasına izin vermemeyi kabul eder.
6. PreAnalytiX bu Sınırlı Lisans Sözleşmesinin yasaklarını herhangi bir Mahkemede yürürlüğe koyabilir ve kit ve/veya bileşenleriyle ilişkili herhangi bir fikri mülkiyet hakkı veya bu Sınırlı Lisans Sözleşmesini yürürlüğe koymak için tüm soruşturma ve Mahkeme masraflarını avukat masrafları dahil olmak üzere geri alacaktır.

Güncellenmiş lisans şartları için bkz. www.qiagen.com ve www.preanalytix.com.

HB-3009-002 BD-8945 1130774TR © 2023 PreAnalytiX GmbH, tüm hakları saklıdır.

PreAnalytiX Distribütörleri

PreAnalytiX ürünleri, PreAnalytiX için QIAGEN ve BD tarafından üretilmekte ve dağıtılmaktadır.

İçerik

| | |
|--|----|
| İçerik..... | 3 |
| Kullanım Amacı..... | 6 |
| Planlanmış Kullanıcılar | 6 |
| Açıklama ve İlke | 7 |
| Giriş | 7 |
| İlke ve prosedür | 7 |
| Örnek toplama ve stabilizasyonu | 8 |
| RNA izolasyonu | 8 |
| Manuel RNA izolasyonu..... | 9 |
| Otomatik RNA izolasyonu | 11 |
| Sağlanan Materyaller | 14 |
| Kit içeriği | 14 |
| Kit bileşenleri..... | 15 |
| Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller | 16 |
| Tüm protokoller için | 16 |
| Manuel protokol için | 16 |
| Otomatik protokol için..... | 17 |
| Uyarılar ve Önlemler..... | 18 |
| Güvenlik bilgileri..... | 18 |
| Acil durum bilgileri | 18 |
| Önlemler | 19 |
| Reaktif Saklama ve Kullanma | 22 |

| | |
|--|----|
| Kullanımda stabilite..... | 22 |
| Numune Taşıma, Saklama ve Kullanma | 23 |
| Protokol: PAXgene Blood RNA Tubes İçinde Toplanan İnsan Tam Kanından Total RNA'nın Manuel İzolasyonu | 24 |
| Protokol: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) İçinde Toplanan İnsan Tam Kanından Total RNA'nın Otomatik İzolasyonu | 32 |
| Ürün Kullanımı Sınırlamaları | 39 |
| Kalite Kontrol | 39 |
| Performans Özellikleri | 40 |
| Örnek toplama ve stabilizasyonu | 40 |
| Manuel RNA izolasyonu..... | 45 |
| Otomatik RNA izolasyonu | 54 |
| İzole edilmiş RNA'nın stabilitesi | 57 |
| Önemli Notlar | 58 |
| QIAcube Connect MDx'in kullanımı..... | 58 |
| QIAcube Connect MDx'i başlatma | 58 |
| QIAcube Connect MDx'e protokol kurulumu | 60 |
| QIAcube Connect MDx'i yükleme | 61 |
| Döndürme kolonları (PSC, PRC), MCT ve QIAcube Connect MDx plastik malzemeleri ... | 64 |
| Bertaraf | 70 |
| Referanslar | 71 |
| Sorun Giderme Kılavuzu..... | 72 |
| Semboller..... | 74 |
| İletişim Bilgileri | 76 |

| | |
|--|----|
| Ek A: RNA Muamelesiyle İlgili Genel Notlar | 77 |
| Ek B: Total RNA Kantifikasyonu ve Kalitesinin Belirlenmesi | 78 |
| Ek C: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) Kullanımı | 80 |
| Sipariş Bilgileri | 82 |
| Belge Revizyon Geçmişi | 84 |

Kullanım Amacı

İn vitro tanı amaçlı kullanım içindir.

PAXgene Blood RNA System bir kan toplama tüpünden (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) ve nükleik asit saflaştırma kitinden (PAXgene Blood RNA Kit) oluşur. Kanın toplanmasına, saklanmasına ve taşınmasına, intraselüler RNA'nın kapalı bir t p içinde stabilizasyonuna ve bunları takiben moleküler diagnostik testlerde kullanılan RT-PCR için tam kandan konak RNA izolasyonu ve saflaştırılmasına yöneliktir.

PAXgene Blood RNA System'in performans özellikleri sadece FOS ve IL1B gen transkriptleri ile belirlenmiştir. Diğer hedef transkriptler için uygun PAXgene Blood RNA System performans özelliklerini belirlemekten kullanıcı sorumludur.

Kullanım endikasyonları

PAXgene Blood RNA Kit, PAXgene Blood RNA Tube'da (BRT) toplanan tam kandan intraselüler RNA saflaştırılmasına yöneliktir. Kit, PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ile birlikte kullanıldığında sistem, moleküler diagnostik testlerde kullanılan RT-PCR için tam kandan saflaştırılmış intraselüler RNA sağlar.

Planlanmış Kullanıcılar

Ürünün, in vitro tanı amaçlı prosedürler konusunda eğitilmış teknisyenler ve doktorlar gibi profesyonel kullanıcılar tarafından kullanılması amaçlanmıştır.

Bu kit, profesyonel kullanım için üretilmiştir.

Açıklama ve İlke

Giriş

Hücrel RNA'nın incelenmesi için tam kan alımı birçok moleküler tahlilin ilk adımıdır. Bununla birlikte, söz konusu deneylerdeki büyük sorunlardan biri, in vitro hücrel RNA profilinin stabil olmamasıdır. PreAnalytiX araştırmaları tam kandaki ayrı mRNA türlerinin kopya sayılarının oda sıcaklığında saklama veya nakliye sırasında 1000 kattan fazla değişebileceğini göstermiştir (Rainen et al., 2002). Bunun nedeni kan alınmasından sonra hızlı RNA degradasyonu ve belirli genlerin indüklenen ekspresyonudur. RNA ekspresyonu profilindeki bu tür değişiklikler gen ekspresyonunun güvenilir çalışmalarını imkansız hale getirir. Bu nedenle flebotomi sırasında ve sonrasında RNA ekspresyon profilini koruyan bir yöntem insan tam kanında gen ekspresyonunun doğru analizi için şarttır.

İlke ve prosedür

PreAnalytiX, intraselüler RNA'nın izolasyonu için hızlı ve etkin bir protokolle birlikte insan tam kan numunelerinin toplanması, stabilize edilmesi, saklanması ve taşınmasını mümkün kılan bir sistem geliştirmiştir. Sistem, kan toplama ve RNA stabilizasyonu için PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) kullanılmasını ve sonrasında PAXgene Blood RNA Kit kullanılarak manuel veya otomatik RNA izolasyonu gerektirmektedir. RNA kalitesi ve verimi açısından manuel ve otomatik protokoller önemli ölçüde eşdeğer performans sağlar. Manuel protokol (sayfa 45'ten itibaren) ve otomatik protokol (sayfa 54'den itibaren) için performans verileri bu el kitabına dahil edilmiştir.

PAXgene Blood RNA System, ISO 20186-1:2019, Moleküler in vitro tanı amaçlı incelemeler – Venöz tam kan için inceleme öncesi prosedürlere yönelik spesifikasyonlar – Bölüm 1: İzole edilmiş hücrel RNA uyarınca kan numunesi toplamadan hücrel RNA izolasyonuna kadar ön analiz iş akışı adımlarının standart hale getirilmesini sağlar.

Örnek toplama ve stabilizasyonu

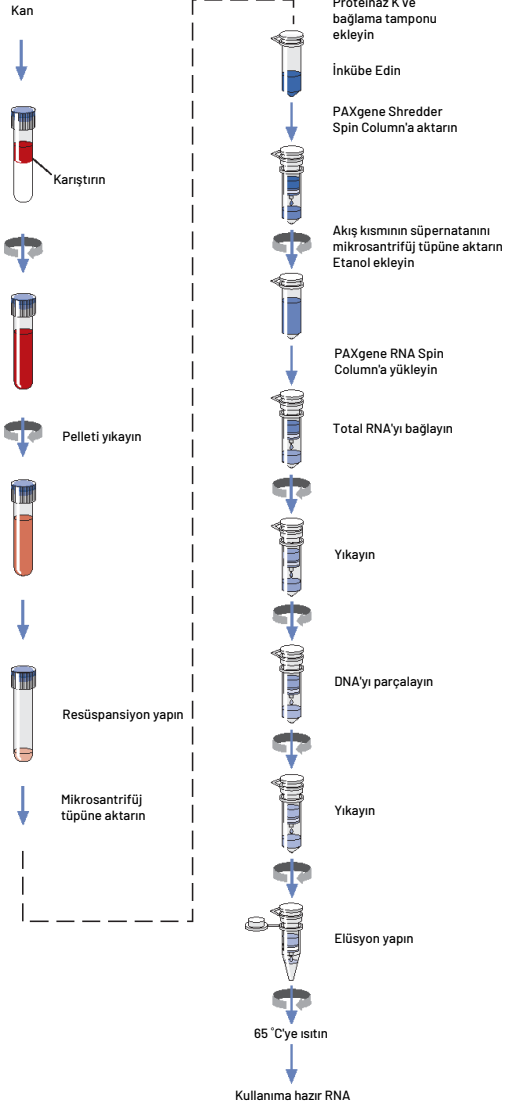
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), tescilli bir RNA stabilizasyon reaktifi içerir. Bu katkı maddesi, RNA moleküllerini RNazlar tarafından degradasyondan korur ve gen ekspresyonunda ex vivo değişiklikleri minimuma indirir. PAXgene Blood RNA System'in performans özellikleri, sayfa 40'dan itibaren görülebilecek FOS ve IL1B gen transkriptleri ile belirlenmiştir.

RNA izolasyonu

PAXgene Blood RNA Kit, bir PAXgene Blood RNA Tube'da (BRT) toplanmış 2,5 mL insan tam kanından total RNA'nın izolasyonuna yöneliktir. Prosedür basittir ve manuel veya otomatik prosedürler kullanılarak gerçekleştirilebilir (bkz. sırasıyla Şekil 1 veya Şekil 3, sayfa 10 veya 12). Her iki protokolda izolasyon, nükleik asitleri PAXgene Blood RNA Tube'da (BRT) pellet haline getirmek için bir santrifüjleme adımıyla başlar. Pellet yıkanır, resüspanse edilir ve sonrasında manuel veya otomatik RNA izolasyonu yapılır. Prensip olarak, her iki protokol aynı kit bileşenleriyle aynı protokol adımlarını izler.

Manuel RNA izolasyonu

Ayrıntılı olarak, resüspanse edilmiş pellet, protein parçalanmasını sağlamak üzere proteinaz K (PK) ile birlikte optimize edilmiş tamponlarda inkübe edilir. Hücre lizatını homojenleştirmek ve kalan hücre kalıntılarını gidermek üzere PAXgene Shredder döndürme kolonu (PSC) üzerinden ek bir santrifüjleme gerçekleştirilir ve akış fraksiyonunun süpernatanı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne (microcentrifuge tube, MCT) aktarılır. Bağlama koşullarını ayarlamak için etanol eklenir ve bir PAXgene RNA döndürme kolonuna (PRC) lizat uygulanır. Kısa bir santrifüjleme sırasında RNA, kontaminanların içinden geçmesi sırasında PAXgene silika membranına selektif olarak bağlanır. Kalan kontaminanlar birkaç etkin yıkama adımında giderilir. Birinci ve ikinci yıkama adımları arasında membrana, eser miktarda bağlanmış DNA'yı gidermek üzere DNaz I (RNFD) uygulanır. Yıkama adımlarından sonra RNA, elüsyon tamponunda (BR5) elüsyona tabi tutulur ve ısıyla denatüre edilir. PAXgene Blood RNA System kullanılarak manuel RNA izolasyonunun performans özellikleri sayfa 45 üzerinde görülebilir.



Şekil 1: Manuel PAXgene Blood RNA prosedürü.

Otomatik RNA izolasyonu

Kan RNA'sının izolasyonu, QIAGEN QIAcube Connect MDx'te otomatik hale getirilir. Yenilikçi cihazda, QIAGEN döndürme kolonlarının işlenmesi için gelişmiş teknoloji kullanılır ve böylece, otomatik ve düşük iş hacimli örnek hazırlama işleminin laboratuvar iş akışına kusursuz bir şekilde entegre olması sağlanır. QIAcube Connect MDx kullanılarak örnek hazırlama işleminde, manuel prosedür ile aynı adımlar (parçalama, bağlama, yıkama ve elüsyon) izlenir ve bu işlem aynı PAXgene Blood RNA Kit kullanılarak gerçekleştirilebilir.

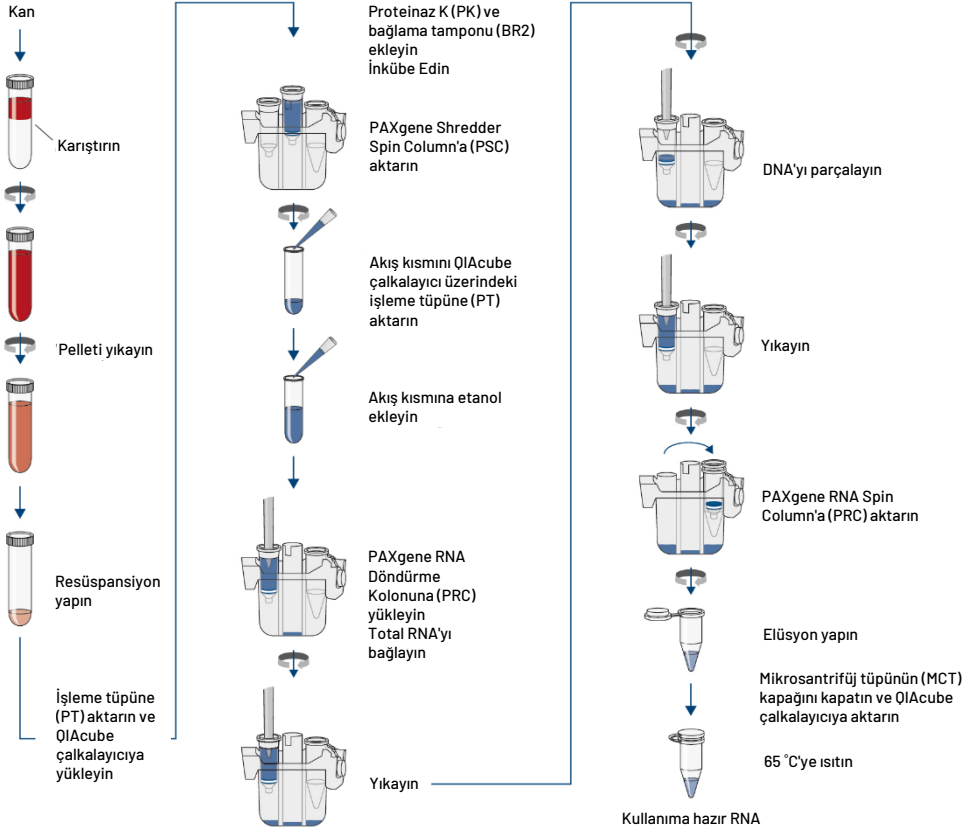


Şekil 2: QIAcube Connect MDx.



QIAGEN QIAcube Connect MDx tüm ülkelerde mevcut değildir. Daha fazla ayrıntı için lütfen QIAGEN Teknik Servisi ile irtibat kurun.

Otomatik RNA izolasyon protokolü 2 bölümden (veya protokolden) oluşur: "PAXgene Blood RNA Part A" (elüsyon için PAXgene Blood RNA Tube'daki kandan) ve "PAXgene Blood RNA Part B" (kullanıma hazır RNA'ya elüsyondan sonra); 2 bölüm arasında kısa bir manuel müdahale yer alır (bkz. Şekil 3).




Şekil 3: Otomatik PAXgene Blood RNA prosedürü.

Santrifüjlenmiş, yıkanmış ve resüspanse edilmiş nükleik asit pelleti (bkz. "RNA izolasyonu", sayfa 8), PAXgene Blood RNA Tube'dan (BRT) QIAcube Connect MDx çalışma tablası üzerindeki termoçalkalayıcı ünitesine yerleştirilen işleme tüplerine (Processing Tube, PT) aktarılır. Operatör menüden "PAXgene Blood RNA Part A" protokolünü seçer ve başlatır. QIAcube Connect MDx, protokolün elüsyon tamponunda (BR5) RNA elüsyonuna kadar olan adımlarını gerçekleştirir. Operatör, saflaştırılmış RNA'yı içeren MCT'leri QIAcube Connect MDx'in termoçalkalayıcı ünitesi içine aktarır. Operatör menüden "PAXgene Blood RNA Part B" protokolünü seçip başlatır ve QIAcube Connect MDx tarafından ısı denatürasyonu gerçekleştirilir. QIAcube Connect MDx'te PAXgene Blood RNA System kullanılarak otomatik RNA izolasyonunun performans özellikleri sayfa 54 üzerinde görülebilir.

Sağlanan Materyaller

Kit içeriği

| PAXgene Blood RNA Kit Katalog no. Toplama cihazlarının sayısı | | | (50) 762174 50 |
|---|--|---|----------------------|
| Bileşen adı | Açıklama | Sembol | Adet |
| BR1 | Resuspension Buffer (Resüspansiyon Tamponu) | RES BUF | 20 mL |
| BR2 | Binding Buffer (Bağlama Tamponu)* | BIND BUF | 18 mL |
| BR3 | Wash Buffer 1 (Yıkama Tamponu 1)* | WASH BUF 1 | 45 mL |
| BR4 | Wash Buffer 2 (Yıkama Tamponu 2) (konsantre)† | WASH BUF 2 CONC | 11 mL |
| BR5 | Elution Buffer (Elüsyon Tamponu) | ELU BUF | 6 mL |
| RNFW | RNase-Free Water (RNaz İçermeyen Su) (şişe) | PEL WASH | 2 × 125 mL |
| PK | Proteinase K (Proteinaz K) (yeşil kapaklı) | PROTK | 2 × 1,4 mL |
| PRC | PAXgene RNA Spin Columns (PAXgene RNA Döndürme Kolonları) (kırmızı)‡ | PAXgene RNA COL | 5 × 10 |
| PT | Processing Tubes (İşleme Tüpleri) (2 mL)§ | PROC TUBE | 6 × 50 |
| Hemogard™ | Secondary BD Hemogard Closures (Sekonder BD Hemogard Kapakları) | SEC CLOS | 50 |
| MCT | Microcentrifuge Tubes (Mikrosantrifüj Tüpleri) (1,5 mL)§ | MIC TUBE | 3 × 50, 1 × 10 |
| RNFD | DNase I, RNase-free (DNaz I, RNaz içermeyen) (liyofilize) | DNA REM | 1500 Kunitz birimi¶ |
| RDD | DNA Digestion Buffer (DNA Parçalama Tamponu) (beyaz kapaklı) | DNA DIG BUF | 2 × 2 mL |
| DRB | DNase Resuspension Buffer (DNaz Resüspansiyon Tamponu) (tüp, eflatun kapaklı) | DNase RES BUF | 2 mL |
| PSC | PAXgene Shredder Spin Columns (PAXgene Shredder Döndürme Kolonları (eflatun)‡) | PAXgene SHRED COL | 5 × 10 |
| EI Kitabı | PAXgene Blood RNA Kit EI Kitabı (Versiyon 3) |  | 1 |

* Çamaşır suyu içeren dezenfektan reaktiflerle uyumlu değildir. Bir guanidin tuzu içerir. Güvenlik bilgileri için bkz. Sayfa 18.

