เมษายน 2022

PAXgene® Blood RNA Kit (คู่มือ) คำแนะนำการใช้งาน

Σ 50

เวอร์ชัน 3 (V3)

IVD

สำหรับการใช้งานวินิจฉัยภายนอกร่างกาย

CE ผลิตภัณฑ์นี้เป็นไปตามข้อกำหนดของกฎระเบียบ (EU) 2017/746 สำหรับอุปกรณ์การแพทย์เพื่อการวินิจฉัยในหลอดทดลอง

REF 762174

PreAnalytiX® GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon, Switzerland

ผลิตโดย QIAGEN GmbH สำหรับ PreAnalytiX GmbH

EC REP QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, เยอรมนี

R1 MAT 1126792TH

เครื่องหมายการค้า: 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.

© 2022 PreAnalytiX GmbH. หากมิได้แจ้งไว้เป็นอย่างอื่น PreAnalytiX โลโก้ PreAnalytiX และเครื่องหมายการค้าอื่นทั้งหมดเป็นทรัพย์สินของ PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH

สัญญาอนุญาตให้ใช้สิทธิแบบจำกัดสำหรับ PAXgene Blood RNA Kit

การใช้ผลิตภัณฑ์นี้แสดงว่าผู้ซื้อหรือผู้ใช้งานผลิตภัณฑ์ยอมรับข้อตกลงดังต่อไปนี้:

1. ผลิตภัณฑ์นี้จะใช้ได้ตามเกณฑ์วิธีที่ให้มากับผลิตภัณฑ์และคู่มือนี้เท่านั้นและสำหรับใช้ร่วมกับชิ้นส่วนประกอบที่บรรจุมาในชุดอุปกรณ์นี้เท่านั้น PreAnalytiX® ไม่ให้การอนุญาตภายใต้ทรัพย์สินทางปัญญาใดๆ ของบริษัทในการใช้หรือนำชิ้นส่วนประกอบที่รวมอยู่ในชุดอุปกรณ์นี้ไปใช้ร่วมกับชิ้นส่วนประกอบใดๆ ที่ไม่ได้รวมอยู่ในชุดอุปกรณ์นี้ เว้นเสียแต่ได้บรรยายไว้ในเกณฑ์วิธีที่ให้มากับผลิตภัณฑ์ คู่มือฉบับนี้ และเกณฑ์วิธีเพิ่มเติมต่างๆ ที่มีอยู่ใน **www.qiagen.com** และ **www.preanalytix.com**
2. นอกเหนือจากใบอนุญาตที่ได้ระบุไว้โดยชัดแจ้งแล้ว PreAnalytiX ไม่ให้การรับรองว่าชุดอุปกรณ์นี้และ/หรือการใช้งานชุดอุปกรณ์จะไม่ละเมิดสิทธิ์ของบุคคลที่สาม
3. ชุดอุปกรณ์นี้ได้รับอนุญาตสำหรับการใช้งานครั้งเดียว และห้ามใช้ซ้ำ ทำใหม่ หรือขายซ้ำ
4. PreAnalytiX ขอปฏิเสธความรับผิดชอบการอนุญาตอื่นๆ โดยเฉพาะ โดยชัดแจ้งหรือโดยนัยนอกเหนือจากที่ระบุไว้โดยชัดแจ้ง
5. ผู้ซื้อและผู้ใช้ชุดอุปกรณ์นี้ตกลงที่จะไม่ดำเนินการ หรืออนุญาตให้บุคคลอื่นใดดำเนินการในขั้นตอนใดๆ ที่อาจนำไปสู่ หรืออำนวยความสะดวกให้เกิดการกระทำต้องห้ามที่แสดงไว้ข้างต้น
6. PreAnalytiX อาจบังคับใช้ข้อห้ามของสัญญาอนุญาตให้ใช้สิทธิแบบจำกัดนี้ในศาลใดๆ และพึงเรียกชดใช้ค่าใช้จ่ายในการสืบสวน และค่าศาลทั้งหมด รวมถึงค่าทนายในการดำเนินคดีใดๆ เพื่อบังคับใช้สัญญาอนุญาตให้ใช้สิทธิแบบจำกัดนี้ หรือสิทธิในทรัพย์สินทางปัญญาใดๆ ของบริษัทที่เกี่ยวข้องกับชุดอุปกรณ์นี้ และ/หรือชิ้นส่วนประกอบของชุดอุปกรณ์นี้

สำหรับเงื่อนไขการรับใบอนุญาตที่ปรับให้เป็นปัจจุบันแล้ว โปรดดู **www.qiagen.com** และ **www.preanalytix.com**

HB-3009-001 BD-8945 1126792 © 2022 PreAnalytiX GmbH, สงวนลิขสิทธิ์

ผู้จัดจำหน่าย PreAnalytiX

ผลิตภัณฑ์ PreAnalytiX ผลิตและจัดจำหน่ายโดย QIAGEN และ BD สำหรับ PreAnalytiX

สารบัญ

สารบัญ 3

จุดประสงค์การใช้งาน 5

ผู้ใช้อุปกรณ์ 5

คำอธิบายและหลักการ 6

บทนำ 6

หลักการและขั้นตอน 6

การเก็บตัวอย่างและการทำให้คงตัว 7

การแยก RNA 7

การแยก RNA แบบแมนนวล 8

การแยก RNA แบบอัตโนมัติ 10

วัสดุที่จัดเตรียมให้ 13

ส่วนประกอบที่มีในชุดอุปกรณ์ 13

lส่วนประกอบของชุดอุปกรณ์ 14

วัสดุที่ต้องใช้แต่ไม่ได้จัดไว้ให้ 15

สำหรับเกณฑ์วิธีทั้งหมด 15

สำหรับเกณฑ์วิธีแบบแมนนวล 15

สำหรับเกณฑ์วิธีแบบอัตโนมัติ 16

คำเตือนและข้อควรระวัง 17

ข้อมูลด้านความปลอดภัย 17

ข้อมูลฉุกเฉิน 17

ข้อควรระวังป้องกัน 18

การจัดเก็บและการจัดการน้ำยา 21

ความคงตัวขณะใช้งาน 21

การเก็บตัวอย่าง การจัดเก็บ และการจัดการสิ่งส่งตรวจ 22

เกณฑ์วิธี: การแยก RNA ทั้งหมดแบบแมนนวลจากเลือดครบส่วนของมนุษย์ที่เก็บตัวอย่างไว้ใน PAXgene Blood RNA Tubes 23

เกณฑ์วิธี: การแยก RNA ทั้งหมดแบบอัตโนมัติจากเลือดครบส่วนของมนุษย์ที่เก็บตัวอย่างไว้ใน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 30

ข้อจำกัดการใช้ผลิตภัณฑ์ 37

การควบคุมคุณภาพ 37

ลักษณะการทำงาน 38

การเก็บตัวอย่างและการทำให้คงตัว 38
การแยก RNA แบบแมนนวล 43
การแยก RNA แบบอัตโนมัติ 51
การคงตัวของ RNA ที่แยกได้ 54

หมายเหตุสำคัญ 55

การใช้ QIAcube Connect MDx 55
การเริ่มใช้ QIAcube Connect MDx 55
การติดตั้งเกณฑ์วิธีบน QIAcube Connect MDx 57
การโหลด QIAcube Connect MDx 58
คอลัมน์สปิน (PSC, PRC), MCT และอุปกรณ์พลาสติกสำหรับ QIAcube Connect MDx 61

การทิ้งอุปกรณ์ 67

เอกสารอ้างอิง 68

แนวทางการแก้ไขปัญหา 69

สัญลักษณ์ 71

ข้อมูลติดต่อ 73

ภาคผนวก A: ข้อสังเกตทั่วไปเกี่ยวกับการจัดการ RNA 74

ภาคผนวก B: การหาปริมาณและการกำหนดคุณภาพของ RNA ทั้งหมด 75

ภาคผนวก C: การจัดการ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 77

ข้อมูลการสั่งซื้อ 78

ประวัติการแก้ไขเอกสาร 80

จุดประสงค์การใช้งาน

สำหรับการใช้งานวินิจฉัยภายนอกร่างกาย

PAXgene Blood RNA System ประกอบด้วยหลอดเก็บเลือด (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) และชุดอุปกรณ์ทำให้กรดนิวคลีอิกบริสุทธิ์ (PAXgene Blood RNA Kit) มีไว้สำหรับการเก็บรวบรวม การจัดเก็บและการขนส่งเลือด และการทำให้ RNA ภายในเซลล์คงตัวในหลอดปิดและการแยกและการทำโฮสต์ RNA ให้บริสุทธิ์จากเลือดครบส่วนในภายหลังสำหรับ RT-PCR ที่ใช้ในการทดสอบวินิจฉัยระดับโมเลกุล

ลักษณะการทำงานของ PAXgene Blood RNA System ได้รับการกำหนดขึ้นด้วยการคัดลอกยีน FOS และ IL1B เท่านั้น ผู้ใช้มีหน้าที่รับผิดชอบในการสร้างคุณลักษณะการทำงานของ PAXgene Blood RNA System ที่เหมาะสมสำหรับการคัดลอกเป้าหมายอื่นๆ

ข้อบ่งใช้การใช้งาน

PAXgene Blood RNA Kit ใช้สำหรับการทำ RNA ภายในเซลล์ให้บริสุทธิ์จากเลือดครบส่วนที่เก็บใน PAXgene Blood RNA Tube (BRT) เมื่อใช้ชุดอุปกรณ์นี้ร่วมกับ PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ระบบจะให้ RNA ภายในเซลล์ที่บริสุทธิ์จากเลือดครบส่วนสำหรับ RT-PCR ที่ใช้ในการทดสอบวินิจฉัยระดับโมเลกุล

ผู้ใช้อุปกรณ์

ผลิตภัณฑ์นี้มีวัตถุประสงค์ให้ใช้งานโดยผู้ใช้ที่เป็นบุคลากรผู้เชี่ยวชาญ เช่น เจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการและแพทย์ที่ได้รับการฝึกอบรมขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยภายนอกร่างกาย

ชุดอุปกรณ์นี้มีไว้สำหรับการใช้งานโดยบุคลากรผู้เชี่ยวชาญ

คำอธิบายและหลักการ

บทนำ

การเก็บเลือดครบส่วนเป็นขั้นตอนแรกในการทดสอบระดับโมเลกุลจำนวนมากที่ใช้ในการศึกษา RNA ของเซลล์ อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญในการทดลองดังกล่าวคือความไม่คงตัวของโปรไฟล์ RNA ของเซลล์ในหลอดทดลอง การศึกษาที่ PreAnalytiX แสดงให้เห็นว่าจำนวนสำเนาของ mRNA แต่ละชนิดในเลือดครบส่วนสามารถเปลี่ยนแปลงได้มากกว่า 1,000 เท่าในระหว่างการจัดเก็บหรือการขนส่งที่อุณหภูมิห้อง (Rainen et al., 2002) สิ่งนี้เกิดจากทั้งโดยการสลายตัว RNA อย่างรวดเร็วและโดยทำให้เกิดการแสดงออกของยีนบางชนิดหลังจากเจาะเลือด การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในโปรไฟล์การแสดงออกของ RNA ทำให้การศึกษาการแสดงออกของยีนที่น่าเชื่อถือเป็นไปไม่ได้ วิธีการที่รักษาโปรไฟล์การแสดงออกของ RNA ระหว่างและหลังการถ่ายเลือดจึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในเลือดครบส่วนของมนุษย์อย่างแม่นยำ

หลักการและขั้นตอน

PreAnalytiX ได้พัฒนาระบบที่ช่วยให้ การเก็บรวบรวม การทำให้คงตัว การจัดเก็บและการขนส่งตัวอย่างเลือดครบส่วนของมนุษย์สามารถทำได้ พร้อมทั้งมีเกณฑ์วิธีที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสำหรับการแยก RNA ภายในเซลล์ ระบบจำเป็นต้องใช้ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) สำหรับการเก็บเลือดและการทำให้ RNA คงตัว ตามด้วยการแยก RNA แบบแมนนวลหรือแบบอัตโนมัติโดยใช้ PAXgene Blood RNA Kit เกณฑ์วิธีทั้งแบบแมนนวลและแบบอัตโนมัติให้ประสิทธิภาพเทียบเท่ากันอย่างมากโดยคำนึงถึงคุณภาพและปริมาณของ RNA ข้อมูลประสิทธิภาพสำหรับเกณฑ์วิธีแบบแมนนวล (หน้า 43-51) และเกณฑ์วิธีแบบอัตโนมัติ (หน้า 51-53) รวมอยู่ในคู่มือเล่มนี้

PAXgene Blood RNA System ทำให้ขั้นตอนกระแสงานก่อนการวิเคราะห์มีมาตรฐานได้ตั้งแต่การเก็บตัวอย่างเลือดจนถึงการแยก RNA ของเซลล์ สอดคล้องตาม ISO 20186-1:2019, การตรวจเพื่อวินิจฉัยภายนอกร่างกายระดับโมเลกุล — ข้อกำหนดเฉพาะสำหรับกระบวนการก่อนตรวจสำหรับเลือดครบส่วนจากหลอดเลือดดำ — ตอนที่ 1: RNA ของเซลล์ที่แยกออกแล้ว

การเก็บตัวอย่างและการทำให้คงตัว

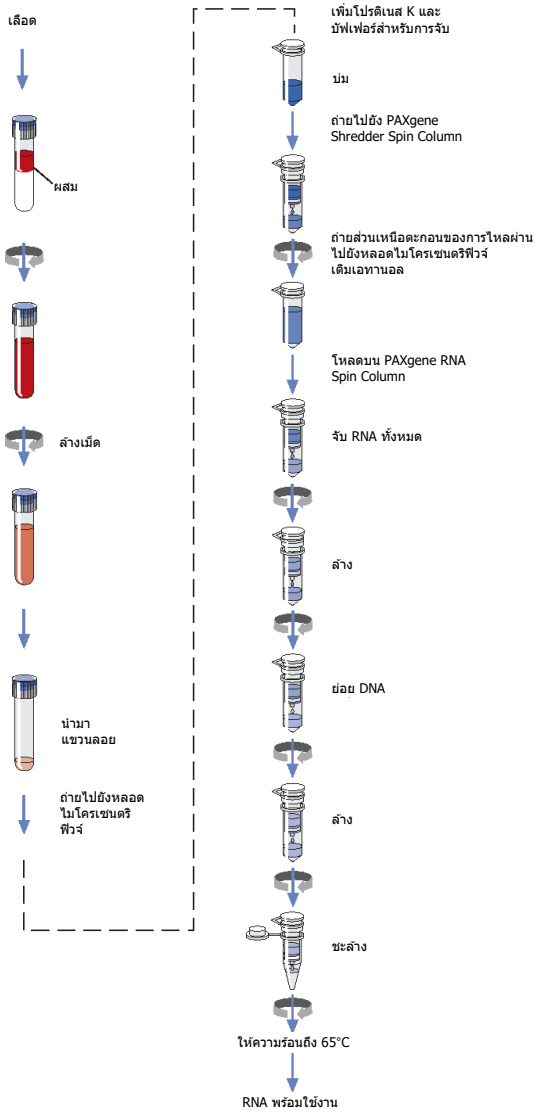
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) มีสารทำปฏิกิริยาให้เกิดการคงตัวของ RNA ที่จดทะเบียนกรรมสิทธิ์ไว้ สารเสริมนี้ช่วยปกป้องโมเลกุลของ RNA จากการแตกสลายโดย RNases และลดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนภายนอกร่างกายให้มีน้อยที่สุด ลักษณะการทำงานของ PAXgene Blood RNA System ได้รับการกำหนดขึ้นด้วยการคัดลอกยีน FOS และ IL1B ซึ่งสามารถดูได้ที่หน้า 39–42

การแยก RNA

PAXgene Blood RNA Kit ใช้สำหรับการแยก RNA ทั้งหมดจากเลือดครบส่วนของมนุษย์ 2.5 ml ที่เก็บใน PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ขั้นตอนนี้ง่ายและสามารถทำได้โดยใช้ขั้นตอนแบบแมนนวลหรือแบบอัตโนมัติ (ดู รูปที่ 1 หรือ รูปที่ 3, หน้า9 หรือ 11ตามลำดับ) ในทั้งสองเกณฑ์วิธี การแยกเริ่มต้นด้วยขั้นตอนการหมุนเหวี่ยงเพื่ออัดเม็ดกรดนิวคลีอิกใน PAXgene Blood RNA Tube (BRT) เม็ดจะถูกล้างและนำมาแขวนลอยใหม่ ตามด้วยการแยก RNA แบบแมนนวลหรือแบบอัตโนมัติ โดยหลักการแล้วทั้งสองเกณฑ์วิธีจะทำตามขั้นตอนของเกณฑ์วิธีเดียวกันด้วยส่วนประกอบชุดอุปกรณ์เดียวกัน