† Yıkama Tamponu 2 (BR4) konsantre olarak sağlanır. İlk defa kullanmadan önce bir çalışma solüsyonu elde etmek için şişede belirtildiği üzere 4 hacim etanol (%96-100 h/h, saflık derecesi p.a.) ekleyin.

‡ Her kolon sadece tek kullanımlık bir blister ambalajda bulunur. Bertaraf talimatları için lütfen güvenlik bilgilerine bakın.

§ Tüpler plastik torbalarda bulunur ve her tüp sadece tek kullanımlıktır. Bertaraf talimatları için lütfen güvenlik bilgilerine bakın.

¶ Kunitz birimleri yaygın olarak DNaz I ölçümü için kullanılmaktadır. 25 °C sıcaklıkta, pH 5,0'da substrat olarak yüksek ölçüde polimerize DNA kullanıldığında A_{260} 'ta bir mililitre için dakika başına 0,001 artışa yol açan DNaz I miktarı olarak tanımlanmaktadır (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* 33, 349 ve 363).

Kit bileşenleri

| Bileşen adı | Açıklama | Aktif Bileşen | Konsantrasyon |
|-------------|---|--------------------------------|---|
| BR1 | Resuspension Buffer (Resüspansiyon Tamponu) | Yok | - |
| BR2 | Binding Buffer (Bağlama Tamponu) | Guanidin tiyosiyanat | ≥ %30 ila < 50 a/a |
| BR3 | Wash Buffer 1 (Yıkama Tamponu 1) | Guanidin tiyosiyanat Etanol | ≥ %10 ila < 20 a/a ≥ %3 ila < 10 a/a |
| BR4 | Wash Buffer 2 (Yıkama Tamponu 2) (konsantre) | Yok | - |
| BR5 | Elution Buffer (Elüsyon Tamponu) | Yok | - |
| RNFW | RNase-Free Water (RNaz İçermeyen Su)(şişe) | Yok | - |
| PK | Proteinase K (Proteinaz K) (yeşil kapaklı) | Proteinaz K | ≥ %1 ila < 3 a/a |
| RNFD | DNase I, RNase-free (DNaz I, RNaz içermeyen)(liyoofilize) | DNaz | ≥ %90 ila ≤ 100 a/a |
| RDD | DNA Digestion Buffer (DNA Parçalama Tamponu) (beyaz kapaklı) | Yok | - |
| DRB | DNase Resuspension Buffer (DNaz Resüspansiyon Tamponu) (tüp, eflatun kapaklı) | Yok | - |

Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller

Kimyasallarla çalışırken her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için ürün tedarikçisinden temin edilebilecek uygun güvenlik veri sayfalarına (Safety Data Sheet, SDS) başvurun.

Tüm protokoller için

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; kat. no. 762165)
- Etanol (%96-100 h/h, saflık derecesi p.a.)
- Pipetler* (10 µL - 4 mL)
- Steril, aerosol bariyerli, RNAz içermeyen pipet uçları†
- Dereceli silindir‡
- 3000-5000 × g hıza ulaşabilen ve PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) için sallanan kova rotoru bulunan santrifüj*
- Vorteks karıştırıcı*
- Parçalanmış buz
- Etiketleme için silinmez kalem

Manuel protokol için

- En az 1000-8000 × g aralığında hıza ulaşabilen (daha düşük ve daha yüksek g kuvvetleri uygulanabilir) (ayrıntılar için protokol adımlarına bakın) ve 2 mL'lik MCT'ler için bir rotoru bulunan değişken hızlı mikrosantrifüj*

* Cihazların ve aygıtların, üreticinin önerilerine göre düzenli olarak kontrol edildiğinden, bakımının yapıldığından ve kalibre edildiğinden emin olun.

† RNA kullanımı ile ilgili kılavuz ilkelere aşına olduğunuzdan emin olun (Ek A, sayfa 75).

‡ Tampon BR4 konsantresine etanol eklemek için.

- 55 °C ve 65 °C'de inkübasyon yapabilen ve 1400 rpm hızı geçmemek üzere ≥ 400 rpm hızda sallayabilen çalkalayıcı-inkübatör* (örn., Eppendorf® Thermomixer Compact veya eşdeğeri)

Otomatik protokol için

- Makas
- QIAcube Connect MDx* (QIAGEN, kat. no. 9003070)

QIAcube Connect MDx sarf malzemeleri:

- Filter-Tips, 1000 μ L (1024)(QIAGEN, kat. no. 990352)†
- Reagent Bottles, 30 mL (6)(QIAGEN, kat. no. 990393)†
- Rotor Adapters (10 \times 24)(QIAGEN, kat. no. 990394)†

QIAcube Connect MDx aksesuarları:

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, kat. no. 990392)†

QIAcube Connect MDx servis paketleri:

- QIAcube Connect MDx System FUL-2 (QIAGEN, kat. no. 9003071)
- QIAcube Connect MDx System FUL-3 (QIAGEN, kat. no. 9003072)
- QIAcube Connect MDx System PRV-1 (QIAGEN, kat. no. 9003073)
- QIAcube Connect MDx Device PRV-1 (QIAGEN, kat. no. 9003074)
- QIAcube Connect MDx System PRM-1 (QIAGEN, kat. no. 9003075)

* Cihazın ve aygıtın, üreticinin önerilerine göre düzenli olarak kontrol edildiğinden, bakımının yapıldığından ve kalibre edildiğinden emin olun.

† Ayrıca Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, kat. no. 990395) içinde bulunmaktadır.

Uyarılar ve Önlemler

Avrupa Birliği'ndeki müşteriler için geçerli olmak üzere, cihazla ilgili olarak meydana gelen her türlü ciddi olayı, üreticiye ve kullanıcı ve/veya hastanın bulunduğu Üye Devletteki yetkili makama bildirmeniz gerektiğini lütfen dikkate alın.

Avrupa Birliği dışındaki müşteriler için geçerli olmak üzere, cihazla ilgili olarak meydana gelen ciddi olayları üreticiye ve/veya yetkili temsilcisine ve kullanıcının ve/veya hastanın bulunduğu ülkenin düzenleyici makamına rapor etmek için yerel düzenlemelerinize başvurmanız gerekebileceğini lütfen dikkate alın.

Güvenlik bilgileri

Kimyasallarla ve biyolojik tehlikeli materyallerle çalışırken her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için lütfen uygun güvenlik veri sayfalarına (Safety Data Sheet, SDS) başvurun. Bunlar, her bir QIAGEN kiti ve kit bileşenine ait SDS'yi bulabileceğiniz, görüntüleyebileceğiniz ve yazdırabileceğiniz www.qiagen.com/safety adresinde çevrimiçi olarak kullanışlı ve kompakt bir PDF biçiminde mevcuttur.

- Tüm kimyasallar ve biyolojik materyaller potansiyel olarak tehlikeli maddedir. Kan numuneleri ve örnekler potansiyel olarak enfeksiyözdür ve bunlar biyolojik tehlikeli materyal olarak ele alınmalıdır.
- Biyolojik tehlikeli atıkları ve kit atıklarını, yerel güvenlik prosedürlerinize uygun olarak atın.

Acil durum bilgileri

CHEMTREC

ABD ve Kanada Dışı +1 703-527-3887

Önlemler

Kanla çalışırken, kan yoluyla bulaşan patojenlere (örn. HIV, hepatit B ve kan yoluyla bulaşan diğer virüsler) potansiyel maruz kalma riskini önlemeye yönelik evrensel önlemleri uygulayın. Kan yoluyla maruz kalmaktan korunmak için eldiven, önlük, koruyucu gözlük ve diğer kişisel koruyucu donanım ve mühendislik kontrollerini kullanın. Daha fazla bilgi için lütfen uygun güvenlik veri sayfalarına (Safety Data Sheet, SDS) başvurun. Bunlar, bu kit için SDS'leri bulabileceğiniz, görüntüleyebileceğiniz ve yazdırabileceğiniz www.preanalytix.com sayfasında kullanımı kolay ve kompakt PDF formatında çevrimiçi bulunmaktadır.

DİKKAT



Örnek hazırlama atık maddesine doğrudan çamaşır suyu veya asit solüsyonları KATMAYIN.

Bağlama tamponu (BR2) veya yıkama tamponu 1 (BR3) çamaşır suyu ile birleştiğinde yüksek derecede reaktif bileşikler oluşturabilen guanidin tiyosiyanat içermektedir. Bağlama tamponu (BR2) veya yıkama tamponu 1 (BR3) dökülürse uygun laboratuvar deterjanı ve suyla temizleyin. Enfeksiyöz olabilecek ajanlar içeren sıvı dökülürse etkilenmiş bölgeyi önce laboratuvar deterjanı ve suyla ve sonra %1 (h/h) sodyum hipokloritle (çamaşır suyu) temizleyin.

PAXgene Blood RNA Tube'dan (BRT) RNA stabilize edici solüsyon ve kan karışımı, 9 hacim RNA stabilize edici solüsyon ve kan karışımı başına 1 hacim piyasada bulunan çamaşır suyu solüsyonu (%5 sodyum hipoklorit) kullanılarak dezenfekte edilebilir.

RNA izolasyon prosedüründeki santrifüj adımlarından süpernatantlar gibi örnek hazırlama atıklarının enfeksiyöz olabileceği kabul edilmelidir. Biyolojik materyalleri bertaraf etmek için biyolojik tehlikeli materyal kapları kullanın. Bertaraf işlemi, tesisinizin yerel düzenleme ve prosedürlerine uygun olarak yapılmalıdır.

PAXgene Blood RNA Kit'in spesifik bileşenleri sadece tek kullanımlıktır. Ayrı bileşenler hakkında bilgi için bkz. Kit içeriği, sayfa 14.

PAXgene Blood RNA Kit'in bileşenleri için aşağıdaki tehlike ve önlem ifadeleri geçerlidir. PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) hakkında güvenlik bilgileri için *PAXgene Blood RNA Tube El Kitabı* belgesine bakın.

Tampon BR2



İçerik: guanidin tiyosiyanat. Tehlike! Yutulursa zararlıdır. Cilde temas ederse veya solunursa zararlı olabilir. Ciddi göz hasarına neden olur. Sudaki organizmalara uzun dönemli etkilerle zararlıdır. Asitlerle temas çok toksik gaz ortaya çıkarır. Çevreye salınımından kaçının. Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/koruyucu gözlük/yüz koruması kullanın. GÖZE KAÇMIŞSA: Birkaç dakika suyla iyice durulayın. Eğer mevcut ve kolaysa kontak lensleri çıkarın. Durulamaya devam edin. Maruz kalınması veya endişelenilmesi DURUMUNDA: Hemen bir ZEHİR MERKEZİ veya doktoru arayın. İçeriği/kabı onaylı bir atık bertaraf tesisine atın.

Tampon BR3



İçerik: etanol; guanidin tiyosiyanat. Tehlike! Yanıcı sıvı ve buhar. Ciddi göz hasarına neden olur. Asitlerle temas çok toksik gaz ortaya çıkarır. Isı/kıvılcımlar/açık alevler/sıcak yüzeylerden uzak tutun. Sigara içmeyin. Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/koruyucu gözlük/yüz koruması kullanın. GÖZE KAÇMIŞSA: Birkaç dakika suyla iyice durulayın. Eğer mevcut ve kolaysa kontak lensleri çıkarın. Durulamaya devam edin. Hemen bir ZEHİR MERKEZİ veya doktoru arayın.

DNaz I



İçerik: DNaz. Tehlike! Alerjik cilt reaksiyonuna neden olabilir. Solunursa alerji veya astım belirtileri ya da solunum zorluklarına neden olabilir. Tozları solumaktan kaçınin. Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/koruyucu gözlük/yüz koruması kullanın. Solunum koruması kullanın. Maruz kalınması veya endişelenilmesi DURUMUNDA: Bir ZEHİR MERKEZİ veya doktoru arayın. Kişiyi temiz havaya çıkarın ve solunum için rahat bir pozisyonda tutun. Kontamine giysileri tekrar kullanmadan önce yıkayın.

Reaktif Saklama ve Kullanma

PAXgene RNA döndürme kolonları (PRC), PAXgene Shredder döndürme kolonları (PSC), proteinaz K (PK) ve tamponlar (BR1, BR2, BR3, BR4 ve BR5) kit etiketinde belirtilen sıcaklıkta kuru olarak saklanmalıdır.

DNaz I (RNFD), DNA parçalama tamponu (RDD) ve DNaz resüspansiyon tamponu (DRB) içeren RNase-Free DNase Set ortam sıcaklığında sevk edilmektedir. RNase-Free DNase Set'in tüm bileşenlerini alınır alınmaz etiket üzerinde belirtilen sıcaklıkta saklayın. Uygun şekilde saklandığında kit, kit kutusundaki son kullanma tarihine kadar stabildir.

Tüm bileşenlerin kutusunda ve etiketlerinin üstünde yazılı olan son kullanma tarihlerine ve saklama koşullarına dikkat edilmelidir. Süresi dolmuş veya hatalı saklanmış bileşenleri kullanmayın.

Kullanımda stabilite

Kitin ilk kullanımından sonra reaktifler, kit kutusu etiketinde belirtilen sıcaklıklarda ve etiketteki son kullanma tarihine kadar orijinal şişelerinde stabildir.

QIAcube Connect MDx'in reaktif şişelerine doldurulan reaktifler, oda sıcaklığında (15-25°C) saklandığında 3 ay boyunca stabildir.

Sulandırılmış DNaz I (RNFD), orijinal cam şişesinde 2-8°C'de 6 hafta boyunca stabildir (stok solüsyonu).

Stok solüsyonununun 1,5 mL'lik MCT'lerdeki (kitle birlikte verilir) tek kullanımlık alikotları -20°C'de saklandığında 9 ay boyunca stabildir. Tek kullanımlık alikotlar çözdürüldükten sonra 2-8°C'de saklandığında 6 hafta boyunca stabildir.

Numune Taşıma, Saklama ve Kullanma

PAXgene Blood RNA Kit, PAXgene Blood RNA Tubes'da toplanan kan ile kullanıma yöneliktir. Kan, PAXgene Blood RNA Tube El Kitabı belgesinde yer alan talimatlar doğrultusunda PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) içinde toplanmalıdır. Gerekirse PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) kullanımı hakkında öneriler için Ek C'ye (sayfa 80) bakın. Tüm örnekler tehlikeli olabileceği düşünülerek muamele yapılmalıdır. PAXgene Blood RNA System'in performans özellikleri, 41-44 arası sayfalarda görebileceğiniz FOS ve IL1B gen transkriptleri ile belirlenmiştir.

Protokol: PAXgene Blood RNA Tubes İçinde Toplanan İnsan Tam Kanından Total RNA'nın Manuel İzolasyonu

Başlamadan önce önemli noktalar

- Kit kutusunun sağlam ve hasarsız olduğundan ve tamponların sızmamış olduğundan emin olun. Hasarlı bir kiti kullanmayın.
- Bir pipet kullanırken doğru hacme ayarlandığından ve sıvının dikkatli ve tam olarak aspire edilip dağıtıldığından emin olun.
- Örnekleri yanlış tüp veya döndürme kolonuna aktarmaktan kaçınmak için tüm tüpler ve döndürme kolonlarının silinmez bir kalemle uygun şekilde etiketlendiğinden emin olun. Her tüpün (PT, MCT) kapağı ve gövdesini etiketleyin. Döndürme kolonları için kolon PT'sinin gövdesini etiketleyin. Sıvı aktarıldıktan sonra her tüp veya döndürme kolonunu kapatın.
- Prosedür sırasında örnekler ve tamponların dökülmesi RNA verimi ve saflığını azaltabilir.
- Aksi belirtilmediği sürece bu protokolün santrifüj adımları dahil olmak üzere tüm adımları oda sıcaklığında (15-25°C) gerçekleştirilmelidir.

Nükleik asit amplifikasyonu teknolojilerinin duyarlılığı nedeniyle örneklerin muamelesi sırasında çapraz kontaminasyondan kaçınmak için şu önlemler gereklidir:

- Örneği kolon kenarını ıslatmadan dikkatlice döndürme kolonuna (PSC, PRC) pipetleyin.
- Sıvı transferleri arasında daima pipet uçlarını değiştirin. Aerosol bariyerli pipet uçları kullanın.
- Döndürme kolonu (PSC, PRC) membranına pipet ucu ile dokunmaktan kaçının.
- Bir MCT'yi vorteksledikten veya ısıttıktan sonra kapağın içindeki damlaları gidermek için kısa süre santrifüjleyin.

- Tüm prosedür boyunca eldiven kullanın. Eldivenler ile örneğin teması durumunda eldivenleri hemen değiştirin.
- Mikrosantrifüje yerleştirmeden önce döndürme kolonunu (PSC, PRC) kapatın. Prosedürde açıklandığı şekilde santrifüjleyin.
- Her defasında sadece bir döndürme kolonu (PSC, PRC) açın ve aerosol oluşturmaktan kaçının.
- Birden fazla örneğin etkin paralel işlenmesi için santrifüjleme sonrasında döndürme kolonlarının (PSC, PRC) aktarılabileceği şekilde bir rafı PT'ler ile doldurun. Akış kısmını içeren kullanılmış PT'leri atın ve döndürme kolonlarını (PSC, PRC) tekrar mikrosantrifüje aktarmadan önce yeni PT'lerin içine yerleştirin.

Başlamadan önce yapılacaklar

- Kan, *PAXgene Blood RNA Tube EI Kitabı* belgesinde yer alan talimatlar doğrultusunda PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) içinde toplanmalıdır. Gerekirse PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) kullanımı hakkında öneriler için Ek C'ye (sayfa 80) bakın.
- Kan hücrelerinin tam lizisini ve RNA'nın çökmesini sağlamak için PAXgene Blood RNA Tubes'un (BRT), kan toplandıktan sonra en az 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildiğinden emin olun. PAXgene Blood RNA Tube'un (BRT) bir gece boyunca inkübe edilmesi verimleri artırabilir. 2-8 °C, -20 °C veya -70 °C'de saklama öncesinde oda sıcaklığında 2 saat boyunca ilk kan inkübasyonu yapılmamışsa, ilk olarak PAXgene Blood RNA Tube'u (BRT) oda sıcaklığına getirin ve ardından prosedüre başlamadan önce bu sıcaklıkta 2 saat boyunca inkübe edin.
- Sayfa 18 içindeki güvenlik bilgilerini okuyun.
- RNA kullanımıyla ilgili kılavuz ilkeleri okuyun (Ek A, sayfa 77).
- Pipetler ve çalkalayıcı-inkübatör gibi cihazların üreticinin önerilerine göre düzenli olarak kontrol ve kalibre edildiğinden emin olun.

- Adım 5 ve 20'de bir çalkalayıcı-inkübatör gereklidir. Çalkalayıcı-inkübatör sıcaklığını 55°C'ye ayarlayın.
- Bağlama tamponu (BR2) saklama halinde bir çökelti oluşturabilir. Gerekirse çözmek için 37°C'ye ısıtın.
- Yıkama tamponu 2 (BR4) konsantre olarak sağlanır. İlk defa kullanmadan önce bir çalışma solüsyonu elde etmek için şişede belirtildiği üzere 4 hacim etanol (%96-100 h/h, saflık derecesi p.a.) ekleyin.
- RNase-Free DNase Set ilk kez kullanılacaksa DNaz I stok solüsyonu hazırlayın. Katı DNaz I'yı (RNFD; 1500 Kunitz birimi)* set ile sağlanan DNaz resüpsansiyon tamponunun (DRB) 550 µL'si içinde çözün. Şişeyi açarken DNaz I (RNFD) kaybedilmediğinden emin olun. Sulandırılmış DNaz I'yı (RNFD) vortekslemeyin. DNaz I fiziksel denatürasyona özellikle duyarlıdır. Karıştırma sadece şişenin yavaşça tersine çevrilmesi ile gerçekleştirilmelidir.
- Sulandırılmış DNaz I (RNFD), orijinal cam şişesinde 2-8 °C'de (stok solüsyonu) ya da stok solüsyonu cam şişeden çıkarılıp tek kullanımlık alikotlara ayrıldıktan sonra (kitle birlikte verilen 1,5 mL'lik MCT'yi kullanın; 5 alikot için yeterli sayıda mevcuttur) -20 °C'de saklanabilir. Çözdürülmüş alikotlar 2-8 °C'de saklanabilir. Alikotları çözdürdükten sonra yeniden dondurmayın.
- DNaz I (RNFD) sulandırma ve alikot oluşturma sırasında, RNA kullanımına yönelik kılavuz ilkeleri izlediğinizden emin olun (Ek A, sayfa 77).

Prosedür

1. PAXgene Blood RNA Tube'u (BRT) sallanan kova rotor kullanarak 10 dakika boyunca 3000-5000 × g hızda santrifüjleyin.

* Kunitz üniteleri yaygın olarak DNaz I ölçümü için kullanılmaktadır. 25 °C sıcaklıkta, pH 5,0'da substrat olarak yüksek ölçüde polimerize DNA kullanıldığında A₂₆₀'ta bir mililitre için dakika başına 0,001 artışa yol açan DNaz I miktarı olarak tanımlanmaktadır (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 ve 363).



Kan hücrelerinin tam lizisini ve RNA'nın çökmesini sağlamak için kan örneğinin PAXgene Blood RNA Tube'da (BRT) minimum 2 saat boyunca oda sıcaklığında (15-25°C) inkübe edildiğinden emin olun.



Rotor, yuvarlak tabanlı tüpler için tüp adaptörleri içermelidir. Başka tür tüp adaptörü kullanılırsa tüpler santrifügasyon sırasında kırılabilir.

2. Süpernatanı dekantasyon veya pipetleme yoluyla çıkarın. Pellete 4 mL RNaz İçermeyen Su (RNase-Free Water, RNFW) ekleyin ve tüpü yeni bir sekonder BD Hemogard kapak kullanarak kapatın (kitle birlikte verilir).

Süpernatanın dekantasyonu yapılırsa pelleti bozmamaya dikkat edin ve tüpün kenarını temiz bir kağıt havluyla kurulayın.

3. Pellet görünür şekilde çözüninceye kadar vorteksleyin ve bir sallanan kova rotor kullanarak 10 dakika 3000-5000 x g hızda santrifüjleyin. Süpernatanın tamamını çıkarın ve atın.

Vortekslemeden sonra ancak santrifüjleme işleminden önce süpernatanda az miktarda kalıntı kalması işlemi etkilemeyecektir.



Süpernatanın tam olarak giderilmemesi lizisi önleyecek ve lizati sulandıracaktır. Bu nedenle RNA'nın PAXgene membranına bağlanma koşullarını etkileyecektir.

4. 350 µL resüspanسیون tamponu (BR1) ekleyin ve pellet görünür şekilde çözüninceye kadar vorteksleyin.
5. Örneği 1,5 mL'lik bir MCT'ye pipetleyin. 300 µL bağlama tamponu (BR2) ve 40 µL proteinaz K (PK) ekleyin. 5 saniye boyunca vorteksleyerek karıştırın ve çalkalayıcı-inkübatör kullanarak 10 dakika boyunca 55 °C'de 400-1400 rpm hızda inkübe edin. İnkübasyondan sonra çalkalayıcı-inkübatör sıcaklığını 65°C'ye ayarlayın (adım 20 için).



Örneğe eklemeyen önce bağlama tamponu (BR2) ve proteinaz K'yı (PK) birbirine ekleyerek karıştırmayın.

6. Lizatı doğrudan 2 mL'lik bir PT'ye yerleştirilmiş PSC (eflatun) içine pipetleyin ve maksimum hızda (ancak 20.000 × g üzerinde olmayacak şekilde) 3 dakika santrifüjleyin.



Lizatı dikkatli biçimde döndürme kolonuna (PSC) pipetleyin ve lizatın döndürme kolonuna (PSC) tamamen aktarıldığını görsel olarak kontrol edin.

Kolonların (PSC) ve tüplerin (PT) zarar görmesini önlemek için 20.000 × g hızı geçmeyin.



Bazı örnekler santrifüjleme yapılmadan PSC içinden akabilir. Bunun nedeni bazı örneklerin düşük viskozitesidir ve ürün başarısızlığının bir göstergesi olarak düşünülmemelidir.

7. Akış fraksiyonu süpernatantının tamamını PT'deki pelleti bozmadan yeni bir 1,5 mL'lik MCT'ye dikkatlice aktarın.

8. 350 µL etanol (%96-100 h/h, saflık derecesi p.a.) ekleyin. Vorteksleyerek karıştırın ve tüp kapağının içinden damlaları gidermek için kısa süre santrifüjleyin (500-1000 × g hızda 1-2 saniye).






Santrifüjleme süresi 1-2 saniyeyi geçmemelidir. Aksi takdirde, nükleik asitlerin pellet oluşturması ve total RNA verimlerinin azalması söz konusu olabilir.


9. 2 mL'lik PT'ye yerleştirilmiş PRC'ye (kırmızı) 700 µL örnek pipetleyin ve 8000-20.000 × g hızda 1 dakika boyunca santrifüjleyin. Döndürme kolonunu (PRC) yeni bir 2 mL'lik PT'ye yerleştirin ve akış kısmını içeren eski PT'yi atın.

10. PRC'ye kalan örneği pipetleyin ve 8000-20.000 × g hızda 1 dakika boyunca santrifüjleyin. Döndürme kolonunu (PRC) yeni bir 2 mL'lik PT'ye yerleştirin ve akış kısmını içeren eski PT'yi atın.



Örneği dikkatli biçimde döndürme kolonuna (PRC) pipetleyin ve örneğin döndürme kolonuna (PRC) tamamen aktarıldığını görsel olarak kontrol edin.

11. 350 µL yıkama tamponu 1'i (BR3) PRC'ye pipetleyin. 1 dakika boyunca 8000-20.000 × g hızda santrifüjleyin. Döndürme kolonunu (PRC) yeni bir 2 mL'lik PT'ye yerleştirin ve akış kısmını içeren eski PT'yi atın.
12. 10 µL DNaz I (RNFD) stok solüsyonunu 1,5 mL'lik MCT içerisinde 70 µL DNA parçalama tamponuna (RDD) ekleyin. Tüpe parmağınızla hafifçe vurarak karıştırın ve tüpün yanlarından kalan sıvıyı toplamak için kısa süre santrifüjleyin.
Örneğin, 10 örnek işleniyorsa 100 µL DNaz I (RNFD) stok solüsyonunu 700 µL DNA parçalama tamponuna (RDD) ekleyin. Kitle birlikte verilen 1,5 mL'lik MCT'leri kullanın.
 DNaz I fiziksel denatürasyona özellikle duyarlıdır. Karıştırma sadece tüpe hafifçe vurarak yapılmalıdır. Vortekslemeyin.
13. DNaz I (RNFD) inkübasyon karışımını (80 µL) doğrudan PRC membranına pipetleyin ve masaüstünde (20-30 °C) 15 dakika bekletin.
 DNaz I (RNFD) inkübasyon karışımının doğrudan membran üzerine yerleştirildiğinden emin olun. Karışımın bir kısmı döndürme kolonunun (PRC) duvarları veya O halkasına uygulanırsa ve orada kalırsa DNA parçalanması eksik olacaktır.
14. PRC'ye 350 µL yıkama tamponu 1 (BR3) pipetleyin ve 8000-20.000 × g hızda 1 dakika boyunca santrifüjleyin. Döndürme kolonunu (PRC) yeni bir 2 mL'lik PT'ye yerleştirin ve akış kısmını içeren eski PT'yi atın.
15. PRC'ye 500 µL yıkama tamponu 2 (BR4) pipetleyin ve 8000-20.000 × g hızda 1 dakika boyunca santrifüjleyin. Döndürme kolonunu (PRC) yeni bir 2 mL'lik PT'ye yerleştirin ve akış kısmını içeren eski PT'yi atın.
 Yıkama tamponu 2 (BR4) konsantre olarak sağlanır. Kullanmadan önce yıkama tamponu 2'ye (BR4) etanol eklendiğinden emin olun (bkz "Başlamadan önce yapılacaklar", sayfa 25).
16. 500 µL daha yıkama tamponu 2'yi (BR4) PRC'ye ekleyin. 8000-20.000 × g hızda 3 dakika santrifüjleyin.

17. Akış kısmını içeren PT'yi atın ve PRC'yi yeni bir 2 mL'lik PT'ye yerleştirin. 8000-20.000 × g hızda 1 dakika santrifüjleyin.
18. Akış kısmını içeren PT'yi atın. PRC'yi 1,5 mL'lik bir MCT'ye yerleştirin ve 40 µL elüsyon tamponunu (BR5) doğrudan PRC membranına pipetleyin. RNA elüsyonu için 1 dakika boyunca 8000-20.000 × g hızda santrifüjleyin.
- Maksimum elüsyon etkinliğini elde etmek için tüm membranı elüsyon tamponu (BR5) ile ıslatmak önemlidir.
19. Elüsyon adımını (adım 18) açıklandığı gibi, 40 µL elüsyon tamponu (BR5) ve aynı MCT'yi kullanarak tekrarlayın.
20. Elüatı çalkalayıcı-inkübatörde (adım 5'ten) 5 dakika boyunca 65°C'de sallamadan inkübe edin. İnkübasyondan sonra hemen buz üzerinde soğutun.
-  Bu 65°C'deki örnek inkübasyonu RNA'yı aşağı yönde uygulamalar için denatüre eder. Aşağı yönde uygulamaya bir ısı denatürasyonu adımı dahil olsa da bu adımı atlamayın. Aşağı yönde uygulamalarda maksimum etkinlik sağlamak için bu aşamada yeterli RNA denatürasyonu son derece önemlidir.
- İnkübasyon süresi veya sıcaklığını geçmeyin.
21. RNA örnekleri hemen kullanılmayacaksa -20°C veya -70°C'de saklayın.
- RNA tekrarlanan dondurma ve çözme sonrasında denatüre durumda kaldığından inkübasyonu 65°C'de tekrarlamak gerekmez. RNA örnekleri tanı amaçlı bir tahlilde kullanılıyorsa üreticinin sağladığı talimatları izleyin.
- RNA'nın 260 nm'de absorpsiyon ile doğru kantifikasyonu için örneklerin 10 mM Tris-HCl ile pH 7,5'de seyreltilmesini öneririz.* Örneği RNaz İçermeyen Suda seyreltmek yanlış olarak düşük değerlere neden olabilir.
- Spektrofotometriyi ölçülecek örneklerle aynı oranda elüsyon tamponu (BR5) ve Tris-HCl tamponundan oluşan bir kör kullanarak sıfırlayın. Elüsyon tamponunun (BR5) 220 nm'de yüksek absorpsiyonu vardır ve bu durum, spektrofotometre uygun şekilde sıfırlanmazsa yüksek arka plan absorpsiyon seviyelerine yol açabilir.

* Kimyasallarla çalışırken her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için ürün tedarikçisinden temin edilebilecek uygun güvenlik veri sayfalarına (Safety Data Sheet, SDS) başvurun.



Tris HCl tamponunda kantifikasyon için $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g}/\text{mL}$ ilişkisini kullanın. Bkz Ek B, sayfa 78.

22. Tamponlar ve RNaz içermeyen suyun bulunduğu tüm şişeleri, enzimler ve enzim tamponlarının bulunduğu şişeleri ve tüpleri ve protokol için kullanılan kitten plastik malzemelerin bulunduğu torbaları yeniden kapatın. Kitin kalan içeriğini sonraki kullanıma kadar "Reaktif Saklama ve Kullanma" (sayfa 22) ve "Kullanımda stabilite" (sayfa 22) bölümlerinde açıklandığı şekilde saklayın.

Protokol: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) İçinde Toplanan İnsan Tam Kanından Total RNA'nın Otomatik İzolasyonu

Başlamadan önce önemli noktalar

- Kit kutusunun sağlam ve hasarsız olduğundan ve tamponların sızmamış olduğundan emin olun. Hasarlı bir kiti kullanmayın.
- Bir pipet kullanırken doğru hacme ayarlandığından ve sıvının dikkatli ve tam olarak aspire edilip dağıtıldığından emin olun.
- Örneklerin yanlış tüplere ve plastik sarf malzemelerine aktarımını önlemek için tüm PT'lerin, MCT'lerin ve rotor adaptörlerinin silinmez bir kalemle uygun şekilde etiketlendiğinden emin olun. Her MCT'nin kapağını ve gövdesini, her PT'nin gövdesini ve her rotor adaptörünün dış duvarını etiketleyin.
- Prosedür sırasında örnekler ve tamponların dökülmesi RNA verimi ve saflığını azaltabilir.
- Aksi belirtilmediği sürece bu protokolün santrifüj adımları dahil olmak üzere tüm adımları oda sıcaklığında (15-25°C) gerçekleştirilmelidir.

Nükleik asit amplifikasyonu teknolojilerinin duyarlılığı nedeniyle örneklerin muamelesi sırasında çapraz kontaminasyondan kaçınmak için şu önlemler gereklidir:

- Örneği tüp kenarını ıslatmadan tüpün en altında olacak şekilde PT'nin içine dikkatle pipetleyin.
- Sıvı transferleri arasında daima pipet uçlarını değiştirin. Aerosol bariyerli pipet uçları kullanın.
- Döndürme kolunu (PSC, PRC) membranına pipet ucu ile dokunmaktan kaçının.
- Bir MCT'yi vorteksledikten veya ısıttıktan sonra kapağın içindeki damlaları gidermek için kısa süre santrifüjleyin.

- Tüm prosedür boyunca eldiven kullanın. Eldivenler ile örneğin teması durumunda eldivenleri hemen değiştirin.

Başlamadan önce yapılacaklar

- Kan, *PAXgene Blood RNA Tube El Kitabı* belgesinde yer alan talimatlar doğrultusunda PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) içinde toplanmalıdır. Gerekirse PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) kullanımı hakkında öneriler için Ek C'ye (sayfa 80) bakın.
- Kan hücrelerinin tam lizisini ve RNA'nın çökmesini sağlamak için PAXgene Blood RNA Tubes'un (BRT), kan toplandıktan sonra en az 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildiğinden emin olun. PAXgene Blood RNA Tube'un (BRT) bir gece boyunca inkübe edilmesi verimleri artırabilir. PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kan toplandıktan sonra 2-8 °C, -20 °C veya -70 °C'de saklanmışsa önce oda sıcaklığına dengeleyin ve ardından prosedüre başlamadan önce 2 saat boyunca oda sıcaklığında saklayın.
- Sayfa 18 içindeki güvenlik bilgilerini okuyun.
- "Önemli Notlar", sayfa 58 kısmını okuyun.
- RNA kullanımıyla ilgili kılavuz ilkeleri okuyun (Ek A, sayfa 77).
- İlgili QIAcube Connect MDx Kullanım Kılavuzunu ve cihazla birlikte verilen tüm ek bilgileri güvenlik bilgilerine özellikle dikkat ederek okuyun.
- Pipetler ve QIAcube Connect MDx gibi cihazların ve aygıtların üreticinin önerilerine göre düzenli olarak kontrol ve kalibre edildiğinden emin olun.
- Bağlama tamponu (BR2) saklama halinde bir çökelti oluşturabilir. Gerekirse çözmek için 37°C'ye ısıtın.
- Yıkama tamponu 2 (BR4) konsantre olarak sağlanır. İlk defa kullanmadan önce bir çalışma solüsyonu elde etmek için şişede belirtildiği üzere uygun hacimde etanol (%96-100 h/h, saflık derecesi p.a.) ekleyin.

- RNase-Free DNase Set ilk kez kullanılacaksa DNaz I stok solüsyonu hazırlayın. Katı DNaz I'yı (RNFD; 1500 Kunitz birimi)* set ile sağlanan DNaz resüspanسیون tamponunun (DRB) 550 µL'si içinde çözün. Şişeyi açarken DNaz I (RNFD) kaybedilmediğinden emin olun. Sulandırılmış DNaz I'yı (RNFD) vortekslemeyin. DNaz I fiziksel denatürasyona özellikle duyarlıdır. Karıştırma sadece şişenin yavaşça tersine çevrilmesi ile gerçekleştirilmelidir.
- Sulandırılmış DNaz I (RNFD), orijinal cam şişesinde 2-8 °C'de (stok solüsyonu) ya da stok solüsyonu cam şişeden çıkarılıp tek kullanımlık alikotlara ayrıldıktan sonra (kitle birlikte verilen 1,5 mL'lik MCT'yi kullanın; 5 alikot için yeterli sayıda mevcuttur) -20 °C'de saklanabilir. Çözdürülmüş alikotlar 2-8°C'de saklanabilir. Alikotları çözdürdükten sonra yeniden dondurmayın.
- DNaz I (RNFD) sulandırma ve alikot oluşturma sırasında, RNA kullanımına yönelik kılavuz ilkeleri izlediğinizden emin olun (Ek A, sayfa 77).
- Doğru çalkalayıcı adaptörünü takın (QIAcube Connect MDx ile birlikte verilir; 2 mL güvenli kilit tüpleri için adaptörü kullanın, "2" ile işaretlenmiştir) ve çalkalayıcı rafını adaptörün üstüne koyun.
- Atık çekmecesini kontrol edin ve gerekirse boşaltın.
- Daha önceki çalışmalar için yapılmadıysa tüm ilgili protokolleri yükleyin. QIAcube Connect MDx, ilgili zip dosyasında bulunan tüm protokollerin indirilmesini gerektirir. Bkz. "QIAcube Connect MDx'e protokol kurulumu", sayfa 60.

Prosedür

1. QIAcube Connect MDx kapağını kapatın ve cihazı güç anahtarıyla açın (bkz. Şekil 15, sayfa 59).

Bir bip sesi duyulur ve başlangıç ekranı görülür. Cihaz otomatik olarak başlatma testlerini gerçekleştirir.

* Kunitz üniteleri yaygın olarak DNaz I ölçümü için kullanılmaktadır. 25°C sıcaklıkta, pH 5,0'da substrat olarak yüksek ölçüde polimerize DNA kullanıldığında A₂₆₀'ta bir mililitre için dakika başına 0,001 artışa yol açan DNaz I miktarı olarak tanımlanmaktadır (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 ve 363).

2. QIAcube Connect MDx kapağını açın ve gerekli reaktifleri ve plastik malzemeleri cihaza yükleyin. Bkz. "QIAcube Connect MDx'i yükleme", sayfa 61.

Zamandan tasarruf etmek için, yükleme sonraki 10 dakikalık santrifüjleme adımlarının (adım 3 ve 5) biri veya her ikisi sırasında yapılabilir.

3. PAXgene Blood RNA Tube'u (BRT) sallanan kova rotor kullanarak 10 dakika boyunca 3000-5000 × g hızda santrifüjleyin.



Kan hücrelerinin tam lizisini ve RNA'nın çökmesini sağlamak için kan örneğinin PAXgene Blood RNA Tube'da (BRT) minimum 2 saat boyunca oda sıcaklığında (15-25°C) inkübe edildiğinden emin olun.