การแยก RNA แบบแมนนวล

โดยละเอียดแล้วเม็ดที่นำมาแขวนลอย จะถูกบ่มในบัฟเฟอร์ที่ได้รับการปรับให้เหมาะสม พร้อมกับ โปรติเนส K (PK) เพื่อให้เกิดการย่อยโปรตีน การหมุนเหวี่ยงเพิ่มเติมผ่านคอลัมน์สปิน PAXgene Shredder (PAXgene Shredder spin column, PSC) จะดำเนินการเพื่อทำให้เซลล์ไลเสทเป็นเนื้อเดียวกันและกำจัดเศษเซลล์ที่เหลือออกและส่วนเหนือตะกอนของเศษไหลผ่านจะถูกถ่ายไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube, MCT) หลอดใหม่ มีการเพิ่มเอทานอลเพื่อปรับเงื่อนไขการจับและไลเซทจะถูกนำไปใช้กับคอลัมน์สปิน PAXgene RNA (PRC) ในระหว่างการหมุนเหวี่ยงสั้นๆ RNA จะถูกจับเลือกเข้ากับเมมเบรนซิลิก้า PAXgene เมื่อสารปนเปื้อนไหลผ่าน สิ่งปนเปื้อนที่หลงเหลืออยู่จะถูกขจัดออกในขั้นตอนการล้างอย่างมีประสิทธิภาพหลายขั้นตอน ระหว่างขั้นตอนการล้างครั้งแรกและครั้งที่สอง เมมเบรนจะได้รับการบำบัดด้วย DNase I (RNFD) เพื่อกำจัดปริมาณเล็กน้อยของ DNA ที่จับ หลังจากขั้นตอนการล้าง RNA จะถูกขจัดออกในบัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5) และทำให้แปลงสภาพด้วยความร้อน สามารถดูลักษณะการทำงานของการแยก RNA แบบแมนนวลโดยใช้ PAXgene Blood RNA System ได้ที่หน้า 43



รูปที่ 1: ขั้นตอน PAXgene Blood RNA แบบแมนนวล

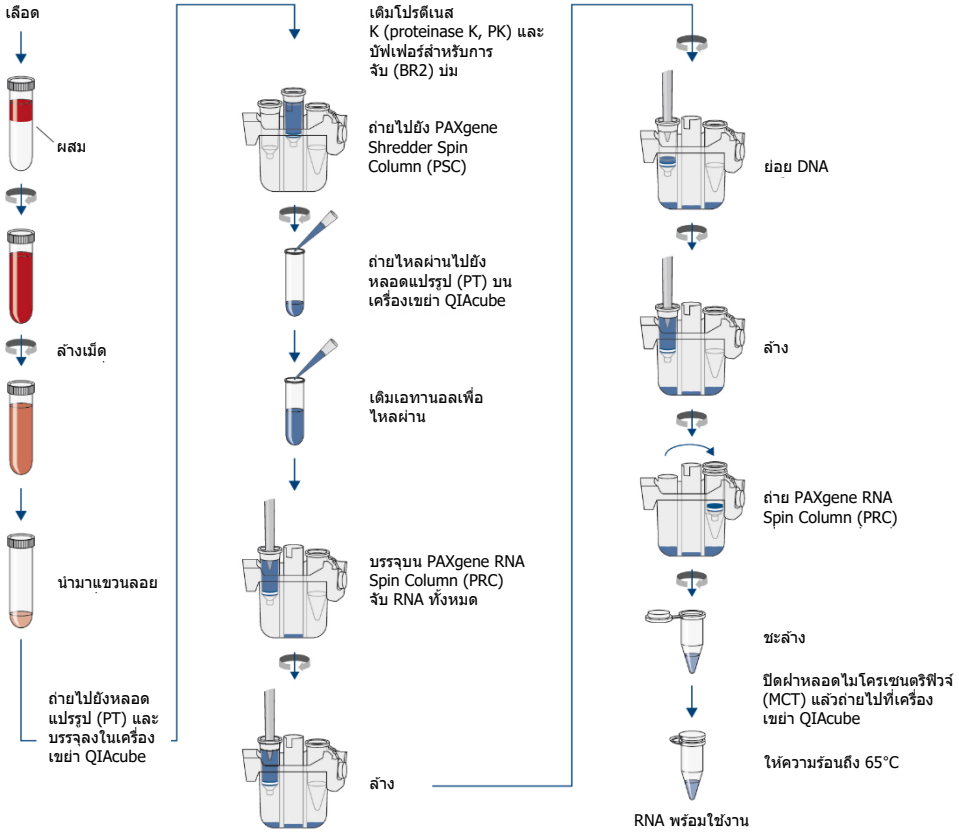
การแยก RNA แบบอัตโนมัติ

การแยก RNA ในเลือดเป็นการทำแบบอัตโนมัติบนเครื่อง QIAcube Connect MDx ของ QIAGEN เครื่องมือที่เป็นนวัตกรรมใหม่นี้ใช้เทคโนโลยีขั้นสูงในการประมวลผลคอลัมน์สปิน QIAGEN ทำให้สามารถทำการรวมการเตรียมตัวอย่างที่มีปริมาณงานต่ำโดยอัตโนมัติเข้ากับกระแสงานในห้องปฏิบัติการได้อย่างราบรื่น การเตรียมตัวอย่างโดยใช้ QIAcube Connect MDx เป็นไปตามขั้นตอนเดียวกับขั้นตอนแบบแมนนวล (นั่นคือ ทำให้แตกออก จับ ล้าง และชะล้าง) และสามารถทำได้โดยใช้ PAXgene Blood RNA Kit แบบเดียวกัน

รูปที่ 2: QIAcube Connect MDx

QIAGEN QIAcube Connect MDx ไม่มีจำหน่ายในบางประเทศ สำหรับรายละเอียดเพิ่มเติมกรุณาติดต่อฝ่ายบริการด้านเทคนิค QIAGEN

เกณฑ์วิธีในการแยก RNA แบบอัตโนมัติประกอบด้วย 2 ส่วน (หรือเกณฑ์วิธี) คือ “PAXgene Blood RNA Part A” (จากเลือดใน PAXgene Blood RNA Tube ไปที่การชะล้าง) และ "PAXgene Blood RNA Part B” (หลังจากชะล้างไปเป็น RNA พร้อมใช้งาน) โดยมีการแทรกแซงแบบแมนนวลสั้นๆ ระหว่าง 2 ส่วนนั้น (ดู รูปที่ 3, หน้า 11)



รูปที่ 3: ขั้นตอน PAXgene Blood RNA อัตโนมัติ

เม็ดกรดนิวคลีอิกที่ผ่านการหมุนเหวี่ยง ล้างและนำมาแขวนลอยใหม่ (ดู "การแยก RNA", หน้า 7) จะถูกถ่ายจาก PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ไปยังหลอดแปรรูป (processing tube, PT) ซึ่งถูกวางลงในชุดเครื่องให้ความร้อนแบบเขย่าบนโต๊ะทำงานของ QIAcube Connect MDx ผู้ปฏิบัติงานจะเลือกและเริ่มเกณฑ์วิธี "PAXgene Blood RNA Part A" จากเมนู QIAcube Connect MDx ดำเนินการตามขั้นตอนของเกณฑ์วิธีจนถึงการชะล้าง RNA ในบัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5) ผู้ปฏิบัติงานจะถ่าย MCT ที่มี RNA บริสุทธิ์ไปยังชุดเครื่องให้ความร้อนแบบเขย่าของ QIAcube Connect MDx ผู้ปฏิบัติงานจะเลือกและเริ่มเกณฑ์วิธี "PAXgene Blood RNA Part B" จากเมนูและ QIAcube Connect MDx จะดำเนินการแปลงสภาพด้วยความร้อน สามารถดูลักษณะการทำงานของการแยก RNA แบบอัตโนมัติโดยใช้ PAXgene Blood RNA System บน QIAcube Connect MDx ได้ที่หน้า 51

วัสดุที่จัดเตรียมให้

ส่วนประกอบที่มีในชุดอุปกรณ์

PAXgene Blood RNA Kit **หมายเลขแค็ตตาล็อก** **จำนวนอุปกรณ์เก็บตัวอย่าง**			**(50)** **762174** **50**
ชื่อส่วนประกอบ	**คำอธิบาย**	**สัญลักษณ์**	**ปริมาณ**
BR1	Resuspension Buffer (บัฟเฟอร์สำหรับแขวนลอย)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (บัฟเฟอร์สำหรับการจับ)*	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 1)*	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 2) (เข้มข้น)†	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (บัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (น้ำที่ปราศจาก RNase-Free) (ขวด)	PEL WASH	2 x 125 ml
PK	Proteinase K (โปรตีเนส K) (ฝาสีเขียว)	PROTK	2 x 1.4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (คอลัมน์สปิน PAXgene RNA) (สีแดง)‡	PAXgene RNA COL	5 x 10
PT	Processing Tubes (หลอดแปรรูป) (2 ml)§	PROC TUBE	6 x 50
Hemogard™	Secondary BD Hemogard Closures (ฝาปิด BD Hemogard ชั้นที่สอง)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (หลอดไมโครเซนติฟิวจ์) (1.5 ml)§	MIC TUBE	3 x 50, 1 x 10
RNFD	DNase I, RNase-free (DNase I ปราศจาก RNase) (ไลโอฟิไลซ์)	DNA REM	1500 หน่วย Kunitz
RDD	DNA Digestion Buffer (บัฟเฟอร์สำหรับการย่อย DNA) (ฝาสีขาว)	DNA DIG BUF	2 x 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (บัฟเฟอร์สำหรับการแขวนลอย DNase) (หลอด ฝาสีม่วง)	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (คอลัมน์สปิน PAXgene Shredder) (สีม่วง)‡	PAXgene SHRED COL	5 x 10
คู่มือ	คู่มือ PAXgene Blood RNA Kit (เวอร์ชัน 3)		1