Rotor, yuvarlak tabanlı tüpler için tüp adaptörleri içermelidir. Başka tür tüp adaptörü kullanılırsa tüpler santrifügasyon sırasında kırılabilir.

4. Süpernatanı dekantasyon veya pipetleme yoluyla çıkarın. Süpernatanın dekantasyonu yapılırsa pelleti bozmamaya dikkat edin ve tüpün kenarını temiz bir kağıt havluyla kurulayın. Pellete 4 mL RNaz İçermeyen Su (RNase-Free Water, RNFw) ekleyin ve tüpü yeni bir sekonder BD Hemogard kapak kullanarak kapatın (kitle birlikte verilir).

5. Pellet görünür şekilde çözününceye kadar vorteksleyin ve bir sallanan kova rotor kullanarak 10 dakika 3000-5000 × g hızda santrifüjleyin. Süpernatanın tamamını çıkarın ve atın.

Vortekslemeden sonra ancak santrifüjleme işleminden önce süpernatanda az miktarda kalıntı kalması işlemi etkilemeyecektir.



Süpernatanın tam olarak giderilmemesi lizisi önleyecek ve lizati sulandıracaktır. Bu nedenle RNA'nın PAXgene membranına bağlanma koşullarını etkileyecektir.

6. 350 µL resüpsansiyon tamponu (BR1) ekleyin ve pellet görünür şekilde çözününceye kadar vorteksleyin.

7. Örneği 2 mL'lik bir PT'ye pipetleyin.



PAXgene Blood RNA Kit ile verilen 2 mL'lik PT'leri kullanın.

8. Örneği içeren açık PT'leri QIAcube Connect MDx çalkalayıcısına yükleyin (bkz. Şekil 18, sayfa 63). Örnek pozisyonları yükleme kolaylığı açısından numaralandırılmıştır. Her PT'nin yanındaki çalkalayıcı rafının kenarındaki yuvalar içine çalkalayıcı rafı tıkaçları (QIAcube Connect MDx ile birlikte verilir) yerleştirin. Bunlar örneklerin yükleme kontrolü sırasında saptanmasını mümkün kılar.



Doğru çalkalayıcı adaptörünün (Çalkalayıcı Adaptörü, 2 mL, güvenli kilit tüpleri, "2" ile işaretlenmiştir, QIAcube Connect MDx ile birlikte verilir) takıldığından emin olun.



12'den az örnek işleniyorsa çalkalayıcı rafını Şekil 22, sayfa 67 içinde gösterildiği gibi yüklediğinizden emin olun. Bir (1) veya 11 örnek işlenemez. Çalkalayıcı rafındaki pozisyon numaraları, santrifüjdeki pozisyon numaralarına karşılık gelir.

9. QIAcube Connect MDx kapağını kapatın (bkz. Şekil 15, sayfa 59).

10. "PAXgene Blood RNA Part A" protokolünü seçin ve protokolü başlatın.

QIAcube Connect MDx dokunmatik ekranında verilen talimatları izleyin.



Her iki program bölümünün (bölüm A ve bölüm B) QIAcube Connect MDx'e kurulu olduğundan emin olun (bkz. "QIAcube Connect MDx'e protokol kurulumu", sayfa 60).



Cihaz örnekler, uçlar, rotor adaptörleri ve reaktif şişeleri için yükleme kontrolleri gerçekleştirir.

11. "PAXgene Blood RNA Part A" protokolü bittikten sonra QIAcube Connect MDx kapağını açın (bkz. Şekil 15, sayfa 59). PRC'yi rotor adaptörlerinden ve boş PT'leri çalkalayıcıdan çıkarın ve atın.



Çalışma sırasında döndürme kolonları, rotor adaptörü pozisyonu 1'den (kapak pozisyonu L1) rotor adaptörü pozisyonu 3'e (kapak pozisyonu L2) cihaz tarafından aktarılır (bkz. Şekil 20, sayfa 65).

12. Rotor adaptörlerinde saflaştırılmış RNA içeren tüm 1,5 mL'lik MCT'lerin kapaklarını kapatın (pozisyon 3, kapak pozisyonu L3, bkz. Şekil 20, sayfa 65). 1,5 mL'lik MCT'leri QIAcube Connect MDx çalkalayıcı adaptörüne aktarın (bkz. Şekil 18, sayfa 63).
13. QIAcube Connect MDx kapağını kapatın (bkz. Şekil 15, sayfa 59).
14. "PAXgene Blood RNA Part B" protokolünü seçin ve protokolü başlatın.

QIAcube Connect MDx dokunmatik ekranında verilen talimatları izleyin.



Bu program örnekleri 65°C'de inkübe eder ve RNA'yı aşağı yönde uygulamalar için denatüre eder. Aşağı yönde uygulamaya bir ısı denatürasyonu adımı dahil olsa da bu adımı atlamayın. Aşağı yönde uygulamalarda maksimum etkinlik sağlamak için bu aşamada yeterli RNA denatürasyonu son derece önemlidir.

15. "PAXgene Blood RNA Part B" programı bittikten sonra QIAcube Connect MDx kapağını açın (bkz. Şekil 15, sayfa 59). Saflaştırılmış RNA içeren MCT'leri hemen buz üstüne yerleştirin.



UYARI: Sıcak yüzey. Çalkalayıcı 70°C'ye (158°F) kadar sıcaklıklara ulaşabilir. Sıcakken dokunmaktan kaçınınız.



Saflaştırılmış RNA'nın QIAcube Connect MDx içinde kalmasına izin vermeyin. Örnekler soğutulmadığından saflaştırılmış RNA degrade olabilir. Bu nedenle başında beklenmeyen gece örnek hazırlama çalışmaları önerilmez.

16. RNA örnekleri hemen kullanılmıyacaksa -20°C veya -70°C'de saklayın.

RNA tekrarlanan dondurma ve çözmeden sonra denatüre durumda kaldığından ısı inkübasyonu protokolünü ("PAXgene Blood RNA Part B") tekrarlamak gerekmez. RNA örnekleri diagnostik bir tahlilde kullanılacaksa üretici tarafından sağlanan talimatları izleyin.

RNA'nın 260 nm'de absorbans ile doğru kantifikasyonu için örneklerin 10 mM Tris-HCl ile pH 7,5'de seyreltilmesini öneririz.* Örneği RNaz İçermeyen Suda seyreltmek yanlış olarak düşük değerlere neden olabilir.

Spektrofotometreyi ölçülecek örneklerle aynı oranda elüsyon tamponu (BR5) ve Tris-HCl tamponundan oluşan bir kör kullanarak sıfırlayın. Elüsyon tamponunun (BR5) 220 nm'de yüksek absorbansı vardır ve bu durum, spektrofotometre uygun şekilde sıfırlanmazsa yüksek arka plan absorbans seviyelerine yol açabilir.



Tris-HCl tamponunda kantifikasyon için şu ilişkiyi kullanın:

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/mL}$. Bkz Ek B, sayfa 78.

17. Reaktif şişe rafını QIAcube Connect MDx çalışma tablasından (bkz. Şekil 18, sayfa 63) çıkarın ve tüm reaktif şişelerini uygun etiketli kapaklarla kapatın. Tamponlar ve RNaz içermeyen suyun bulunduğu tüm şişeleri, enzimler ve enzim tamponlarının bulunduğu şişeleri ve tüpleri ve protokol için kullanılan kitten plastik malzemelerin bulunduğu torbaları yeniden kapatın. Kitin kalan içeriğini ve reaktif şişelerini sonraki kullanıma kadar "Reaktif Saklama ve Kullanma" (sayfa 22) ve "Kullanımda stabilite" (sayfa 22) bölümlerinde açıklandığı şekilde saklayın. QIAcube Connect MDx MCT yuvalarında, PT'lerde kalan reaktifleri çıkarın ve atın. Rotor adaptörlerini santrifüjden çıkarın ve atın. QIAcube Connect MDx atık çekmecesini boşaltın (bkz. Şekil 15, sayfa 59). Cihaz kapağını kapatın ve cihazı güç anahtarıyla kapatın.

* Kimyasallarla çalışırken her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için ürün tedarikçisinden temin edilebilecek uygun güvenlik veri sayfalarına (Safety Data Sheet, SDS) başvurun.

Ürün Kullanımı Sınırlamaları

PAXgene Blood RNA Kit'in in vitro tanı amaçlı uygulamalarda insan tam kanından ($4,8 \times 10^6$ - $1,1 \times 10^7$ lökosit/mL) intraselüler RNA'nın izolasyonu için kullanılması amaçlanmıştır. İnsan tam kanından genomik DNA'nın veya viral nükleik asitlerin izolasyonu için değildir. Stabilizasyon spesifikasyonları için doğrulanmış sınırlı sayıda transkript bulunması nedeniyle (FOS ve IL1B gen transkriptleri) performans özellikleri tüm transkriptler için belirlenmemiştir. Kullanıcılar diğer transkriptler için doğrulama gerekip gerekmediğini belirlemek üzere üretici verilerini ve kendi verilerini gözden geçirmelidir. Kit bileşenleri yalnızca, bu kullanım talimatlarında açıklanan manuel ve otomatik protokolda kullanıma yöneliktir.

PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) kullanımı hakkında bilgi için *PAXgene Blood RNA Tube El Kitabı* belgesine bakın.

Kalite Kontrol

QIAGEN'in ISO Sertifikalı Kalite Yönetim Sistemine uygun olarak, her bir PAXgene Blood RNA Kit lotu, tutarlı ürün kalitesinin temin edilmesi için önceden belirlenmiş spesifikasyonlara göre test edilmiştir.

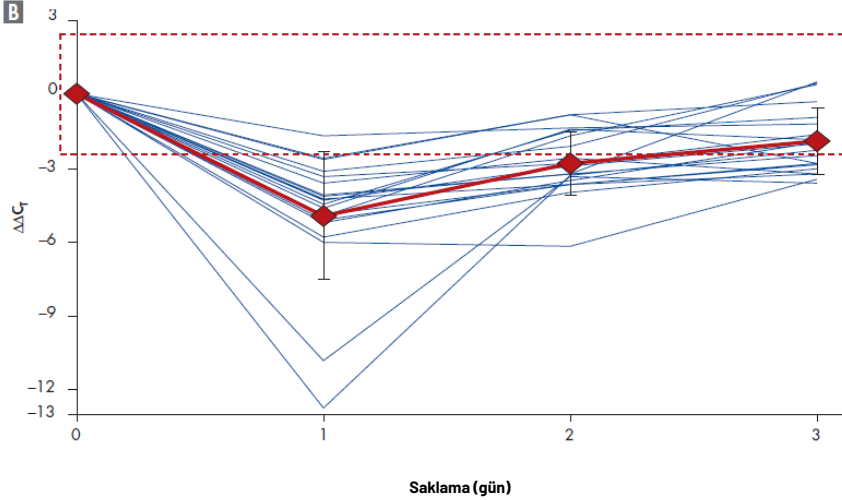
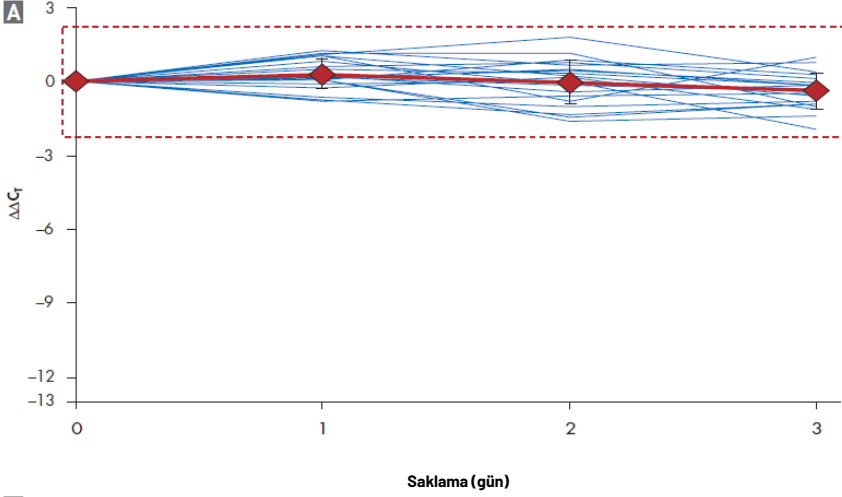
Performans Özellikleri

Örnek toplama ve stabilizasyonu

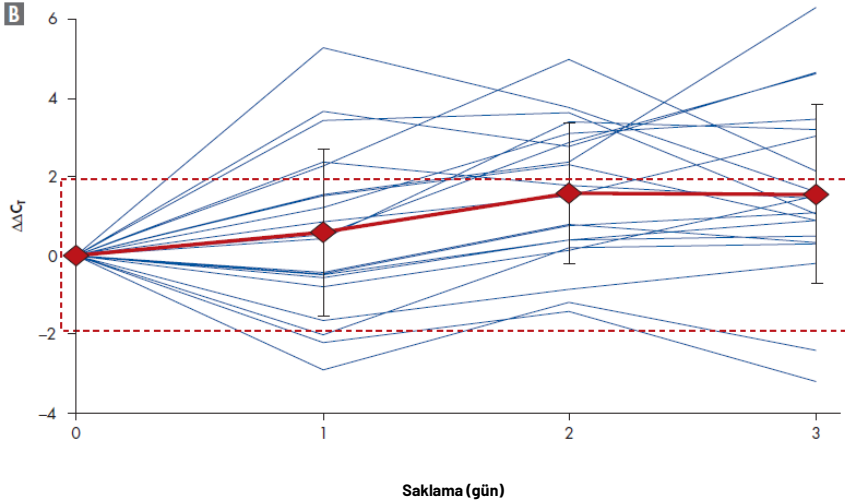
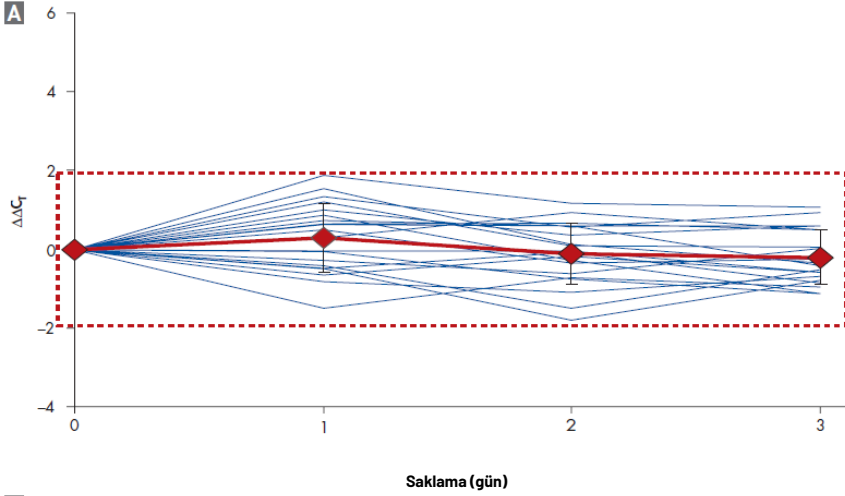
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), tescilli bir RNA stabilizasyon reaktifi içerir. Bu katkı maddesi, RNA moleküllerini RNazlar tarafından degradasyondan korur ve gen ekspresyonunda ex vivo değişiklikleri minimuma indirir. PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), insan tam kanının toplanmasına ve 18-25°C'de 3 güne kadar (sırasıyla Şekil 4 ve Şekil 5, sayfa 41 ve 42) veya 2-8°C'de 5 güne kadar (Şekil 6 ve Şekil 7, sayfa 43 ve 44) hücresel RNA stabilizasyonu için kullanıma yöneliktir. Ayrıca, stabilize kan dondurulmuş halde saklanabilir. Mevcut veriler, hücresel RNA'nın -20 °C veya -70 °C*'de en az 11 yıl boyunca stabil olduğunu göstermektedir. Daha uzun süreli stabilite değerlendirmesinin yapıldığı devam eden çalışmalar hakkında daha fazla bilgi için lütfen www.preanalytix.com adresini ziyaret edin veya QIAGEN Teknik Servisleri ile iletişime geçin.

RNA stabilizasyonunun fiili süresi hücresel RNA'nın türüne ve kullanılan aşağı yönde uygulamaya göre değişebilir. Stabilizasyon spesifikasyonları için doğrulanmış sınırlı sayıda transkript bulunması nedeniyle (FOS ve IL1B gen transkriptleri) performans özellikleri tüm transkriptler için belirlenmemiştir. Kullanıcılar diğer transkriptler için doğrulama gerekip gerekmediğini belirlemek üzere üretici verilerini ve kendi verilerini gözden geçirmelidir.

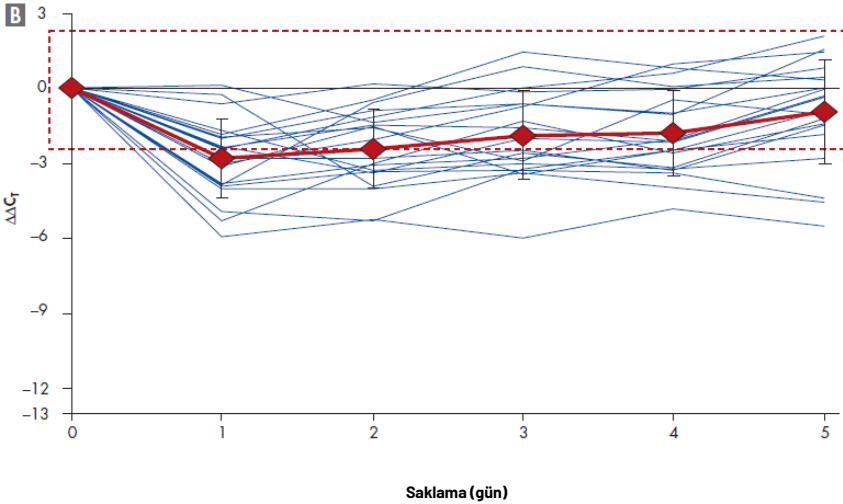
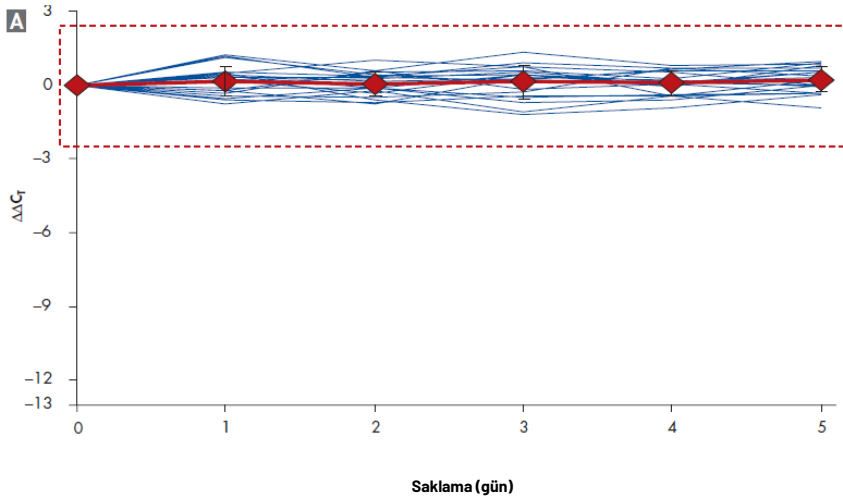
*PAXgene Blood RNA Tubes'da kan saklamaya ilişkin uzun dönemli bir çalışma devam etmektedir.