* ไม่สามารถใช้ได้กับสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาฆ่าเชื้อที่มีสารฟอกขาว ประกอบด้วยเกลือควานิดีน ดูหน้า 17 สำหรับข้อมูลด้านความปลอดภัย

† บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 2 (BR4) จัดมาให้เป็นสารเข้มข้น ก่อนใช้ครั้งแรก ให้เติมเอทานอล 4 ปริมาตร (96–100% v/v, เกรดความบริสุทธิ์ p.a.) ตามที่ระบุไว้บนขวดเพื่อให้ได้สารละลายที่ใช้งานได้

‡ แต่ละคอลัมน์บรรจุอยู่ในแผงที่มีจุดประสงค์ให้ใช้เพียงครั้งเดียวเท่านั้น โปรดดูข้อมูลด้านความปลอดภัยสำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับการทิ้ง

§ มีหลอดบรรจุอยู่ในถุงพลาสติก และแต่ละหลอดมีจุดประสงค์ให้ใช้เพียงครั้งเดียวเท่านั้น โปรดดูข้อมูลด้านความปลอดภัยสำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับการทิ้ง

¶ หน่วย Kunitz เป็นหน่วยที่ใช้โดยทั่วไปสำหรับการวัด DNase I ซึ่งกำหนดเป็นปริมาณ DNase I ที่ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นใน A_{260} ของ 0.001 ต่อนาทีต่อมิลลิลิตรที่ 25°C, pH 5.0 โดยมี DNA พอลิเมอไรซ์สูงเป็นสารตั้งต้น (*Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. 33, 349 and 363*)

ส่วนประกอบของชุดอุปกรณ์

ชื่อส่วนประกอบ	คำอธิบาย	ส่วนประกอบออกฤทธิ์	ความเข้มข้น
BR1	Resuspension Buffer (บัฟเฟอร์สำหรับแขวนลอย)	ไม่มีเลย	-
BR2	Binding Buffer (บัฟเฟอร์สำหรับการจับ)	Guanidine thiocyanate	≥ 30 ถึง < 50% น้ำหนัก/น้ำหนัก
BR3	Wash Buffer 1 (บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 1)	กวานิดีน ไธโอไซยาเนต เอทานอล	≥ 10 ถึง < 20% น้ำหนัก/น้ำหนัก ≥ 3 ถึง < 10% น้ำหนัก/น้ำหนัก
BR4	Wash Buffer 2 (บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 2) (เข้มข้น)	ไม่มีเลย	-
BR5	Elution Buffer (บัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง)	ไม่มีเลย	-
RNFW	RNase-Free Water (น้ำที่ปราศจาก RNase-Free) (ขวด)	ไม่มีเลย	-
PK	Proteinase K (โปรตีเนส K) (ฝาสีเขียว)	โปรตีเนส K	≥ 1 ถึง < 3% น้ำหนัก/น้ำหนัก
RNFD	DNase I, RNase-free (DNase I ปราศจาก RNase) (ไลโอฟิไลซ์)	DNase	≥ 90 ถึง ≤ 100% น้ำหนัก/น้ำหนัก
RDD	DNA Digestion Buffer (บัฟเฟอร์สำหรับการย่อย DNA) (ฝาสีขาว)	ไม่มีเลย	-
DRB	DNase Resuspension Buffer (บัฟเฟอร์สำหรับการแขวนลอย DNase) (หลอด ฝาสีม่วง)	ไม่มีเลย	-

วัสดุที่ต้องใช้แต่ไม่ได้จัดไว้ให้

เมื่อทำงานกับสารเคมี ควรสวมเสื้อคลุมสำหรับห้องปฏิบัติการ ถุงมือแบบใช้แล้วทิ้งและแว่นตาป้องกันที่เหมาะสมเสมอ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดศึกษาเอกสารข้อมูลความปลอดภัย (Safety Data Sheet, SDS) ที่เหมาะสมจากผู้จัดจำหน่ายของผลิตภัณฑ์นั้น

สำหรับเกณฑ์วิธีทั้งหมด

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; หมายเลขแคตตาล็อก 762165)
- เอทานอล (96–100% v/v, เกรดความบริสุทธิ์ p.a.)
- ปิเปต* (10 µl – 4 ml)
- ทิปปิเปตปลอดเชื้อ กันละออง ปราศจาก RNase[†]
- กระบอกตวง[‡]
- เครื่องหมุนเหวี่ยง* สามารถหมุนได้ 3,000–5,000 x *g* และติดตั้งโรเตอร์แบบถังแกว่งสำหรับยึด PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- เครื่องผสมสารละลาย*
- น้ำแข็งเกล็ด
- ปากกาชนิดหมึกติดถาวรสำหรับปิดฉลาก

สำหรับเกณฑ์วิธีแบบแมนนวล

- ไมโครเซนติฟิวจ์ความเร็วรอบ* ที่สามารถทำความเร็วได้อย่างน้อยที่สุดในช่วง 1,000–8,000 x *g* แม้ว่าจะใช้แรง *g* ที่ต่ำกว่าและสูงกว่าก็ตาม (ดูขั้นตอนของเกณฑ์วิธีสำหรับรายละเอียด) และติดตั้งโรเตอร์สำหรับ MCT ขนาด 2 ml

* ตรวจสอบให้มั่นใจว่าอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ได้รับการตรวจสอบ บำรุงรักษาและสอบเทียบมาตรฐานเป็นประจำตามคำแนะนำของผู้ผลิต

† ตรวจสอบให้มั่นใจว่าคุณคุ้นเคยกับแนวปฏิบัติในการจัดการ RNA (ภาคผนวก A, หน้า 74)

‡ สำหรับการเติมเอทานอลลงในบัฟเฟอร์ BR4 เข้มข้น

- ตู้บ่มแบบเขย่า* สามารถบ่มที่อุณหภูมิ 55°C และ 65°C และเขย่าที่ ≥ 400 rpm ไม่เกิน 1,400 rpm (เช่น Eppendorf® Thermomixer Compact หรือเทียบเท่า)

สำหรับเกณฑ์วิธีแบบอัตโนมัติ

- กรรไกร
- QIAcube Connect MDx* (QIAGEN, หมายเลขแคตตาล็อก 9003070)

วัสดุสิ้นเปลืองสำหรับ QIAcube Connect MDx:

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

อุปกรณ์เสริมสำหรับ QIAcube Connect MDx:

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, หมายเลขแคตตาล็อก 990392)†

รวมชุดบริการ QIAcube Connect MDx:

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

* ตรวจสอบให้มั่นใจว่าอุปกรณ์และเครื่องมือนั้นได้รับการตรวจสอบ บำรุงรักษาและสอบเทียบมาตรฐานเป็นประจำตามคำแนะนำของผู้ผลิต

† รวมอยู่ใน Starter Pack, QIAcube ด้วย (QIAGEN, หมายเลขแคตตาล็อก 990395)

คำเตือนและข้อควรระวัง

สำหรับลูกค้าในสหภาพยุโรป โปรดทราบว่าคุณต้องรายงานเหตุการณ์ร้ายแรงที่เกิดขึ้นซึ่งเกี่ยวข้องกับอุปกรณ์ไปยังผู้ผลิตและหน่วยงานกำกับดูแลของประเทศสมาชิกที่ผู้ใช้และ/หรือผู้ป่วยนั้นตั้งอยู่

สำหรับลูกค้านอกสหภาพยุโรป โปรดทราบว่าคุณอาจต้องอ่านข้อกำหนดในท้องถิ่นของคุณสำหรับการรายงานเหตุการณ์ร้ายแรงที่ได้เกิดขึ้นเกี่ยวกับอุปกรณ์ไปยังผู้ผลิตและ/หรือตัวแทนผู้ได้รับมอบอำนาจของผู้ผลิต และรายงานหน่วยงานกำกับดูแลที่ผู้ใช้และ/หรือผู้ป่วยตั้งอยู่

ข้อมูลด้านความปลอดภัย

เมื่อทำงานกับสารเคมีและวัสดุที่เป็นอันตรายทางชีวภาพ ต้องสวมเสื้อคลุมสำหรับห้องปฏิบัติการ ถุงมือแบบใช้แล้วทิ้ง และแว่นตาป้องกันที่เหมาะสมเสมอ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดศึกษาเอกสารข้อมูลความปลอดภัย (Safety Data Sheet, SDS) ที่เหมาะสม เอกสารเหล่านี้มีให้บริการทางออนไลน์ในรูปแบบ PDF ที่สะดวกและกะทัดรัดที่ **www.qiagen.com/safety** ซึ่งคุณสามารถค้นหา ดู และพิมพ์ SDS ของชุดอุปกรณ์ QIAGEN และส่วนประกอบชุดอุปกรณ์แต่ละรายการได้

- สารเคมีและวัสดุชีวภาพทั้งหมดอาจเป็นอันตรายได้ สิ่งส่งตรวจและตัวอย่างที่เป็นเลือดอาจเป็นสิ่งติดเชื้อได้ และต้องปฏิบัติต่อสิ่งเหล่านี้อย่างวัสดุที่เป็นอันตรายทางชีวภาพ
- ให้ทิ้งของเสียที่เป็นอันตรายทางชีวภาพและของเสียจากชุดอุปกรณ์ตามขั้นตอนความปลอดภัยในท้องถิ่นของคุณ