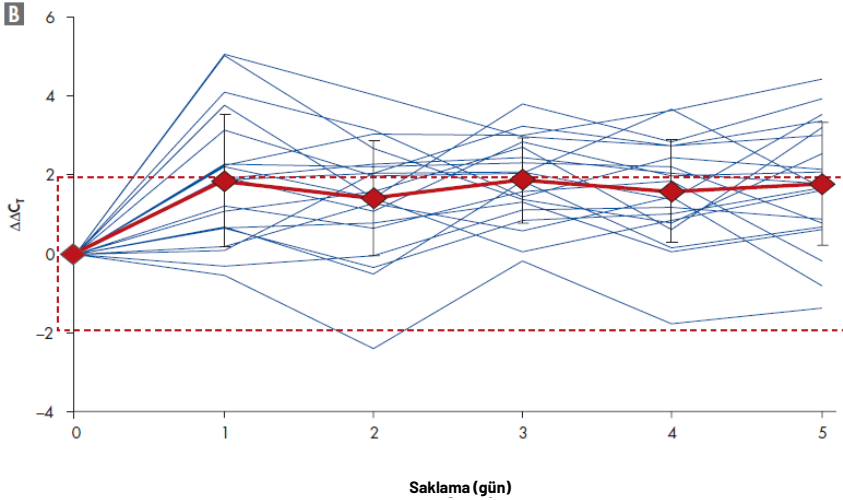
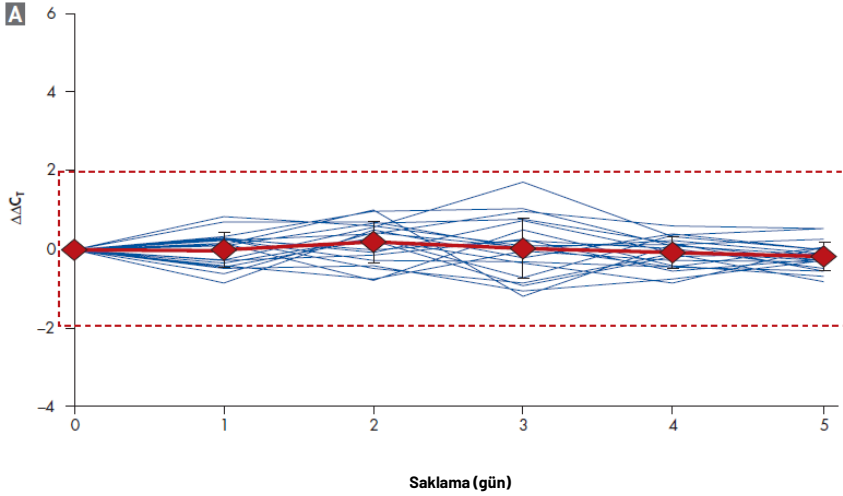
Şekil 4: 18-25°C'deki kan örneklerinde RNA stabilitesi: FOS. Kan, ikişer örnek halinde görünürde sağlıklı 10 donörden alınmış, belirtilen gün sayısı kadar 18-25°C'de saklanmış ve ardından total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. **[A]** Kan, PAXgene Blood RNA Tubes'da (BRT) toplanmış ve saklanmış ve total RNA, PAXgene Blood RNA Kit kullanılarak saflaştırılmıştır. **[B]** Kan, antikoagülan olarak EDTA içeren standart kan toplama tüplerinde toplanmış ve saklanmış ve total RNA, silika membran bazlı RNA temizlemeyle standart organik izolasyon yöntemi kullanılarak saflaştırılmıştır. FOS için relatif transkript seviyeleri, dahili standart olarak 18S rRNA kullanılarak gerçek zamanlı dupleks RT-PCR ile belirlenmiştir. Tüm örnekler için değerler, gösterilen tüm örneklerin ortalamaları ve standart sapmaları ile grafiğe dökmüştür. Kesik çizgiler tahlilin $\pm 3\times$ kesinliğine işaret etmektedir ($2,34 C_t$).



Şekil 5: 18-25°C'deki kan örneklerinde RNA stabilitesi: IL1B. Kan alınmış ve Şekil 4'de açıklandığı şekilde 18-25°C'de saklama sonrasında total RNA saflaştırılmıştır. IL1B'nin relatif transkript seviyeleri, dahili standart olarak 18S rRNA kullanılarak gerçek zamanlı dupleks RT-PCR ile belirlenmiştir. Tüm örnekler için değerler, gösterilen tüm örneklerin ortalamaları ve standart sapmaları ile grafiğe dökülmüştür. Kesik çizgiler tahilin $\pm 3\times$ keskinliğine işaret etmektedir ($1,93 C_t$).



Şekil 6: 2-8°C'deki kan örneklerinde RNA stabilitesi: FOS. Kan, ikişer örnek halinde 10 donörden alınmış, belirtilen gün sayısı kadar 2-8°C'de saklanmış ve ardından total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. **[A]** Kan, PAXgene Blood RNA Tubes'da (BRT) toplanmış ve saklanmış ve total RNA, PAXgene Blood RNA Kit kullanılarak saflaştırılmıştır. **[B]** Kan, antikoagülan olarak EDTA içeren standart kan toplama tüplerinde toplanmış ve saklanmış ve total RNA, silika membran bazlı RNA temizlemeyle standart organik izolasyon yöntemi kullanılarak saflaştırılmıştır. FOS için relatif transkript seviyeleri, dahili standart olarak 18S rRNA kullanılarak gerçek zamanlı dupleks RT-PCR ile belirlenmiştir. Tüm örnekler için değerler, gösterilen tüm örneklerin ortalamaları ve standart sapmaları ile grafiğe dökülmüştür. Kesik çizgiler tahlilin $\pm 3\times$ kesinliğine işaret etmektedir (2,34 C₊).



Şekil 7: 2-8°C'deki kan örneklerinde RNA stabilitesi: IL1B. Kan alınmış ve Şekil 6'da açıklandığı şekilde 2-8°C'de saklama sonrasında total RNA saflaştırılmıştır. IL1B'nin relatif transkript seviyeleri, dahili standart olarak 18S rRNA kullanılarak gerçek zamanlı dupleks RT-PCR ile belirlenmiştir. Tüm örnekler için değerler, gösterilen tüm örneklerin ortalamaları ve standart sapmaları ile grafiğe dökülmüştür. Kesik çizgiler tahilin $\pm 3\times$ kesinliğine işaret etmektedir (1,93 C₁).

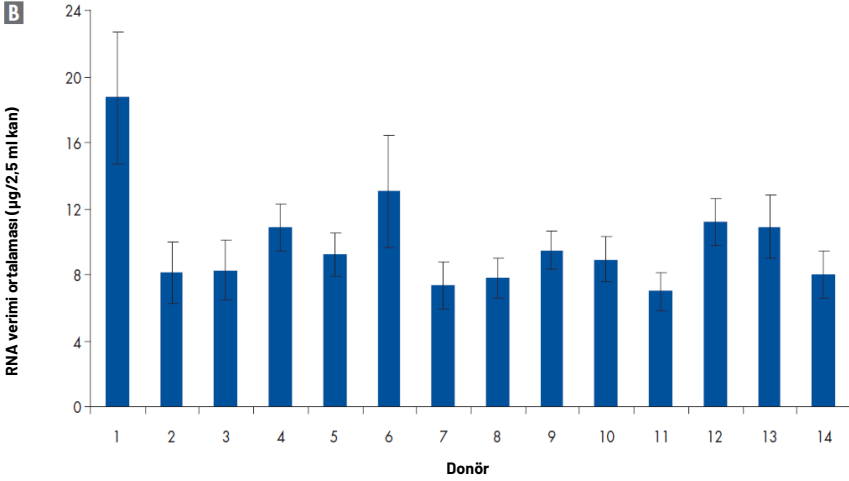
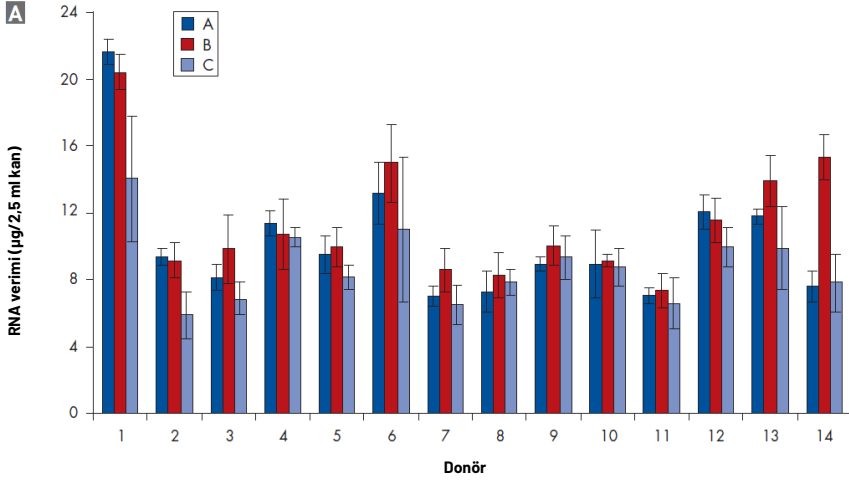
Manuel RNA izolasyonu

PAXgene Blood RNA System kullanılarak izole edilen total RNA saftır. Manuel protokol kullanılarak, beta aktin geninin bir sekansının kantitatif ve real-time PCR işlemiyle ölçüldüğü şekilde, A_{260}/A_{280} değerlerinin 1,8 ile 2,2 arasında olduğu ve tüm örneklerin $\geq\%95$ 'inde $\leq\%1$ (a/a) genomik DNA bulunduğu belirlenmiştir. RT-PCR reaksiyon hacminin $\%30$ 'una kadarını elüat oluşturduğunda örneklerin en az $\%95$ 'i RT-PCR'de inhibisyon göstermemektedir.

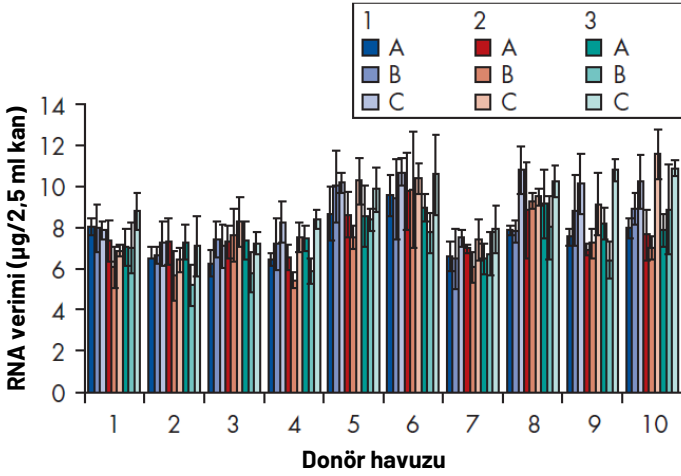
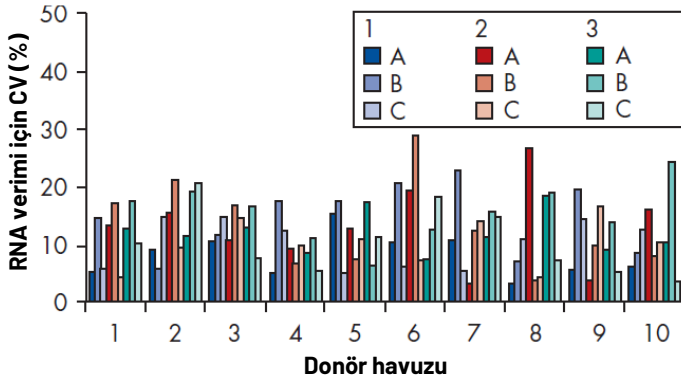
Manuel protokol kullanılarak, ortalama örnek hazırlama süresi (12 örnek hazırlama çalışmasından verilere dayalı olarak) yaklaşık 90 dakika olmaktadır* ve bunun sadece 40 dakikası orada bulunmayı gerektirir. 2,5 mL sağlıklı insan tam kanından RNA verimi, işlenen örneklerin $\geq\%95$ 'i için $\geq 3 \mu\text{g}$ değerindedir. Verimler donöre yüksek ölçüde bağımlı olduğundan bireysel verimler farklılık gösterebilir. Ayrı donörler için PAXgene Blood RNA System yüksek ölçüde yeniden üretilebilir ve tekrarlanabilir verimler (sırasıyla Şekil 8 ve Şekil 9, sayfa 46 ve 47) ve yeniden üretilebilir ve tekrarlanabilir RT-PCR (sırasıyla Şekil 10 ve Şekil 11, sayfa 52 ve 53) sağlar ve böylece klinik tanı amaçlı testler için yüksek ölçüde güçlüdür.

Şekil 8 (sayfa 46), PAXgene Blood RNA System'in genel tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirliğini göstermektedir. Farklı PAXgene Blood RNA Kit lotları ve farklı operatörlerin, RNA veriminin ve gerçek zamanlı RT-PCR performansının yeniden üretilebilirliği üzerindeki etkisini göstermek üzere ek çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar için ayrı PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) yerine birleştirilmiş kan örnekleri kullanıldığından sonuçlar, sistemin ayrı kan alımları arasındaki oynama dahil olmak üzere tekrarlanabilirliğini yansıtmaz ve sadece örnek hazırlamanın tekrarlanabilirliğini yansıtır (bkz. Şekil 9, sayfa 47).

* PAXgene Blood RNA Tubes başlangıç işlemleri (santrifüjleme işlemleri, pellet yıkama ve pellet resüspansiyonu) dahil olmak üzere toplam protokol çalışma süresi.



Şekil 8: Yeniden üretilebilir ve tekrarlanabilir RNA izolasyonu. 14 donörden dördü kan örnekleri, 3 teknisyenin (A, B, C) her biri tarafından manuel olarak işlenmiştir. Üç ekipman seti kullanılmış ve tek bir teknisyen tarafından hazırlanan tüm örnekler aynı ekipman kullanılarak işlenmiştir. [A] Aynı donörlerden ve farklı teknisyenlerle replikat örnek başına RNA veriminin ortalaması ve standart sapmaları gösterilmiştir. [B] 14 donörün her birinden on iki replikat kan örneği, 3 farklı teknisyen tarafından işlenmiştir. Aynı donörlerden ve tüm teknisyenlerin işlediği örneklerin RNA veriminin ortalamaları ve standart sapmaları sunulmaktadır. Tüm RNA örnekleri için A_{280}/A_{260} oranları 1,8 ile 2,2 arasında değişmiştir.

A**B**

Şekil 9: Birleştirilmiş kan örnekleri kullanılarak farklı operatörler ve PAXgene Blood RNA Kit lotları için RNA veriminin **tekrarlanabilirliği ve yeniden üretilebilirliği**. 30 farklı donörden kan örnekleri, PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, donör başına 12 tüp, toplamda 360 tüp) içinde toplanmıştır. 3 donörden tüplerin içeriği birleştirilmiş ve sonra 36 örneğe tekrar bölünmüştür. 3 donör havuzu başına bu 36 örnek, 3 farklı operatör tarafından manuel olarak işlenmiştir. Her bir operatör, RNA izolasyonu için 3 farklı PAXgene Blood RNA Kit lotu kullanmış ve 10 donör havuzunun her birinden dörtlü örnekleri işlemiştir. **[A]** Her operatör-lot kombinasyonu için RNA verimi ve standart sapma. 10 donör havuzundan dörtlü kan örnekleri, 3 farklı operatör (A, B, C) tarafından 3 kit lotunun (1, 2, 3) her biri ile işlenmiştir. Aynı donör havuzundan farklı operatör ve farklı kit lotu için dörtlü örnek başına ortalama verimler (kolonlar) ve standart sapmalar (hata çubukları) sunulmaktadır. **[B]** Tüm operatör-lot kombinasyonları (A, B, C; 1, 2, 3) için ortalama verim ile verimin standart sapmasından hesaplandığı şekilde donör havuzu başına RNA veriminin CV'si Şekil 9A'da gösterilmiştir.

Tablo 1A: Seçilen donör havuzları (1, 6, 9, 10) için her lot içinde ve her kullanıcı içinde yeniden üretilebilirlik

| Verilerin kombinasyonu | Donör havuzu 1 ($5,1 \times 10^6$ hücre/mL) | | | Donör havuzu 6 ($6,5 \times 10^6$ hücre/mL) | | |
|------------------------|--|----------------------|--------|--|----------------------|--------|
| | Ortalama verim (μg) | SS (μg) | CV (%) | Ortalama verim (μg) | SS (μg) | CV (%) |
| Lot 1, kullanıcı A | 8,03 | 0,42 | 5 | 9,55 | 0,99 | 10 |
| Lot 1, kullanıcı B | 7,98 | 1,17 | 15 | 9,38 | 1,94 | 21 |
| Lot 1, kullanıcı C | 7,87 | 0,45 | 6 | 10,71 | 0,65 | 6 |
| Lot 2, kullanıcı A | 7,32 | 0,98 | 13 | 9,78 | 1,89 | 19 |
| Lot 2, kullanıcı B | 6,09 | 1,04 | 17 | 9,82 | 2,83 | 29 |
| Lot 2, kullanıcı C | 6,87 | 0,31 | 4 | 10,37 | 0,74 | 7 |
| Lot 3, kullanıcı A | 7,04 | 0,90 | 13 | 8,96 | 0,68 | 8 |
| Lot 3, kullanıcı B | 6,98 | 1,22 | 17 | 7,73 | 0,97 | 13 |
| Lot 3, kullanıcı C | 8,78 | 0,89 | 10 | 10,59 | 1,94 | 18 |
| | Donör havuzu 9 ($8,4 \times 10^6$ hücre/mL) | | | Donör havuzu 10 ($10,2 \times 10^6$ hücre/mL) | | |
| | Ortalama verim (μg) | SS (μg) | CV (%) | Ortalama verim (μg) | SS (μg) | CV (%) |
| Lot 1, kullanıcı A | 7,52 | 0,41 | 6 | 7,96 | 0,49 | 6 |
| Lot 1, kullanıcı B | 8,82 | 1,72 | 19 | 8,90 | 0,76 | 9 |
| Lot 1, kullanıcı C | 10,14 | 1,46 | 14 | 10,22 | 1,29 | 13 |
| Lot 2, kullanıcı A | 6,92 | 0,27 | 4 | 7,63 | 1,23 | 16 |
| Lot 2, kullanıcı B | 7,20 | 0,71 | 10 | 7,00 | 0,56 | 8 |
| Lot 2, kullanıcı C | 9,14 | 1,52 | 17 | 11,56 | 1,21 | 10 |
| Lot 3, kullanıcı A | 8,18 | 0,76 | 9 | 7,85 | 0,82 | 10 |
| Lot 3, kullanıcı B | 6,41 | 0,88 | 14 | 8,88 | 2,17 | 24 |
| Lot 3, kullanıcı C | 10,78 | 0,56 | 5 | 10,88 | 0,37 | 3 |

Tablo 1B: Seçilen donör havuzları (1, 6, 9, 10) için her kullanıcı içinde ve tüm lotlar arasında yeniden üretilebilirlik

| Verilerin kombinasyonu | Donör havuzu 1 ($5,1 \times 10^6$ hücre/mL) | | | Donör havuzu 6 ($6,5 \times 10^6$ hücre/mL) | | |
|-------------------------|--|----------------------|--------|--|----------------------|--------|
| | Ortalama verim (μg) | SS (μg) | CV (%) | Ortalama verim (μg) | SS (μg) | CV (%) |
| Kullanıcı A, tüm lotlar | 7,46 | 0,85 | 11 | 9,43 | 1,22 | 13 |
| Kullanıcı B, tüm lotlar | 7,02 | 1,31 | 19 | 8,98 | 2,09 | 23 |
| Kullanıcı C, tüm lotlar | 7,84 | 0,98 | 13 | 10,56 | 1,15 | 11 |
| | Donör havuzu 9 ($8,4 \times 10^6$ hücre/mL) | | | Donör havuzu 10 ($10,2 \times 10^6$ hücre/mL) | | |
| | Ortalama verim (μg) | SS (μg) | CV (%) | Ortalama verim (μg) | SS (μg) | CV (%) |
| Kullanıcı A, tüm lotlar | 7,54 | 0,72 | 10 | 7,81 | 0,82 | 11 |
| Kullanıcı B, tüm lotlar | 7,48 | 1,50 | 20 | 8,26 | 1,54 | 19 |
| Kullanıcı C, tüm lotlar | 10,02 | 1,34 | 13 | 10,89 | 1,10 | 10 |

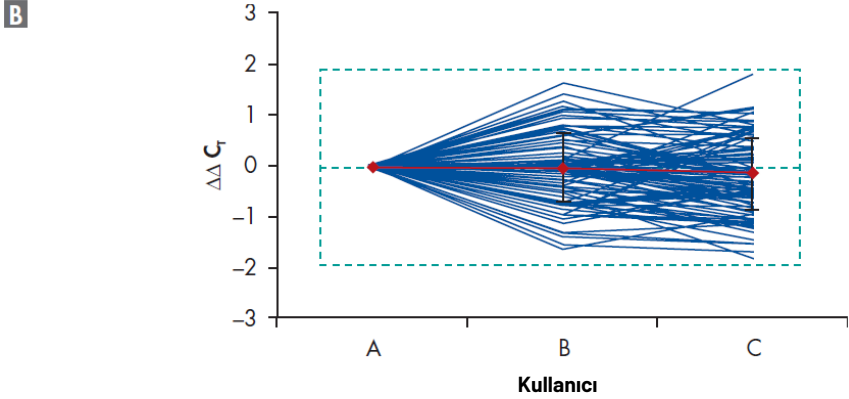
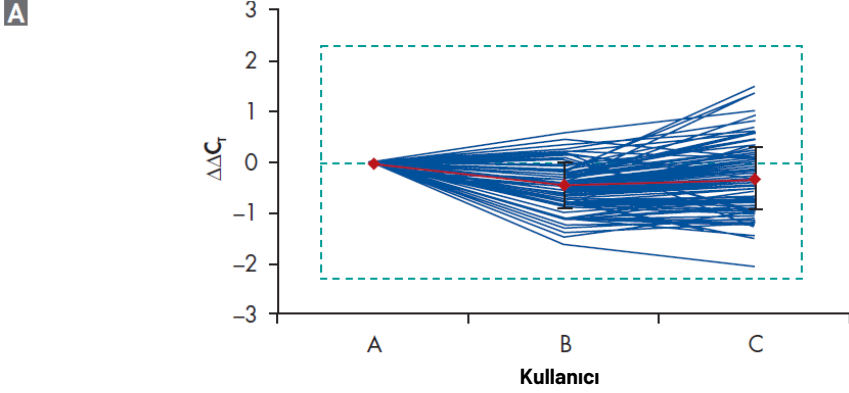
Tablo 1C: Seçilen donör havuzları (1, 6, 9, 10) için her lot içinde ve tüm kullanıcılar arasında yeniden üretilebilirlik

| Verilerin kombinasyonu | Donör havuzu 1 ($5,1 \times 10^6$ hücre/mL) | | | Donör havuzu 6 ($6,5 \times 10^6$ hücre/mL) | | |
|-------------------------|--|----------------------|--------|--|----------------------|--------|
| | Ortalama verim (μg) | SS (μg) | CV (%) | Ortalama verim (μg) | SS (μg) | CV (%) |
| Lot 1, tüm kullanıcılar | 7,96 | 0,69 | 9 | 9,88 | 1,34 | 14 |
| Lot 2, tüm kullanıcılar | 6,76 | 0,93 | 14 | 9,99 | 1,84 | 18 |
| Lot 3, tüm kullanıcılar | 7,60 | 1,27 | 17 | 9,09 | 1,71 | 19 |
| | Donör havuzu 9 ($8,4 \times 10^6$ hücre/mL) | | | Donör havuzu 10 ($10,2 \times 10^6$ hücre/mL) | | |
| | Ortalama verim (μg) | SS (μg) | CV (%) | Ortalama verim (μg) | SS (μg) | CV (%) |
| Lot 1, tüm kullanıcılar | 8,83 | 1,63 | 19 | 9,02 | 1,27 | 14 |
| Lot 2, tüm kullanıcılar | 7,75 | 1,36 | 18 | 8,73 | 2,31 | 26 |
| Lot 3, tüm kullanıcılar | 8,46 | 1,99 | 24 | 9,20 | 1,80 | 20 |

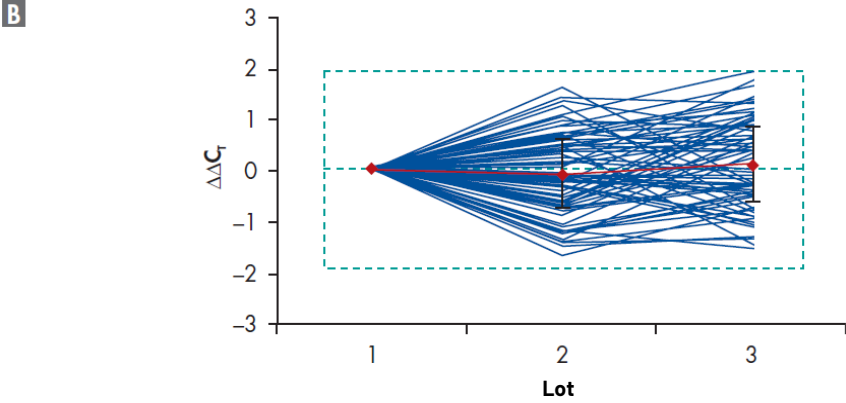
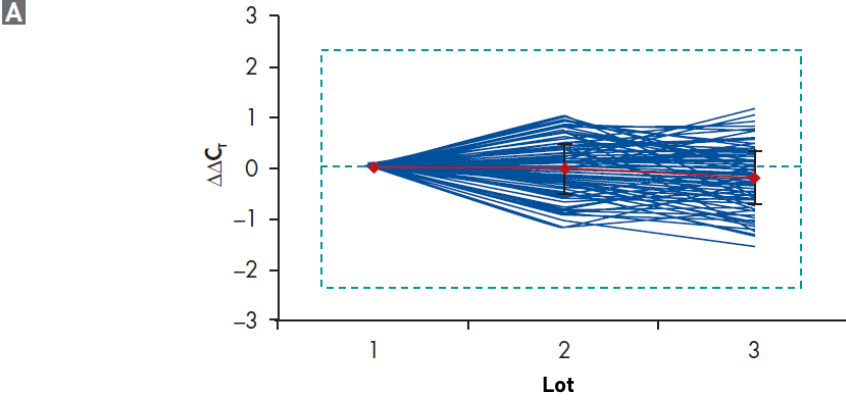
Tablo 1D: Seçilen donör havuzları (1, 6, 9, 10) için tüm lotlar ve tüm kullanıcılar arasında yeniden üretilebilirlik

| Verilerin kombinasyonu | Donör havuzu 1 ($5,1 \times 10^6$ hücre/mL) | | | Donör havuzu 6 ($6,5 \times 10^6$ hücre/mL) | | |
|-------------------------|--|----------------------|--------|--|----------------------|--------|
| | Ortalama verim (μg) | SS (μg) | CV (%) | Ortalama verim (μg) | SS (μg) | CV (%) |
| Lot 1, tüm kullanıcılar | 7,44 | 1,09 | 15 | 9,66 | 1,65 | 17 |
| | Donör havuzu 9 ($8,4 \times 10^6$ hücre/mL) | | | Donör havuzu 10 ($10,2 \times 10^6$ hücre/mL) | | |
| | Ortalama verim (μg) | SS (μg) | CV (%) | Ortalama verim (μg) | SS (μg) | CV (%) |
| Lot 1, tüm kullanıcılar | 8,35 | 1,70 | 20 | 8,99 | 1,80 | 20 |

4 temsili donör havuzunun ayrıntılı analizi. Havuzlar lökosit sayımına göre seçilmiştir ve normal lökosit sayımı aralığının ($4,8 \times 10^6$ - $1,1 \times 10^7$ lökosit/ml) üst, orta ve alt değerlerini yansıtmaktadır. Lökosit sayımı, donör havuzu başına 3 donörden 3 lökosit sayımının ortalama değerini temsil etmektedir.



Şekil 10: Kullanıcılar arasında RT-PCR yeniden üretilebilirliği. Gerçek zamanlı RT-PCR için Şekil 9'de tanımlanan deneyde saflaştırılmış RNA kullanılmıştır. **[A]** FOS ve **[B]** IL1B relatif transkript seviyeleri, dahili standart olarak 18S rRNA kullanılarak gerçek zamanlı dupleks RT-PCR ile belirlenmiştir. Tüm örnekler için değerler, kullanıcı A değerlerine relatif olarak (10 donör × 3 kit lotu × 4 replikat = her gen için 120 veri seti) grafiğe dökülmüş ve ortalamalar (kırmızı çizgiler) ile standart sapmalar (siyah çubuklar) tüm örnekler için gösterilmiştir. Kesik çizgiler tahillerin $\pm 3x$ total kesinliğine işaret etmektedir (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).



Şekil 11: Kit lotları arasında RT-PCR yeniden üretilebilirliği. Gerçek zamanlı RT-PCR için Şekil 9'de tanımlanan deneyde saflaştırılmış RNA kullanılmıştır. **[A]** FOS ve **[B]** IL1B relatif transkript seviyeleri, dahili standart olarak 18S rRNA kullanılarak gerçek zamanlı dupleks RT-PCR ile belirlenmiştir. Tüm örnekler için değerler, kit lotu 1 değerlerine relatif olarak (10 donör havuzu × 3 kullanıcı × 4 replikat = her gen için 120 veri seti) grafiğe dökülmüş ve ortalamalar (kırmızı çizgiler) ile standart sapmalar (siyah çubuklar) tüm örnekler için gösterilmiştir. Kesik çizgiler tahlillerin ±3x total kesinliğine işaret etmektedir (FOS: 2,34 C_T; IL1B: 1,93 C_T).

Tablo 2: Şekil 10 ve Şekil 11'den RT-PCR verilerinin özeti

| Test sistemi | FOS/18S rRNA tahlili | | IL1B/18S rRNA tahlili | |
|--|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | Ortalama ($\Delta\Delta C_T$) | \pm SS ($\Delta\Delta C_T$) | Ortalama ($\Delta\Delta C_T$) | \pm SS ($\Delta\Delta C_T$) |
| Her kullanıcı içinde ve tüm lotlar arasında yeniden üretilebilirlik | | | | |
| Tüm kullanıcılar, lot 1 – lot 1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Tüm kullanıcılar, lot 1 – lot 2 | -0,03 | 0,48 | -0,07 | 0,66 |
| Tüm kullanıcılar, lot 1 – lot 3 | -0,21 | 0,52 | 0,11 | 0,71 |
| Her kullanıcı içinde ve tüm lotlar arasında yeniden üretilebilirlik | | | | |
| Tüm lotlar, kullanıcı A – kullanıcı A | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Tüm lotlar, kullanıcı A – kullanıcı B | -0,46 | 0,44 | -0,06 | 0,69 |
| Tüm lotlar, kullanıcı A – kullanıcı C | -0,31 | 0,60 | -0,15 | 0,71 |

Kullanıcı: Çalışmayı yapan teknisyen.

Lot: Çalışmada kullanılan kit lotu sayısı.

SS: Standart sapma.

Ortalama $\Delta\Delta C_T$ değerleri (N = 120) ve standart sapmalar Şekil 10 ve Şekil 11'de sunulan veriler için gösterilmektedir.

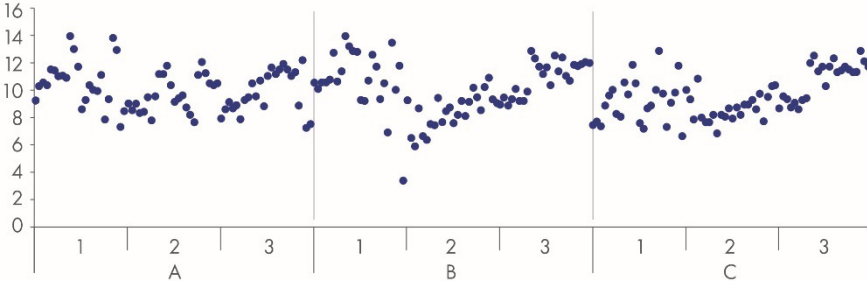
Otomatik RNA izolasyonu

2,5 mL sağlıklı insan tam kanından RNA verimi, işlenen örneklerin ≥ 95 'i için ≥ 3 μ g değerindedir. Şekil 12 (sayfa 55) 3 operatör tarafından 3 kit lotuyla otomatik protokol kullanılarak hazırlanan toplam 216 örnekten RNA verimlerini göstermektedir. Bu çalışmalar için ayrı PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) yerine birleştirilmiş kan örnekleri kullanıldığından sonuçlar, ayrı kan alımlarına ait tekli örneklerden beklenen RNA verimini yansıtmaz. Verimler donöre yüksek ölçüde bağımlı olduğundan ayrı verimler farklılık gösterebilir (Şekil 12, sayfa 55).

RT-PCR reaksiyon hacminin %30'una kadarını elüat oluşturduğunda örneklerin en az %95'i RT-PCR'de inhibisyon göstermemektedir. Otomatik protokol kullanıldığında örnekler arasında çapraz kontaminasyon, aynı çalışmada RNA pozitif örneklerle (insan tam kanı) eşleştirilmiş RNA negatif örneklerde (su) ABL1 ve FOS transkriptlerinin sekanslarının kantitatif, gerçek zamanlı RT-PCR işlemiyle ölçüldüğü şekilde saptanamaz.

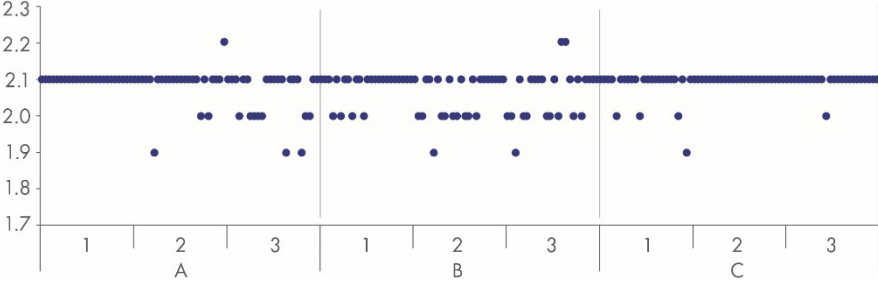
PAXgene Blood RNA System ve otomatik protokol ile izole edilen RNA, RT-PCR inhibisyonu görülmemesinden anlaşıldığı şekilde saftır ve A_{260}/A_{280} değerleri 1,8 ile 2,2 arasındadır. Genomik DNA, beta aktin geninin bir sekansının kantitatif, real-time PCR işlemiyle ölçüldüğü şekilde, tüm örneklerin $\geq\%95$ 'inde $\leq\%1$ (a/a) seviyesinde bulunmaktadır. Şekil 13 ve Şekil 14 (sayfa 56), 3 operatör tarafından 3 kit lotuyla otomatik protokol kullanılarak hazırlanan toplam 216 örneğin relatif genomik DNA'sı ve A_{260}/A_{280} değerlerini göstermektedir.

RNA verimi ($\mu\text{g}/2,5$ ml kan) QIAcube Connect MDx



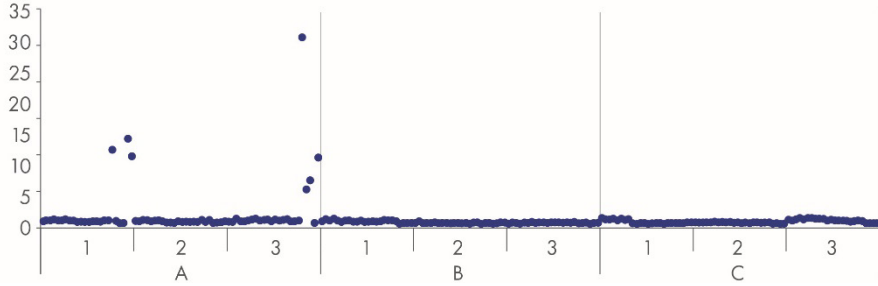
Şekil 12: RNA verimi – QIAcube Connect MDx ile otomatik işleme. Ayrı donörlerden kan örnekleri PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) içinde toplanmıştır. Tüplerin içeriği 6 donör havuzu olacak şekilde birleştirilmiş ve ardından tekrar alikotlanmıştır. 3 farklı operatör (A, B, C) tarafından toplam 216 tüp (havuz başına 36) işlenmiştir. Her bir operatör, QIAcube Connect MDx ile otomatik izolasyon için PAXgene Blood RNA Kit'in 3 farklı lotunu (1, 2, 3) kullanmış ve 6 donör havuzunun her birinden dörtlü örnekleri işlemiştir. Tüm ayrı örneklerin RNA verimleri her operatör-lot kombinasyonu için gösterilmiştir.

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



Şekil 13: RNA saflığı (A_{260}/A_{280} değerleri) – QIAcube Connect MDx ile otomatik işleme. RNA, Şekil 12'de açıklanan deneyde, 3 farklı operatör (A, B, C) tarafından, PAXgene Blood RNA Kit'in 3 farklı lotu (1, 2, 3) QIAcube Connect MDx ile kullanılarak saflaştırılmıştır. Tüm ayrı örneklerin A_{260}/A_{280} değerleri her operatör-lot kombinasyonu için gösterilmiştir.

Genomik DNA (a/a) [%] QIAcube Connect MDx



Şekil 14: RNA saflığı (% genomik DNA kontaminasyonu) – QIAcube Connect MDx ile otomatik işleme. RNA, Şekil 12'de açıklanan deneyde, 3 farklı operatör (A, B, C) tarafından, PAXgene Blood RNA Kit'in 3 farklı lotu (1, 2, 3) QIAcube Connect MDx ile kullanılarak saflaştırılmıştır. Her ayrı örnekteki genomik DNA miktarları (a/a) her operatör lot kombinasyonu için gösterilmiştir.

PAXgene Blood RNA System'in kullanıldığı otomatik RNA izolasyon protokolü, yüksek ölçüde yeniden üretilebilir ve tekrarlanabilir RT-PCR sonuçları sağlar ve böylece klinik tanı amaçlı testler için oldukça güçlüdür.

İzole edilmiş RNA'nın stabilitesi

Kanla doldurulmuş PAXgene Blood RNA Tubes'dan PAXgene Blood RNA Kit ile izole edilen RNA örnekleri, -20°C 'de saklandığında 5 yıl ve -70°C 'de saklandığında 7 yıl (çalışmaların sonlanım noktası) boyunca stabildir.