ข้อมูลฉุกเฉิน

CHEMTREC
นอกประเทศสหรัฐอเมริกาและแคนาดา +1 703-527-3887

ข้อควรระวังป้องกัน

ขณะทำงานกับเลือดใช้การระวังป้องกันการติดเชื้อแบบสากลเพื่อหลีกเลี่ยงความเสี่ยงจากเชื้อที่สามารถติดต่อได้ทางเลือด (เช่น HIV ไวรัสตับอักเสบบี และไวรัสที่ติดต่อได้ทางเลือดอื่นๆ) ใช้ถุงมือ เสื้อคลุม แว่นป้องกันดวงตา และอุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคลอื่นๆ และการควบคุมทางวิศวกรรมเพื่อป้องกันการสัมผัสเลือด สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดศึกษาเอกสารข้อมูลความปลอดภัย (Safety Data Sheet, SDS) ที่เหมาะสม เอกสารเหล่านี้มีให้บริการทางออนไลน์ในรูปแบบ PDF ที่สะดวกและกะทัดรัดที่ **www.preanalytix.com** ซึ่งคุณสามารถค้นหา ชม และพิมพ์ SDS สำหรับชุดอุปกรณ์นี้ได้

ข้อควรระวัง

อย่าเติมสารฟอกขาวหรือสารละลายที่เป็นกรดลงในของเสียจากการเตรียมตัวอย่างโดยตรง

บัฟเฟอร์สำหรับการจับ (BR2) และบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 1 (BR3) มี Guanidine Thiocyanate ซึ่งสามารถสร้างสารประกอบที่มีปฏิกิริยาสูงเมื่อรวมกับสารฟอกขาว หากบัฟเฟอร์สำหรับการจับ (BR2) หรือบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 1 (BR3) หกกระจาย ให้ทำความสะอาดด้วยผงซักฟอกและน้ำในห้องปฏิบัติการที่เหมาะสม หากของเหลวที่มีสารที่อาจทำให้เกิดการติดเชื้อกระจาย ให้ทำความสะอาดบริเวณที่ได้รับผลกระทบด้วยผงซักฟอกและน้ำในห้องปฏิบัติการเป็นอันดับแรก จากนั้นจึงใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (สารฟอกขาว) 1% (v/v)

สารละลายที่ทำให้ RNA คงตัวและส่วนผสมของเลือดจาก PAXgene Blood RNA Tube (BRT) สามารถฆ่าเชื้อโดยใช้สารละลายฟอกขาวเชิงพาณิชย์ 1 ปริมาตร (โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5%) ต่อ 9 ปริมาตรของสารละลายที่ทำให้ RNA คงตัวและส่วนผสมของเลือด

ของเสียจากการเตรียมตัวอย่าง เช่น ของเหลวเหนือตะกอนจากขั้นตอนการหมุนเหวี่ยงในขั้นตอนการแยก RNA ให้พิจารณาว่าอาจทำให้มีการติดเชื้อได้ ใช้ภาชนะบรรจุสารที่เป็นอันตรายทางชีวภาพเพื่อทิ้งวัสดุชีวภาพ การทิ้งขยะต้องทำตามกฎระเบียบและขั้นตอนในท้องถิ่นของสถานที่ปฏิบัติงานของคุณ

ส่วนประกอบเฉพาะบางอย่างของ PAXgene Blood RNA Kit มีวัตถุประสงค์ให้ใช้เพียงครั้งเดียวเท่านั้น ดูส่วนประกอบที่มีในชุดอุปกรณ์ที่หน้า 13 สำหรับข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับส่วนประกอบแต่ละอย่าง

ข้อความแสดงความเป็นอันตรายและข้อควรระวังต่อไปนี้ใช้กับส่วนประกอบของ PAXgene Blood RNA Kit ดูคู่มือ *PAXgene Blood RNA Tube* สำหรับข้อมูลด้านความปลอดภัยเกี่ยวกับ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Buffer BR2

ประกอบด้วย: Guanidine Thiocyanate อันตราย! อันตรายหากกลืนกินเข้าไป อาจเป็นอันตรายเมื่อสัมผัสกับผิวหนังหรือเมื่อหายใจเข้าไป ทำลายดวงตาอย่างรุนแรง เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำโดยมีผลกระทบในระยะยาวได้ การสัมผัสกับกรดจะทำให้มีการปล่อยก๊าซที่เป็นพิษมาก สวมถุงมือป้องกัน/ชุดป้องกัน/แว่นป้องกันดวงตา/หน้ากากป้องกันใบหน้า หากเข้าตา: ให้ใช้น้ำสะอาดล้างตาอย่างระมัดระวังเป็นเวลาหลายนาที หากใส่คอนแทคเลนส์ ให้ถอดออกก่อน หากทำได้โดยง่าย แล้วจึงทำการล้างตาต่อไป ติดต่อศูนย์พิษวิทยาหรือหมอ/ แพทย์ทันที

Buffer BR3

ประกอบด้วย: เอทานอล; Guanidine Thiocyanate อันตราย! ของเหลวและไอระเหยไวไฟ ทำลายดวงตาอย่างรุนแรง การสัมผัสกับกรดจะทำให้มีการปล่อยก๊าซที่เป็นพิษมาก เก็บให้ห่างจากความร้อน/ประกายไฟ/เปลวไฟ/พื้นผิวที่ร้อน ห้ามสูบบุหรี่ สวมถุงมือป้องกัน / ชุดป้องกัน/แว่นป้องกันดวงตา / หน้ากากป้องกันใบหน้า หากเข้าตา: ให้ใช้น้ำสะอาดล้างตาอย่างระมัดระวังเป็นเวลาหลายนาที หากใส่คอนแทคเลนส์ ให้ถอดออกก่อน หากทำได้โดยง่าย แล้วจึงทำการล้างตาต่อไป ติดต่อศูนย์พิษวิทยาหรือหมอ/แพทย์ทันที

DNase I

ประกอบด้วย: DNase อันตราย! อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาการแพ้ที่ผิวหนัง หากสูดหายใจเข้าไปอาจทำให้เกิดอาการแพ้ หรืออาการหอบหืด หรือหายใจลำบาก หลีกเลี่ยงการหายใจเอาฝุ่น/ควัน/ก๊าซ/ละออง/ไอระเหย/สเปรย์เข้าไป สวมถุงมือป้องกัน / ชุดป้องกัน / แว่นป้องกันดวงตา / หน้ากากป้องกันใบหน้า ให้สวมใส่อุปกรณ์ป้องกันระบบทางเดินหายใจ หากมีการสัมผัสหรือเกี่ยวข้อง: ติดต่อศูนย์พิษวิทยาหรือหมอ/ แพทย์ เคลื่อนย้ายผู้ป่วยไปยังที่ที่มีอากาศบริสุทธิ์และให้พักในท่าที่หายใจได้สะดวก

Proteinase K

ประกอบด้วย: โปรติเนส K อันตราย! ก่อให้เกิดการระคายเคืองผิวหนังเล็กน้อยได้ หากสูดหายใจเข้าไปอาจทำให้เกิดอาการแพ้หรืออาการหอบหืด หรือหายใจลำบาก หลีกเลี่ยงการหายใจเอาฝุ่น/ควัน/ก๊าซ/ละออง/ไอระเหย/สเปรย์เข้าไป สวมถุงมือป้องกัน/ชุดป้องกัน/ แว่นป้องกันดวงตา/หน้ากากป้องกันใบหน้า ให้สวมใส่อุปกรณ์ป้องกันระบบทางเดินหายใจ หากมีการสัมผัสหรือเกี่ยวข้อง: ติดต่อศูนย์พิษวิทยาหรือหมอ/แพทย์ เคลื่อนย้ายผู้ป่วยไปยังที่ที่มีอากาศบริสุทธิ์และให้พักในท่าที่หายใจได้สะดวก

การจัดเก็บและการจัดการน้ำยา

ควรจัดเก็บสปินคอลัมน์ PAXgene RNA (PRC), สปินคอลัมน์ PAXgene Shredder (PSC), โปรตีเนส K (PK) และบัฟเฟอร์ (BR1, BR2, BR3, BR4 และ BR5) ไว้ในที่แห้งตามอุณหภูมิที่ระบุบนฉลากชุดอุปกรณ์

RNase-Free DNase Set ซึ่งประกอบด้วย DNase I (RNFD), บัฟเฟอร์สำหรับการย่อย DNA (RDD) และบัฟเฟอร์สำหรับการแขวนลอย Dnase (DRB) จะถูกจัดส่งที่อุณหภูมิแวดล้อม จัดเก็บส่วนประกอบทั้งหมดของ RNase-Free DNase Set ทันทีที่ได้รับที่อุณหภูมิที่ระบุบนฉลาก เมื่อจัดเก็บอย่างเหมาะสม ชุดอุปกรณ์จะคงตัวจนถึงวันหมดอายุบนกล่องชุดอุปกรณ์