Önemli Notlar

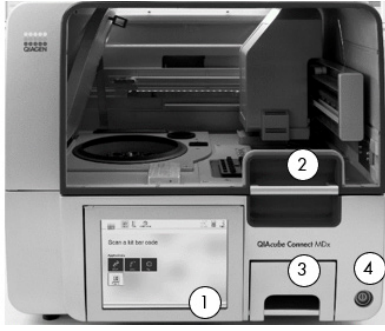
QIAcube Connect MDx'in kullanımı

QIAcube Connect MDx kullanımı hakkında bilgi sahibi olduğunuzdan emin olun. Lütfen otomatik PAXgene Blood RNA protokolüne başlamadan önce, güvenlik bilgilerine özellikle dikkat ederek cihazın kullanım kılavuzunu ve cihazla birlikte sağlanan ek bilgileri okuyun.

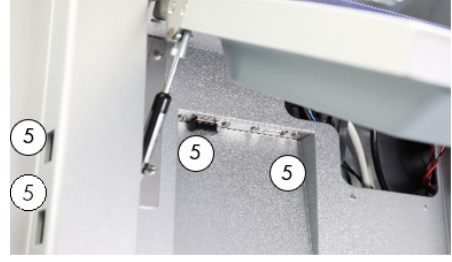
QIAcube Connect MDx'i başlatma

QIAcube Connect MDx kapağını kapatın ve cihazı güç anahtarıyla açın (bkz. Şekil 15, sayfa 59).

Bir bip sesi duyulur ve başlangıç ekranı görülür. Cihaz otomatik olarak başlatma testlerini gerçekleştirir.



QIAcube Connect MDx cihazının önden görünümü



Dışarı çekilmiş dokunmatik ekran



QIAcube Connect MDx cihazının arkadan görünümü
(sol taraf)



QIAcube Connect MDx cihazının arkadan görünümü
(sağ taraf)

Şekil 15: QIAcube Connect MDx cihazının dış özellikleri.

1 Dokunmatik ekran

2 Kapak

3 Atık çekmecesi

4 Güç anahtarı

5 Dokunmatik ekranın sol tarafında 2 USB portu; dokunmatik ekranın arkasında 2 USB portu (1 USB portuna Wi-Fi modülü takılır)

6 RJ-45 Ethernet portu

7 Güç kablosu soketi

8 Soğutucu hava çıkışı

Dokunmatik ekran

QIAcube Connect MDx, dokunmatik ekran kullanılarak kontrol edilir. Dokunmatik ekran kullanıcının cihazı kullanmasını sağlar ve kullanıcıya çalışma tablası ayarında rehberlik eder. Örnek işleme esnasında, dokunmatik ekran protokol durumunu ve kalan süreyi gösterir.



Şekil 16: QIAcube Connect MDx cihazının dışarı çekilmiş dokunmatik ekranı.

QIAcube Connect MDx'e protokol kurulumu

QIAcube Connect MDx üzerinde ilk RNA hazırlama çalışması yapılmadan önce bir başlangıç protokol kurulumu gerekebilir. Hem "PAXgene Blood RNA Part A" hem de "PAXgene Blood RNA Part B" protokollerini kurun.

QIAcube Connect MDx protokolleri www.qiagen.com adresinde bulunur ve cihazla birlikte verilen USB belleğe indirilmesi gerekir. Bu protokoller, USB portu vasıtasıyla cihaza aktarılır.

USB portu (dokunmatik ekranın yan tarafında bulunur; bkz. Şekil 15, sayfa 59), QIAcube Connect MDx'in cihazla birlikte verilen USB belleğe bağlanmasını sağlar. Günlük dosyaları veya rapor dosyaları gibi veri dosyaları da USB portu yoluyla cihazdan USB belleğe aktarılabilir.



USB portu yalnızca QIAGEN tarafından sağlanan USB bellek ile kullanıma yöneliktir. Bu porta başka cihazlar bağlamayın.



USB belleği, protokolleri indirirken veya veri dosyalarını aktarırken ya da bir protokol çalışması sırasında çıkarmayın.

QIAcube Connect MDx'e protokoller yükleme işlemine dair ayrıntılı bilgi için lütfen cihazın kullanım kılavuzuna bakın.

QIAcube Connect MDx'i yükleme

Zamandan tasarruf etmek için yükleme, şuradaki 10 dakikalık santrifüjleme adımlarının (adım 3 ve 5) biri veya her ikisi sırasında yapılabilir: "Protokol: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) İçinde Toplanan İnsan Tam Kanından Total RNA'nın Otomatik İzolasyonu", sayfa 32.

Reaktif şişeleri

QIAcube Connect MDx üzerindeki her çalışmadan önce, 4 reaktif şişesini Tablo 3'te (sayfa 62) listelenen reaktifler ile maksimum gösterge seviyesine veya bu mümkün değilse PAXgene Blood RNA Kit'te sağlanan tampon hacimlerinin izin verdiği seviyeye kadar dikkatlice doldurun. Şişeleri ve kapakları tampon adlarıyla belirgin bir şekilde etiketleyin ve doldurulmuş reaktif şişelerini reaktif şişesi rafındaki uygun pozisyonlara yerleştirin. Rafı cihazın çalışma tablasına gösterildiği şekilde yükleyin (sırasıyla Şekil 17 ve Şekil 18, sayfa 62 ve 63).



Sağlanan Tampon BR2 hacmi bir reaktif şişesini gösterge seviyesine kadar doldurmayacaktır. Tampon BR3 ve BR4, önceki çalışmalarda çok sayıda örneğin işlenmesinden sonra şişeyi gösterge seviyesine kadar doldurmayabilir.



Çalışma tablasına yerleştirmeden önce kapakları şişelerden çıkardığınızdan emin olun.



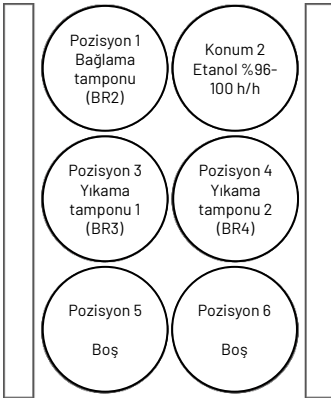
PAXgene Blood RNA Kit'te sağlanan tampon hacimleri (50), çalışma başına 2 ila 12 örnek ile, QIAcube Connect MDx üzerinde en fazla 7 RNA hazırlama çalışması için yeterlidir. Kit başına toplam 50 örnek işlemek için genel olarak, çalışma başına az sayıda örneğe sahip çalışmalardan kaçınılmalıdır. 7'nin üzerinde RNA hazırlama çalışması yapmak, son örnekleri işlerken tampon hacimlerinin yetersiz kalmasına yol açabilir.

Tablo 3: Reaktif şişesi rafındaki pozisyonlar

| Pozisyon | Reaktif |
|----------|-------------------------|
| 1 | Bağlama tamponu (BR2) |
| 2 | Etanol (%96-100 h/h) |
| 3 | Yıkama tamponu 1 (BR3) |
| 4 | Yıkama tamponu 2 (BR4)* |
| 5 | -(boş bırakın) |
| 6 | -(boş bırakın) |

* Yıkama tamponu 2 (BR4) konsantre olarak sağlanır. İlk defa kullanmadan önce bir çalışma solüsyonu elde etmek için şişede belirtildiği üzere 4 hacim etanol (%96-100 h/h, saflık derecesi p.a.) ekleyin.

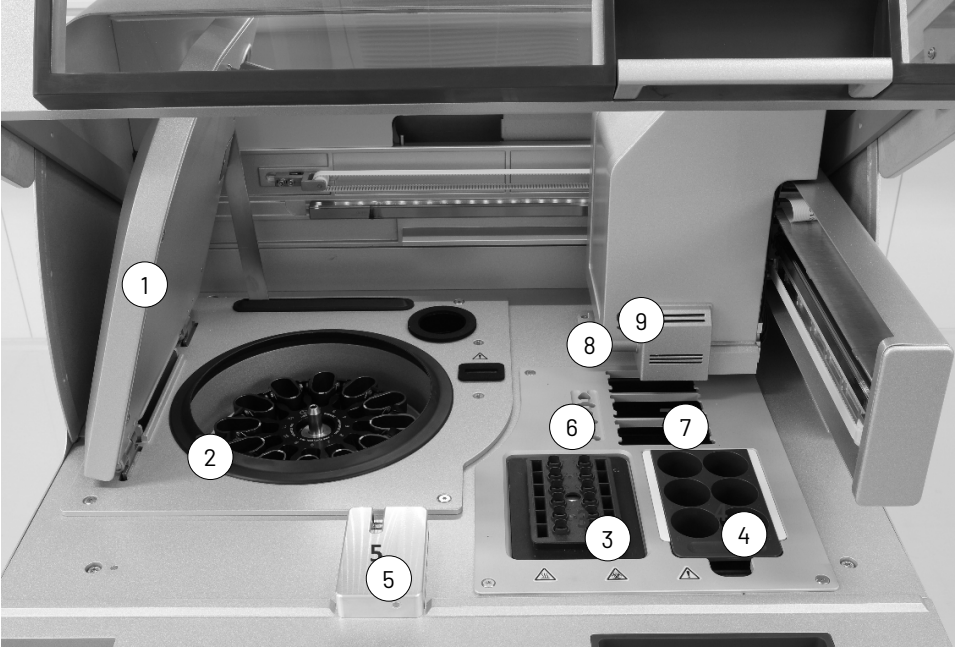
A



B



Şekil 17: Reaktif şişesi rafını yükleme. [A] Reaktif şişesi rafında şişelerin pozisyonları ve içindekilerin şeması. [B] Rafı QIAcube Connect MDx'e yükleme.



Şekil 18: QIAcube Connect MDx'in iç görünümü.

- | | | | |
|---|----------------------------|---|--|
| 1 | Santrifüj kapağı | 6 | MCT yuvaları |
| 2 | Santrifüj | 7 | Uç rafları için 3 yuva |
| 3 | Çalkalayıcı | 8 | Uçlar ve kolonlar için atma yuvaları |
| 4 | Reaktif şişesi rafı | 9 | Robotik kol (1 kanallı pipetleyici, tutucu, ultrasonik ve optik sensör ve UV LED dahildir) |
| 5 | Uç sensörü ve kapak kilidi | | |

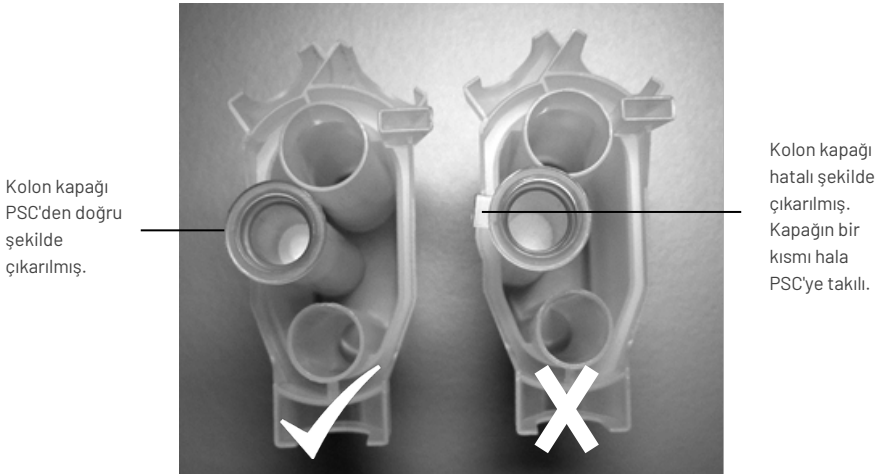
Döndürme kolonları (PSC, PRC), MCT ve QIAcube Connect MDx plastik malzemeleri

QIAcube Connect MDx üzerine Filter Tips 1000 µL ile dolu 2 uç rafı yerleştirin (bkz. Şekil 18, sayfa 63). Rafları gerektiğinde uçlarla tekrar doldurun.

i Sadece QIAcube Connect MDx ile kullanılmak için tasarlanmış 1000 µL filtre uçlarını kullanın.

Her örnek için rotor adaptörlerini ve MCT'yi silinmez bir kalem kullanarak etiketleyin. Kullanılacak PSC'yi açın ve kapağı makas kullanarak tamamen kesip çıkarın (bkz. Şekil 19).

i QIAcube Connect MDx robotik tutucusunun düzgün çalışması için kapakları ve kapağı PSC'ye bağlayan tüm plastik kısımları tamamen çıkarın (keserek) (bkz. Şekil 19). Aksi takdirde, robotik tutucu PSC'yi uygun şekilde kavrayamaz.



Şekil 19: PSC'yi yükleme. PSC, rotor adaptörünün orta pozisyonuna yüklenir. Kolonu yüklemeyen önce PSC'nin kapağını kesip çıkarın.

PSC'yi (kapağı olmadan, bkz. Şekil 19, sayfa 64), PRC'yi ve etiketli MCT'yi, Tablo 4 ve Şekil 20'de gösterildiği şekilde her bir etiketli rotor adaptöründeki uygun pozisyonlara yükleyin.

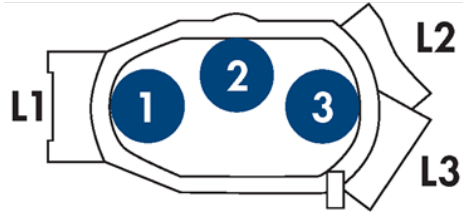


Döndürme kolunu (PRC) ve MCT kapaklarının, rotor adaptörünün kenarında yuvaların altına gidebildiği kadar itildiğinden emin olun. Aksi halde santrifüjleme sırasında kapaklar kopacaktır.

Tablo 4: Rotor adaptöründeki plastik sarf malzemeleri

| Pozisyon | Reaktif | Kapak pozisyonu |
|----------|--|-----------------|
| 1 | PAXgene RNA döndürme kolonu (kırmızı, PRC) | L1 |
| 2 | PAXgene Shredder döndürme kolonu (eflatun, PSC)(rotor adaptörüne yerleştirmeden önce kapağı kesip çıkarın) | - |
| 3 | MCT* | L3 |

* PAXgene Blood RNA Kit ile verilen MCT'yi (1,5 mL) kullanın.



Şekil 20: Rotor adaptöründeki pozisyonlar. Rotor adaptöründe 3 tüp pozisyonu (1-3) ve üç kapak pozisyonu (L1-L3) vardır.

Santrifüjü yükleme

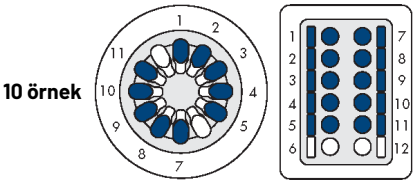
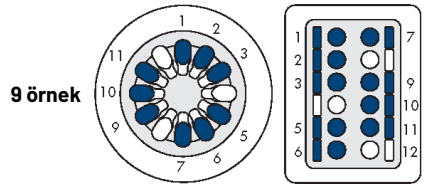
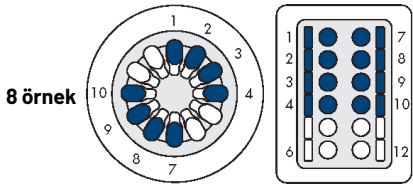
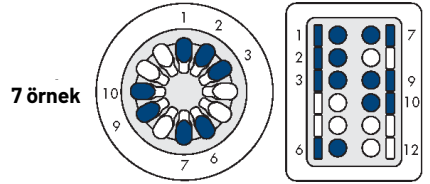
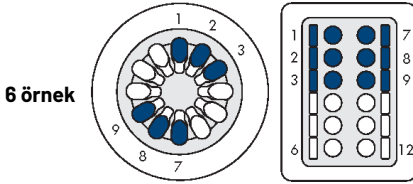
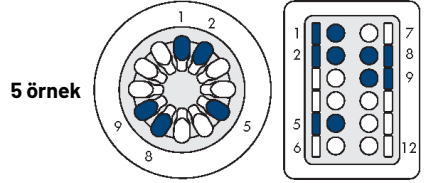
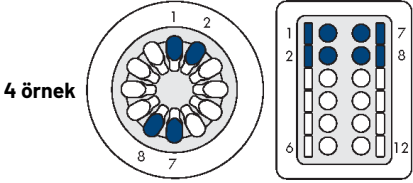
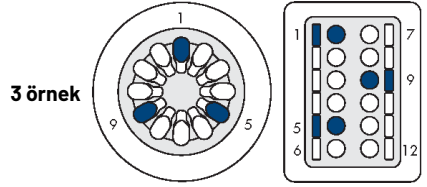
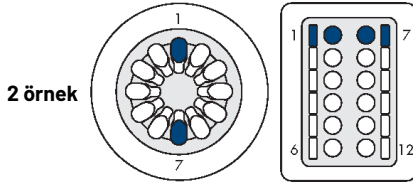
Kurulu rotor adaptörlerini QIAcube Connect MDx'in santrifüj kovalarına aşağıda Şekil 21'de gösterildiği gibi yükleyin.



12'den az örnek işleniyorsa santrifüj rotorunu radyal olarak dengelenmiş şekilde yüklediğinizden emin olun (bkz. Şekil 22, sayfa 67). 12'den daha az sayıda örnek işlenecek olsa bile bir protokol çalışmasından önce tüm santrifüj kovaları monte edilmiş olmalıdır. Tek (bir) örnek veya 11 örnek işlenemez.



Şekil 21: QIAcube Connect MDx'te santrifüjü yükleme. Kurulu rotor adaptörlerini santrifüj kovaları içine yükleyin.



Şekil 22: Santrifüj ve çalkalayıcı yükleme. Santrifüj ve çalkalayıcı pozisyonları, iki (2) ila on (10) örnek işleme için gösterilmiştir. Bir (1) veya 11 örnek işlenemez. 12 örneğin işlenmesi için tüm santrifüj ve çalkalayıcı pozisyonları yüklenir (görüntü gösterilmemektedir).

İşleme tüpleri

Varsa önceki çalışmalardan MCT yuvalarında bırakılmış PT'leri çıkarın (bkz. Şekil 18, sayfa 63). 3 PT'yi çalışmadaki örnek sayısına göre Tablo 5'te verilen reaktif miktarıyla doldurun.

DNaz I inkübasyon karışımı için belirtilen DNA parçalama tamponu (RDD) hacmini bir PT'ye pipetleyin ve belirtilen DNaz I (RNFD) stok solüsyonu hacmini ekleyin. Tüm karışımı bir 1000 µL pipet ucu kullanarak yukarı ve aşağı 3 kez yavaşça pipetleyerek karıştırın.



PAXgene Blood RNA Kit ile verilen 2 mL'lik PT'leri kullanın. Tüpleri reaktif adlarıyla açıkça etiketleyin ve bunları Tablo 6'da (sayfa 69) belirtildiği gibi MCT yuvalarında uygun pozisyona yerleştirin.



DNaz I (RNFD) fiziksel denatürasyona özellikle duyarlıdır. Kırpmayı azaltmak üzere geniş açıklıklı pipet uçları kullanarak, sadece pipetlemeyle karıştırın. Vortekslemeyin.

Tablo 5'te belirtildiği gibi sadece gereken hacmi pipetlediğinizden emin olun.