ควรใส่ใจต่อวันหมดอายุและสภาวะการจัดเก็บที่พิมพ์อยู่บนกล่องและฉลากของชิ้นส่วนประกอบทั้งหมด ห้ามใช้ชิ้นส่วนประกอบที่จัดเก็บอย่างไม่ถูกต้องหรือหมดอายุแล้ว

ความคงตัวขณะใช้งาน

หลังจากใช้ชุดอุปกรณ์ครั้งแรก ตัวกระทำปฏิกิริยาจะมีความคงตัวในขวดที่ใส่มาตั้งแต่ต้นที่อุณหภูมิตามที่ระบุไว้บนฉลากกล่องอุปกรณ์และจนกระทั่งถึงวันหมดอายุตามที่ระบุบนฉลาก

ตัวกระทำปฏิกิริยาที่ใส่ลงในขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาของ QIAcube Connect MDx จะคงตัวอยู่นาน 3 เดือนในการจัดเก็บที่อุณหภูมิห้อง (15–25°C)

DNase I ที่สร้างขึ้นใหม่ (RNFD) มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 2–8°C นาน 6 สัปดาห์ในขวดแก้วที่บรรจุมาตั้งแต่แรก (สารละลายเข้มข้น)

ส่วนย่อยสำหรับใช้ครั้งเดียวของสารละลายเข้มข้นใน MCT ขนาด 1.5 ml (จัดให้ในชุดอุปกรณ์) จะคงตัวนาน 9 เดือนในการจัดเก็บที่ -20°C หลังจากละลายแล้วส่วนย่อยสำหรับใช้ครั้งเดียวจะคงตัวนาน 6 สัปดาห์ในการจัดเก็บที่อุณหภูมิ 2–8°C

การเก็บตัวอย่าง การจัดเก็บ และการจัดการสิ่งส่งตรวจ

PAXgene Blood RNA Kit เป็นชุดอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับเลือดที่เก็บใน PAXgene Blood RNA Tubes ต้องเก็บเลือดใน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ตามคำแนะนำในคู่มือ PAXgene Blood RNA Tube หากจำเป็น ดูภาคผนวก C (หน้า 77) สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับการจัดการ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ตัวอย่างทั้งหมดควรได้รับการปฏิบัติว่าอาจเป็นอันตราย ลักษณะการทำงานของ PAXgene Blood RNA System ได้รับการกำหนดขึ้นด้วยการคัดลอกยีน FOS และ IL1B ซึ่งสามารถดูได้ที่หน้า 39–42

เกณฑ์วิธี: การแยก RNA ทั้งหมดแบบแมนนวลจากเลือดครบส่วนของมนุษย์ที่เก็บตัวอย่างไว้ใน PAXgene Blood RNA Tubes

ประเด็นสำคัญก่อนเริ่ม

- ตรวจสอบให้มั่นใจว่ากล่องชุดอุปกรณ์ไม่บุบสลายและไม่เสียหาย และบัฟเฟอร์ไม่รั่วไหล อย่าใช้ชุดอุปกรณ์ที่ได้รับความเสียหาย
- เมื่อใช้ปิเปต ตรวจสอบให้มั่นใจว่าตั้งค่าเป็นปริมาตรที่ถูกต้องและมีการดูดและจ่ายของเหลวนั้นอย่างระมัดระวังและสมบูรณ์
- เพื่อหลีกเลี่ยงการถ่ายโอนตัวอย่างไปยังหลอดหรือคอลัมน์สปินที่ไม่ถูกต้อง ตรวจสอบให้มั่นใจว่าหลอดและคอลัมน์สปินทั้งหมดปิดฉลากอย่างถูกต้องโดยใช้ปากกาชนิดหมึกติดถาวร ปิดฉลากที่ฝาและตัวของแต่ละหลอด (PT, MCT) สำหรับคอลัมน์สปิน ให้ปิดฉลากที่ตัว PT ของคอลัมน์ ปิดหลอดหรือคอลัมน์สปินแต่ละอันหลังจากถ่ายโอนของเหลวเข้าไป
- การรั่วไหลของตัวอย่างและบัฟเฟอร์ในระหว่างขั้นตอนอาจทำให้ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ RNA ลดลง
- ขั้นตอนทั้งหมดของเกณฑ์วิธีนี้รวมถึงขั้นตอนการหมุนเหวี่ยง ควรดำเนินการที่อุณหภูมิห้อง (15-25°C) เว้นแต่จะระบุไว้เป็นอย่างอื่น

เนื่องจากความไวของเทคโนโลยีการขยายกรดนิวคลีอิก จึงจำเป็นต้องมีข้อควรระวังต่อไปนี้ในการจัดการตัวอย่างเพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนข้าม:

- ปิเปตตัวอย่างลงในคอลัมน์สปิน (PSC, PRC) อย่างระมัดระวังโดยไม่ทำให้ขอบของคอลัมน์เปียกชื้น
- เปลี่ยนทิปปิเปตเสมอระหว่างการถ่ายโอนของเหลว ใช้ทิปปิเปตป้องกันละอองลอย
- หลีกเลี่ยงการสัมผัสเมมเบรนคอลัมน์สปิน (PSC, PRC) ด้วยทิปปิเปต
- หลังจากหมุนวนหรือให้ความร้อนกับ MCT ให้หมุนเหวี่ยงสั้นๆ เพื่อขจัดหยดสารจากด้านในของฝา

- สวมถุงมือตลอดกระบวนการทั้งหมด ในกรณีที่ถุงมือกับตัวอย่างสัมผัสกัน ให้เปลี่ยนถุงมือทันที
- ปิดคอลัมน์สปิน (PSC, PRC) ก่อนวางลงในไมโครเซนติฟิวจ์ หมุนเหวี่ยงตามที่อธิบายไว้ในขั้นตอน
- เปิดคอลัมน์สปินเพียงครั้งละหนึ่งคอลัมน์ (PSC, PRC) และระวังเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดละอองลอย
- สำหรับการประมวลผลหลายตัวอย่างแบบขนานที่มีประสิทธิภาพ ให้เติมชั้นวางด้วย PT ซึ่งสามารถถ่ายโอนคอลัมน์สปิน (PSC, PRC) ได้หลังจากการหมุนเหวี่ยง ทิ้ง PT ใช้แล้วที่มีสิ่งไหลผ่านอยู่ และวางคอลัมน์สปิน (PSC, PRC) ลงใน PT ใหม่ก่อนถ่ายโอนกลับไปยังไมโครเซนตริฟิวจ์

สิ่งที่ต้องทำก่อนเริ่ม

- ต้องเก็บเลือดใน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ตามคำแนะนำในคู่มือ *PAXgene Blood RNA Tube* หากจำเป็น ดูภาคผนวก C (หน้า 77) สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับการจัดการ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- ตรวจสอบให้มั่นใจว่า PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ได้รับการบ่มอย่างน้อย 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องหลังการเก็บเลือดเพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์เม็ดเลือดแตกสมบูรณ์และมีการตกตะกอนของ RNA การบ่มโดย PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ตลอดคืนอาจเพิ่มปริมาณได้ หากไม่ได้ทำการบ่มเลือดเบื้องต้นที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมงก่อนการจัดเก็บที่ 2–8°C, –20°C หรือ –70°C, ให้ทำการปรับ PAXgene Blood RNA Tube (BRT) จนอยู่ที่อุณหภูมิห้องเสียก่อนแล้วจึงค่อยบ่มที่อุณหภูมินี้นาน 2 ชั่วโมงก่อนเริ่มทำตามขั้นตอน
- อ่านข้อมูลความปลอดภัยในหน้า 17
- อ่านคำแนะนำเกี่ยวกับการจัดการ RNA (ภาคผนวก A, หน้า 74)
- ตรวจสอบให้มั่นใจว่าเครื่องมือต่างๆ เช่น ปิเปตและตู้บ่มแบบเขย่าได้รับการตรวจสอบและสอบเทียบมาตรฐานเป็นประจำตามคำแนะนำของผู้ผลิต
- ต้องใช้ตู้บ่มแบบเขย่าในขั้นตอนที่ 5 และ 20 ตั้งอุณหภูมิของตู้บ่มแบบเขย่าเป็น 55°C
- บัฟเฟอร์สำหรับการจับ (BR2) อาจก่อตัวเป็นตะกอนเมื่อจัดเก็บ ถ้าจำเป็นให้อุ่นที่ 37°C เพื่อละลาย

- บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 2 (BR4) จัดมาให้เป็นสารเข้มข้น ก่อนใช้ครั้งแรก ให้เติมเอทานอล 4 ปริมาตร (96–100% v/v, เกรดความบริสุทธิ์ p.a.) ตามที่ระบุไว้บนขวดเพื่อให้ได้สารละลายที่ใช้งานได้
- หากใช้ RNase-Free DNase Set เป็นครั้งแรก ให้เตรียมสารละลายเข้มข้น DNase I ละลายของแข็ง DNase I (RNFD; 1500 หน่วย Kunitz)* ในบัฟเฟอร์สำหรับการแขวนลอย Dnase (DRB) 550 µl ที่ให้มาพร้อมกับชุดอุปกรณ์ ระวังอย่าให้ DNase I (RNFD) หายไปเมื่อเปิดขวด อย่าหมุนวน DNase I (RNFD) ที่สร้างขึ้นใหม่ DNase I มีความไวต่อการแปลงสภาพทางกายภาพเป็นพิเศษ การผสมควรทำโดยการพลิกขวดเบาๆ เท่านั้น
- DNase I ที่สร้างขึ้นใหม่ (RNFD) สามารถจัดเก็บได้ที่ 2–8°C ในขวดแก้วที่บรรจุมาตั้งแต่ต้น (สารละลายเข้มข้น) หรือที่ –20°C หลังจากนำสารละลายเข้มข้นออกจากขวดแก้วแล้วแบ่งเป็นส่วนย่อยสำหรับใช้ครั้งเดียว (ใช้ MCT ขนาด 1.5 ml ที่ให้มาพร้อมชุดอุปกรณ์ จะมีจำนวนมากพอแบ่งเป็นส่วนย่อยได้ 5 ส่วน) ส่วนย่อยที่ละลายแล้วสามารถจัดเก็บได้ที่ 2–8°C ห้ามนำส่วนย่อยไปแช่แข็งซ้ำอีกหลังจากละลายแล้ว
- ขณะที่ทำการสร้างใหม่และแยกส่วนย่อยของ DNase I (RNFD) ตรวจสอบให้มั่นใจว่าคุณปฏิบัติตามคำแนะนำในการจัดการ RNA (ภาคผนวก A, หน้า 74)

กระบวนการ

1. หมุนเหวี่ยง PAXgene Blood RNA Tube (BRT) เป็นเวลา 10 นาทีที่ 3,000–5,000 x *g* โดยใช้โรเตอร์แบบถังแกว่ง

   ตรวจสอบให้มั่นใจว่าได้บ่มตัวอย่างเลือดในหลอด PAXgene Blood RNA Tube (BRT) เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (15–25°C) เพื่อให้ได้เซลล์เม็ดเลือดแตกอย่างสมบูรณ์และมีการตกตะกอนของ RNA

   โรเตอร์ต้องมีอะแดปเตอร์หลอดสำหรับหลอดก้นกลม หากใช้อะแดปเตอร์หลอดชนิดอื่น หลอดอาจแตกระหว่างการหมุนเหวี่ยง

* หน่วย Kunitz เป็นหน่วยที่ใช้โดยทั่วไปสำหรับการวัด DNase I ซึ่งกำหนดเป็นปริมาณ DNase I ที่ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นใน A_{260} ของ 0.001 ต่อนาทีต่อมิลลิลิตรที่ 25°C, pH 5.0 โดยมี DNA พอลิเมอไรซ์สูงเป็นสารตั้งต้น (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 และ 363)

2. นำส่วนเหนือตะกอนออกโดยการรินหรือปิเปต เติมน้ำปราศจาก RNase (RNFW) 4 ml ลงในเม็ดและปิดหลอดโดยใช้แผ่นปิด BD Hemogard รองใหม่ (ให้มาพร้อมกับชุดอุปกรณ์) หากรินสารเหนือตะกอน ให้ระวังอย่ารบกวนเม็ดและเช็ดขอบหลอดให้แห้งด้วยกระดาษเช็ดมือที่สะอาด
3. หมุนวนจนกว่าเม็ดจะละลายอย่างเห็นได้ชัดและหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาทีที่ 3,000–5,000 x *g* โดยใช้โรเตอร์แบบถังแกว่ง นำส่วนเหนือตะกอนทั้งหมดออกและทิ้ง เศษเล็กเศษน้อยที่เหลืออยู่ในส่วนเหนือตะกอนหลังจากการหมุนวน แต่ก่อนการหมุนเหวี่ยงจะไม่ส่งผลกระทบต่อขั้นตอน

   การกำจัดส่วนเหนือตะกอนที่ไม่สมบูรณ์จะยับยั้งการแตกตัวและทำให้ไลเสตเจือจางลงดังนั้นจึงส่งผลต่อเงื่อนไขในการจับ RNA กับเมมเบรน PAXgene
4. เติมบัฟเฟอร์สำหรับการแขวนลอย (BR1) 350 µl และหมุนวนจนเม็ดละลายอย่างเห็นได้ชัด
5. ปิเปตตัวอย่างลงใน MCT ขนาด 1.5 ml เพิ่มบัฟเฟอร์สำหรับการจับ (BR2) 300 µl และโปรติเนส K (PK) 40 µl ผสมโดยการหมุนวนเป็นเวลา 5วินาที และบ่มเป็นเวลา 10 นาทีที่ 55°C โดยใช้ตู้บ่มแบบเขย่าที่ 400–1,400 rpm หลังจากการบ่ม ให้ตั้งอุณหภูมิของตู้บ่มแบบเขย่าเป็น 65°C (สำหรับขั้นตอนที่ 20)

   อย่าผสมบัฟเฟอร์สำหรับการจับ (BR2) และ โปรติเนส K (PK) เข้าด้วยกันก่อนที่จะเพิ่มลงในตัวอย่าง
6. ปิเปตไลเซทลงใน PSC (สีม่วง) ที่วางไว้ใน PT ขนาด 2 ml โดยตรง และหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 3 นาทีด้วยความเร็วสูงสุด (แต่ไม่เกิน 20,000 x *g*)

   ปิเปตไลเซทลงในคอลัมน์สปิน (PSC) อย่างระมัดระวังและตรวจสอบด้วยสายตาว่าไลเซทถูกถ่ายโอนไปยังคอลัมน์สปิน (PSC) อย่างสมบูรณ์

   เพื่อป้องกันความเสียหายของ Column (PSC) และหลอด (PT) ห้ามเกิน 20,000 x *g*

   บางตัวอย่างอาจไหลผ่าน PSC โดยไม่มีการหมุนเหวี่ยง นี้เนื่องจากบางตัวอย่างมีความหนืดต่ำและไม่ควรนำมาเป็นตัวบ่งชี้ความล้มเหลวของผลิตภัณฑ์
7. ถ่ายส่วนเหนือตะกอนทั้งหมดของส่วนการไหลผ่านอย่างระมัดระวังไปยัง MCT ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่โดยไม่รบกวนเม็ดใน PT

8. เติมเอทานอล 350 µl (96–100% v/v, เกรดบริสุทธิ์ p.a.) ผสมโดยการหมุนวนและหมุนเหวี่ยงสั้นๆ (1–2 วินาทีที่ 500–1,000 x *g*) เพื่อขจัดหยดสารจากด้านในของฝาหลอด

   ระยะเวลาของการหมุนเหวี่ยงต้องไม่เกิน 1–2 วินาทีเนื่องจากอาจทำให้กรดนิวคลีอิกอัดเป็นเม็ดและปริมาณ RNA ทั้งหมดที่จะได้ลดลง

9. ปิเปตตัวอย่าง 700 µl ลงใน PRC (สีแดง) ที่วางไว้ใน PT ขนาด 2 ml และหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาทีที่ 8,000–20,000 x *g* วางคอลัมน์สปิน (PRC) ใน PT ขนาด 2 ml หลอดใหม่และทิ้ง PT เดิมที่มีสารไหลผ่านอยู่
10. ปิเปตตัวอย่างที่เหลือลงใน PRC และหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาทีที่ 8,000–20,000 x *g* วางคอลัมน์สปิน (PRC) ใน PT ขนาด 2 mlหลอดใหม่ และทิ้ง PTเดิมที่มีสารไหลผ่านอยู่

    ปิเปตตัวอย่างลงในคอลัมน์สปิน (PRC) อย่างระมัดระวังและตรวจสอบด้วยสายตาว่าตัวอย่างถูกถ่ายไปยังคอลัมน์สปิน (PRC) อย่างสมบูรณ์

11. ปิเปตบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 1 (BR3) จำนวน 350 µl ลงใน PRC หมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาทีที่ 8,000–20,000 x *g* วางคอลัมน์สปิน (PRC) ใน PT ขนาด 2 ml หลอดใหม่และทิ้ง PT เดิมที่มีสารไหลผ่านอยู่
12. เติมสารละลายเข้มข้น DNase I (RNFD) 10 µl ลงในบัฟเฟอร์สำหรับการย่อย DNA (RDD) 70 µl ใน MCT ขนาด 1.5 ml ผสมโดยการสะบัดหลอดเบาๆ และหมุนเหวี่ยงสั้นๆ เพื่อรวบรวมของเหลวที่เหลือจากด้านข้างของหลอด

    ตัวอย่างเช่น หากประมวลผล 10 ตัวอย่าง ให้เพิ่มสารละลายเข้มข้น DNase I (RNFD) 100 µl ลงใน บัฟเฟอร์สำหรับการย่อย DNA (RDD) 700 µl ใช้ MCT ขนาด 1.5 ml ที่ให้มาพร้อมชุดอุปกรณ์