Tablo 5: MCT yuvaları için PT'lerde gereken reaktiflerin hacmi

| Örnek sayısı | Belirtilen örnek sayısı için reaktif hacmi (µL) | | |
|--------------|---|-----------------------------------|-----------------------|
| | Proteinaz K (PK) | DNaz I inkübasyon karışımı | Elüsyon tamponu (BR5) |
| 2 | 126 | 187 (23 DNaz I + 164 Buffer RDD) | 313 |
| 3 | 170 | 261 (33 DNaz I + 228 Buffer RDD) | 399 |
| 4 | 213 | 334 (42 DNaz I + 292 Buffer RDD) | 486 |
| 5 | 256 | 407 (51 DNaz I + 356 Buffer RDD) | 572 |
| 6 | 299 | 481 (60 DNaz I + 421 Buffer RDD) | 658 |
| 7 | 342 | 554 (69 DNaz I + 485 Buffer RDD) | 745 |
| 8 | 386 | 627 (78 DNaz I + 549 Buffer RDD) | 831 |
| 9 | 429 | 701 (88 DNaz I + 613 Buffer RDD) | 918 |
| 10 | 472 | 775 (97 DNaz I + 678 Buffer RDD) | 1004 |
| 12 | 558 | 921 (115 DNaz I + 806 Buffer RDD) | 1177 |

Tablo 6: MCT yuvaları

| | Pozisyon | | |
|--------|--------------|----------------------------|-----------------------|
| | A | B | C |
| İçerik | Proteinaz K | DNaz I inkübasyon karışımı | Elüsyon tamponu (BR5) |
| Kap | İşleme tüpü* | İşleme tüpü* | İşleme tüpü* |

* PAXgene Blood RNA Kit ile verilen 2 mL'lik PT'leri kullanın.

Bertaraf

Numune toplama ve manuel RNA izolasyonu sonrasında güvenli bertaraf için lütfen sırasıyla sayfa 18 ve 19 içinde yer alan güvenlik bilgilerine ve önlemlere bakın.

Ayrıca, QIAcube Connect MDx kullanarak otomatik RNA izolasyonu için, lütfen bertaraf için kullanılmış uçların ve kolonların özel yuvalarını gösteren, sırasıyla Şekil 21 ve Şekil 22'ye (sayfa 66 ve 67) bakın.

Referanslar

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.

Sorun Giderme Kılavuzu

Bu sorun giderme kılavuzu ortaya çıkabilecek sorunların çözümünde yardımcı olabilir. Daha fazla bilgi için Teknik Destek Merkezimizdeki Sık Sorulan Sorular sayfasına bakın: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN Teknik Servisindeki bilim insanları bu el kitabındaki bilgi ve protokollerle ya da örnek ve tahlil teknolojileriyle ilgili herhangi bir sorunuzu cevaplandırmaktan daima mutlu olacaktır (irtibat bilgileri için son sayfaya bakın veya www.qiagen.com adresini ziyaret edin).

| Yorumlar ve öneriler | |
|---|---|
| RNA degradasyonu | |
| a) RNaz kontaminasyonu |  Prosedür veya daha sonraki işleme sırasında reaktiflere RNaz sokmamaya dikkat edin (bkz. Ek A, sayfa 77). |
| Düşük RNA verimi | |
| b) PAXgene Blood RNA Tube'da (BRT) 2,5 mL'den az kan toplanmış |  PAXgene Blood RNA Tube'da (BRT; bkz. <i>PAXgene Blood RNA Tube El Kitabı</i>) 2,5 mL kan toplandığından emin olun |
| c) Suda ölçülen RNA konsantrasyonu |  Doğru kantifikasyon için RNA 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* içinde seyreltilmelidir (bkz. Ek B, sayfa 78). |
| d) Manuel protokolde adım 9 ve 10'da PRC'ye hücre kalıntıları aktarılmış |  Manuel protokolde adım 7'de süpernatanın pipetlenmesi sırasında büyük partikülleri aktarmaktan kaçının (küçük kalıntıların aktarılması işlemi etkilemez). |
| e) Süpernatant adım 3'te tamamen giderilmemiş |  Süpernatanın tamamen giderildiğinden emin olun. Süpernatanın dekantasyonu yapılmışsa PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kenarından damlaları bir kağıt havluyla dokunarak giderin. Çapraz kontaminasyonu önlemek için uygun önlemleri alın. |
| f) Kan, PAXgene Blood RNA Tube'da (BRT) toplandıktan sonra 2 saatten kısa süreliğine inkübe edilmiş |  PAXgene Blood RNA Tube'daki (BRT) kanı, topladıktan sonra en az 2 saat boyunca inkübe edin. |




* Kimyasallarla çalışırken her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için ürün tedarikçisinden temin edilebilecek uygun güvenlik veri sayfalarına (Safety Data Sheet, SDS) başvurun.

| Yorumlar ve öneriler | |
|--|---|
| Düşük A_{260}/A_{280} değeri | |
| g) A_{260}/A_{280} ölçümü için RNA seyreltmek üzere su kullanılmış |  Saflığı ölçmeden önce RNA'yı seyreltmek için 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 kullanın* (bkz. Ek B, sayfa 78). |
| h) Spektrofotometre uygun olarak sıfırlanmamış |  Spektrofotometreyi ölçülecek örneklerle aynı oranda elüsyon tamponu (BR5) ve 10 mM Tris-HCl, pH 7,5'ten oluşan bir kör kullanarak sıfırlayın. Elüsyon tamponunun (BR5) 220 nm'de yüksek absorbanası vardır ve bu durum, spektrofotometre uygun şekilde sıfırlanmazsa yüksek arka plan absorban seviyelerine yol açabilir. |
| Cihaz arızası | |
| i) QIAcube Connect MDx düzgün çalışmadı | Sorun Giderme kısmına özellikle dikkat ederek <i>QIAcube Connect MDx Kullanım Kılavuzu</i> belgesini okuyun. Cihaz bakımının kullanım kılavuzu içinde açıklandığı gibi uygun şekilde yapıldığından emin olun. |

* 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.

Semboller

Aşağıdaki semboller, kullanım talimatlarında veya ambalaj ve etiketler üzerinde bulunabilir. Ek semboller Kit içeriği kısmında (sayfa 6) açıklanmıştır.

| Sembol | Sembol tanımı |
|---|---------------------------------------|
| V<N1> | Ürünün <N1> versiyonu |
|  <N2> | <N2> test için yeterli reaktif içerir |
|  | Kullanım talimatlarına bakın |
|  | Son kullanma tarihi |
| IVD | İn vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz |
| REF | Katalog numarası |
| LOT | Lot numarası |
| MAT | Materyal numarası |
| COMP | Bileşenler |
| NUM | Numara |
| KU | Kunitz birimleri |
| ADD | Ekleme |
| CONT | İçerik |
| RCNS | Sulandırılmış |

DNase

Deoksiribonükleaz I

EtOH

Etanol

GITC

Guanidin izotiyosiyanat

RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

GTIN

Küresel Ticaret Parça Numarası



Sıcaklık sınırlaması



Üst sıcaklık sınırı



Üretici

EC REP

2017/746 sayılı Yönetmelik (AB) uyarınca yetkili Avrupa temsilcisi



Önemli not



Etanol eklenmesi



CE İşareti. Bu ürün, in vitro tanı amaçlı tıbbi cihazlara yönelik 2017/746 sayılı Yönetmeliğin (AB) gerekliliklerini karşılamaktadır.

UDI

Benzersiz cihaz tanımlayıcı



Dikkat



UYARI: Sıcak yüzey

İletişim Bilgileri

QIAGEN'deki teknik desteğimizin kalitesi ve her an hazır bulunması yönüyle kendimizle gurur duyuyoruz. Teknik Servis Bölümlerimiz moleküler biyoloji ve PreAnalytiX ürünlerinin kullanımı ile ilgili geniş pratik ve teorik uzmanlığa sahip deneyimli bilim insanlarından oluşmaktadır. PAXgene Blood RNA Kit ile ilgili sorularınız için lütfen bizimle irtibata geçmekten çekinmeyin.

Teknik destek ve daha fazla bilgi için lütfen www.qiagen.com/Support adresindeki Teknik Destek Merkezimize başvurun, 00800-22-44-6000 numarasını arayın ya da QIAGEN Teknik Servis Bölümlerinden birine veya yerel distribütörlere başvurun (arka kapağa bakın veya www.qiagen.com adresini ziyaret edin).

Ek A: RNA Muamelesiyle İlgili Genel Notlar

RNA Muamelesi



Ribonükleazlar (RNazlar) genel olarak çalışmak için kofaktörler gerektirmeyen çok stabil ve aktif enzimlerdir. RNazların inaktivasyonu zor olduğundan ve RNA'nın degradasyonu için çok az miktarlar bile yeterli olduğundan öncelikle RNaz kontaminasyonu olasılığını ortadan kaldırmadan herhangi bir plastik veya cam malzeme kullanmayın. İzolasyon prosedürü sırasında veya sonrasında RNA örneğine RNazları istemeden sokmamak için çok dikkatli olunmalıdır. RNaz içermeyen bir ortam oluşturmak ve sürdürmek için RNA ile çalışırken tek kullanımlık olan ve olmayan kaplar ve solüsyonların ön muamelesi ve kullanımı sırasında önlemler alınmalıdır.

Genel kullanım



RNA ile çalışırken daima uygun mikrobiyolojik aseptik teknik kullanılmalıdır. Eller ve toz partikülleri bakteri ve küf taşımakta olup RNaz kontaminasyonunun en sık görülen kaynaklarıdır. Cilt yüzeyinden veya tozlu laboratuvar ekipmanından RNaz kontaminasyonunu önlemek için reaktifler ve RNA örneklerinin kullanımı sırasında daima lateks veya vinil eldivenler kullanın. Eldivenleri sık sık değiştirin ve tüpleri mümkün olduğunca kapalı tutun. Alikotlar aşağı yönde uygulamalar için pipetlendiğinde saflaştırılmış RNA'yı buz üzerinde tutun.

Cam malzeme ve solüsyonlardan RNaz kontaminasyonunu giderme protokolleri şunlar gibi genel moleküler biyoloji kılavuzlarında bulunabilir: Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Ek B: Total RNA Kantifikasyonu ve Kalitesinin Belirlenmesi

RNA Kantifikasyonu

RNA konsantrasyonu, absorbansı bir spektrofotometrede 260 nm (A_{260}) değerinde ölçerek belirlenmelidir. Sonuçların anlamlı olduğundan emin olmak için ölçümler spektrofotometrenin lineer aralığında olmalıdır. 260 nm değerinde 1 ünitelik bir absorbans 44 µg RNA/ml değerine karşılık gelir ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/mL}$). Bu ilişki sadece 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* içindeki ölçümler için geçerlidir. Bu nedenle RNA örneğinin seyreltilmesi gerekir ve bu işlem 10 mM Tris-HCl içinde yapılmalıdır. Aşağıda açıklandığı gibi (bkz "RNA Saflığı", sayfa 79), 260 ve 280 nm değerlerinde absorbansın oranı RNA saflığının bir tahminini sağlar. RNA örnekleri ölçülürken küvetlerin RNaz içermediğinden emin olun. Spektrofotometreyi ölçülecek örneklerle aynı oranda elüsyon tamponu (BR5) ve Tris-HCl tamponundan oluşan bir kör kullanarak sıfırlayın. Elüsyon tamponunun (BR5) 220 nm'de yüksek absorbansı vardır ve bu durum, spektrofotometre uygun şekilde sıfırlanmazsa yüksek arka plan absorbans seviyelerine yol açabilir. RNA kantifikasyonunda yer alan hesaplamaya bir örnek aşağıda gösterilmiştir.

| | | |
|---|---|--|
| RNA örneğinin hacmi | = | 80 µL |
| Dilüsyon (1/15) | = | 10 µL RNA örneği + 140 µL 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 |
| Seyreltilmiş örneğin absorbansını bir küvette (RNaz içermeyen) ölçün. | | |
| A_{260} | = | 0,3 |
| Örneğin konsantrasyonu | = | $44 \times A_{260} \times \text{dilüsyon faktörü}$ |
| | = | $44 \times 0,3 \times 15$ |
| | = | 198 µg/mL |
| Toplam verim | = | konsantrasyon \times mililitre cinsinden örnek hacmi |
| | = | $198 \mu\text{g/mL} \times 0,08 \text{ mL}$ |
| | = | 15,8 µg RNA |

* Kimyasallarla çalışırken her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için ürün tedarikçisinden temin edilebilecek uygun güvenlik veri sayfalarına (Safety Data Sheet, SDS) başvurun.

RNA Saflığı

260 ve 280 nm değerlerinde ölçümlerin oranı (A_{260}/A_{280}) protein gibi UV absorbe eden kontaminanlara göre RNA saflığının bir tahminini sağlar. Ancak A_{260}/A_{280} oranı pH değerinden önemli derecede etkilenmektedir. Daha düşük pH, daha düşük A_{260}/A_{280} oranı ve protein kontaminasyonuna karşı azalmış duyarlılığa neden olmaktadır.* Doğru değerlerin elde edilmesi için absorbansın 10 mM Tris-HCl'de, pH 7,5'te ölçülmesini öneririz. Saf RNA için A_{260}/A_{280} oranı 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 içinde 1,8-2,2 aralığındadır. Spektrofotometreyi ölçülecek örneklerle aynı oranda elüsyon tamponu (BR5) ve Tris-HCl tamponundan oluşan bir kör kullanarak sıfırlayın. Elüsyon tamponunun (BR5) 220 nm'de yüksek absorbansı vardır ve bu durum, spektrofotometre uygun şekilde sıfırlanmazsa yüksek arka plan absorbans seviyelerine yol açabilir.

* 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.

Ek C: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) Kullanımı



PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) kullanılırken BD'nin aşağıdaki önerileri yardımcı olabilir. PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) hakkında daha fazla bilgi için *PAXgene Blood RNA Tube El Kitabı* belgesine bakın.

BD Hemogard Kapağının Çıkarılması Talimatı

1. Başparmağınızı BD Hemogard kapağının altına yerleştirerek PAXgene Blood RNA Tube'u (BRT) bir elinizle kavrayın. (Ek stabilite için kolunuzu sağlam bir yüzeye yerleştirin.) Diğer elinizle, BD Hemogard kapağı çevirirken diğer elin başparmağını sadece tüp tapası gevşeyinceye kadar aynı anda yukarı itin.
2. Kapağı kaldırmadan önce başparmağınızı uzaklaştırın. Başparmağınızı kapağı PAXgene Blood RNA Tube'dan (BRT) iterek çıkarmak için kullanmayın. Dikkat: PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kan içeriyorsa maruz kalma tehlikesi mevcuttur. Kapağın çıkarılması sırasında yaralanmayı önlemek için BD Hemogard kapak gevşer gevşemez, kapağı yukarı itmek için kullanılan başparmağın, PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ile temasının kesilmesi önemlidir.
3. Kapağı PAXgene Blood RNA Tube'dan (BRT) kaldırıp çıkarın. Plastik kalkanın lastik tapadan ayrılması gibi pek olası olmayan bir durumda kapağı yeniden monte etmeyin. Lastik tapayı dikkatlice PAXgene Blood RNA Tube'dan (BRT) çıkarın.

İkincil BD Hemogard Kapağını yerleştirme talimatları

1. Kapağı PAXgene Blood RNA Tube (BRT) üzerine tekrar yerleştirin.
2. Tapa tamamen yerine oturuncaya kadar çevirerek aşağıya doğru sıkıca itin.
Kullanım sırasında kapağın PAXgene Blood RNA Tube (BRT) üzerinde sağlam bir Şekilde kalması için tapanın tam olarak tekrar yerleştirilmesi gereklidir.

Sipariş Bilgileri

| Ürün | İçerik | Kat. no. |
|---|---|-------------------|
| PAXgene Blood RNA Kit (50) | 50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, İşleme Tüpleri, RNaz İçermeyen DNaz I, RNaz İçermeyen Reaktifler ve Tamponlar. PAXgene Blood RNA Tubes ile kullanılacaktır | 762174 |
| PAXgene Blood RNA Tubes (100) | 100 kan toplama tüpü | 762165 |
| QIACube'da otomatik RNA izolasyonu için QIAGEN'den sipariş edilebilecek İlgili Ürünler | | |
| Starter Pack, QIACube | Paket şunları içerir: reaktif şişesi rafları (3); raf etiketleme şeritleri (8); 200 µL filtre uçları (1024); 1000 µL filtre uçları (1024); 1000 µL filtre uçları, geniş açıklıklı (1024); 30 reaktif şişeleri (18); rotor adaptörleri (240); rotor adaptör tutucusu | 990395 |
| Filter-Tips, 1000 µL (1024) | Steril, Tek Kullanımlık Filtre Uçları, rafta | 990352 |
| Reagent Bottles, 30 mL (6) | Reaktif Şişeleri (30 mL), kapaklı; 6'lı paket; QIACube reaktif şişesi rafıyla kullanılmak üzere | 990393 |
| Rotor Adapters (10 x 24) | 240 terkip için: 240 Tek Kullanımlık Rotor Adaptörü; QIACube ile kullanılmak üzere | 990394 |
| Reagent Bottle Rack | QIACube çalışma tablası üzerinde 6 x 30 mL reaktif şişesi tutmak için raf | 9026197 |
| Rotor Adapter Holder | 12 tek kullanımlık rotor adaptörü için tutucu; QIACube ile kullanılmak üzere | 990392 |
| PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ile kan toplama için BD'den sipariş edilebilecek ilgili ürünler* | | |
| BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set | 21 G, 0,75 inç (0,8 x 19 mm) iğne, luer adaptörü ile 12 inç (305 mm) tüp; kutu başına 50, karton başına 200 | 367286/ 367281 |

| Ürün | İçerik | Kat. no. |
|---|---|-------------------|
| BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set | 21G 3/4 inç (0,8 × 19 mm) iğne, luer adaptörü ile 12 inç (305 mm) tüpü. 50/kutu, 200/karton | 367344 |
| BD Vacutainer One-Use Holder | Sadece 13 mm ve 16 mm çap için karton; 1000/karton | 364815 |
| BD Vacutainer Plus Serum Tubes | 13 × 75 mm 4,0 mL çekmeli, kırmızı BD Hemogard kapaklı ve kağıt etiketli; 100/kutu, 1000/karton | 368975/ 367812 |
| BD Vacutainer EST Tube | 13 × 75 mm 3,0 mL çekmeli, şeffaf BD Hemogard kapaklı ve şeffaf etiketli; 100/kutu, 1000/karton | 362725 |
| BD Vacutainer No Additive (Z) Tube | 13 × 75 mm 3,0 mL çekmeli, şeffaf BD Hemogard kapaklı ve kağıt etiketli; 100/kutu, 1000/karton | 366703 |

* Bu kan toplama aksesuarları, PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ile birlikte kullanılabilir. Bu ürünleri temsil etmektedir. Nasıl sipariş edileceği dahil bu aksesuarlar hakkında daha fazla bilgi için www.preanalytix.com adresini ziyaret edin.

Belge Revizyon Geçmişi

| Tarih | Değişiklikler |
|-----------------|---|
| [R1] Nisan 2022 | İlk IVDR yayını |
| [R2] şubat 2023 | PreAnalytiX GmbH adresi, "Feldbachstrasse" yerine "Garstligweg 8" şeklinde değiştirildi. Sipariş bilgilerine BD rnleri eklendi. Güvenlik bilgileri güncellendi. |

Notlar



Güncel lisanslama bilgisi ve ürüne spesifik ret beyanları için ilgili PreAnalytiX veya QIAGEN kiti el kitabı veya kullanım kılavuzuna bakın. PreAnalytiX ve QIAGEN kiti el kitapları ve kullanım kılavuzları www.preanalytix.com ve www.qiagen.com adreslerinden temin edilebilir veya QIAGEN Teknik Servisinden veya yerel distribütörünüzden talep edilebilir.

**Better samples
More to explore**

 **PreAnalytiX**
A QIAGEN / BD Company

Daha fazlasını keşfedin: www.preanalytix.com

HB-3009-002 02/2023