    DNase I มีความไวต่อการแปลงสภาพทางกายภาพเป็นพิเศษ การผสมควรทำโดยการสะบัดหลอดเบาๆ เท่านั้น อย่าหมุนวน

13. ปิเปตส่วนผสมการบ่ม DNase I (RNFD) (80 µl) ลงบนเมมเบรน PRC โดยตรงและวางบนโต๊ะที่ตั้ง (20–30°C) เป็นเวลา 15 นาที

    ตรวจสอบให้มั่นใจว่าส่วนผสมการบ่ม DNase I (RNFD) ถูกวางลงบนเมมเบรนโดยตรง การย่อย DNase จะไม่สมบูรณ์หากส่วนหนึ่งของส่วนผสมถูกใช้และยังคงอยู่บนผนังหรือโอริงของคอลัมน์สปิน (PRC)

14. ปิเปตบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 1 (BR3) จำนวน 350 µl ลงใน PRC และหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาทีที่ 8,000–20,000 x *g* วางคอลัมน์สปิน (PRC) ใน PT ขนาด 2 ml หลอดใหม่ และทิ้ง PTเดิมที่มีสารไหลผ่านอยู่
15. ปิเปตบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 2 (BR4) จำนวน 500 µl ลงใน PRC และหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาทีที่ 8,000–20,000 x *g* วางคอลัมน์สปิน (PRC) ใน PT ขนาด 2 ml หลอดใหม่ และทิ้ง PTเดิมที่มีสารไหลผ่านอยู่

    บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 2 (BR4) จัดมาให้เป็นสารเข้มข้น ตรวจสอบให้มั่นใจว่าได้เติมเอทานอลลงในบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 2 (BR4) ก่อนใช้ (ดู"สิ่งที่ต้องทำก่อนเริ่ม", หน้า 24)
16. เติมบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 2 (BR4) อีก 500 µl ลงใน PRC หมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 3 นาทีที่ 8,000–20,000 x *g*
17. ทิ้ง PT ที่มีสารไหลผ่าน แล้ววาง PRC ใน PT ขนาด 2 ml หลอดใหม่ หมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาทีที่ 8,000–20,000 x *g*
18. ทิ้ง PT ที่มีสารไหลผ่าน วาง PRC ใน MCT ขนาด 1.5 ml และปิเปตบัฟเฟอร์สำหรับชะล้าง (BR5) 40 µl ลงบนเมมเบรนของ PRC โดยตรง หมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาทีที่ 8,000–20,000 x *g* เพื่อชะล้าง RNA

    สิ่งสำคัญคือต้องทำให้เมมเบรนทั้งหมดเปียกด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5) เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการชะล้างสูงสุด
19. ทำขั้นตอนการชะล้างซ้ำ (ขั้นตอนที่ 18) ตามที่อธิบายโดยใช้บัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5) 40 µl และ MCT หลอดเดียวกัน
20. บ่มการชะล้างเป็นเวลา 5 นาทีที่ 65°C ในตู้บ่มแบบเขย่า (จากขั้นตอนที่ 5) โดยไม่ต้องเขย่า หลังจากการบ่มแล้ว ทำให้เย็นลงบนน้ำแข็งทันที

    การบ่มที่อุณหภูมิ 65°C นี้จะแปลงสภาพ RNA สำหรับแอปพลิเคชันดาวน์สตรีม แม้ว่าแอปพลิเคชันดาวน์สตรีมจะมีขั้นตอนการแปลงสภาพความร้อน อย่าละเว้นขั้นตอนนี้ การแปลงสภาพ RNA อย่างเพียงพอที่จุดนี้เป็นสิ่งจำเป็นต่อการได้ประสิทธิภาพสูงสุดในแอปพลิเคชันดาวน์สตรีม

    อย่าให้เกินเวลาหรืออุณหภูมิการบ่ม

21. หากไม่ได้ใช้ตัวอย่าง RNA ทันที ให้จัดเก็บที่อุณหภูมิ –20°C หรือ –70°C

    เนื่องจาก RNA ยังคงแปลงสภาพหลังจากการแช่แข็งและการละลายซ้ำ จึงไม่จำเป็นต้องทำการบ่มซ้ำที่ 65°C หากใช้ตัวอย่าง RNA ในการตรวจวินิจฉัย ให้ทำตามคำแนะนำที่จัดทำโดยผู้ผลิต

    สำหรับการหาปริมาณ RNA ที่แม่นยำโดยการดูดซับที่ 260 nm เราขอแนะนำให้เจือจางตัวอย่างด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.5* การเจือจางตัวอย่างในน้ำที่ปราศจาก RNase อาจทำให้ได้ค่าต่ำอย่างไม่ถูกต้อง

    ปรับเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เป็นศูนย์โดยใช้ช่องว่างที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5) และ บัฟเฟอร์ Tris-HCl ในสัดส่วนเดียวกับในตัวอย่างที่จะวัด บัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5) มีการดูดซับสูงที่ 220 nm ซึ่งอาจทำให้ระดับการดูดซับพื้นหลังสูงหากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ไม่ได้รับการปรับค่าเป็นศูนย์อย่างเหมาะสม

    สำหรับการหาปริมาณใน บัฟเฟอร์ Tris-HCl ให้ใช้ความสัมพันธ์ A_{260} = 1 ⇒ 44 µg/ml ดูภาคผนวก B, หน้า 75

22. ปิดฝาขวดทั้งหมดที่ใส่บัฟเฟอร์และน้ำปราศจาก RNase ขวดแก้ว และหลอดใส่เอนไซม์และบัฟเฟอร์เอนไซม์ และถึงใส่วัสดุพลาสติกจากชุดอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับเกณฑ์วิธีนี้ จัดเก็บส่วนประกอบที่เหลือของชุดอุปกรณ์ตามที่อธิบายไว้ในหัวข้อ "การจัดเก็บและการจัดการน้ำยา" (หน้า 21) และ "ความคงตัวขณะใช้งาน" (หน้า 21) จนกว่าจะใช้ต่อไป

* เมื่อทำงานกับสารเคมี ควรสวมเสื้อคลุมสำหรับห้องปฏิบัติการ ถุงมือแบบใช้แล้วทิ้ง และแว่นตาป้องกันที่เหมาะสมเสมอ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดศึกษาเอกสารข้อมูลความปลอดภัย (Safety Data Sheet, SDS) ที่เหมาะสมจากผู้จัดจำหน่ายของผลิตภัณฑ์นั้น

เกณฑ์วิธี: การแยก RNA ทั้งหมดแบบอัตโนมัติจากเลือดครบส่วนของมนุษย์ที่เก็บตัวอย่างไว้ใน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

ประเด็นสำคัญก่อนเริ่ม

- ตรวจสอบให้มั่นใจว่ากล่องชุดอุปกรณ์ไม่บุบสลายและไม่เสียหาย และบัฟเฟอร์ไม่รั่วไหล อย่าใช้ชุดอุปกรณ์ที่ได้รับความเสียหาย
- เมื่อใช้ปิเปต ตรวจสอบให้มั่นใจว่าตั้งค่าเป็นปริมาตรที่ถูกต้องและมีการดูดและจ่ายของเหลวนั้นอย่างระมัดระวังและสมบูรณ์
- เพื่อหลีกเลี่ยงการถ่ายตัวอย่างไปยังหลอดและวัสดุสิ้นเปลืองพลาสติกที่ไม่ถูกต้อง ตรวจสอบให้มั่นใจว่า PT, MCT และโรเตอร์อะแดปเตอร์ทั้งหมดติดฉลากอย่างถูกต้อง โดยใช้ปากกาชนิดหมึกติดถาวร ติดฉลากที่ฝาและตัว MCT แต่ละหลอด, ตัว PT แต่ละหลอดและผนังด้านนอกของโรเตอร์อะแดปเตอร์แต่ละตัว
- การรั่วไหลของตัวอย่างและบัฟเฟอร์ในระหว่างขั้นตอนอาจทำให้ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ RNA ลดลง
- ขั้นตอนทั้งหมดของเกณฑ์วิธีนี้รวมถึงขั้นตอนการหมุนเหวี่ยง ควรดำเนินการที่อุณหภูมิห้อง (15-25°C) เว้นแต่จะระบุไว้เป็นอย่างอื่น

เนื่องจากความไวของเทคโนโลยีการขยายกรดนิวคลีอิก จึงจำเป็นต้องมีข้อควรระวังต่อไปนี้ในการจัดการตัวอย่างเพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนข้าม:

- ปิเปตตัวอย่างลงใน PT อย่างระมัดระวังที่ส่วนก้นหลอดโดยไม่ทำให้ขอบหลอดเปียกชื้น
- เปลี่ยนทิปปิเปตเสมอระหว่างการถ่ายโอนของเหลว ใช้ทิปปิเปตป้องกันละอองลอย
- หลีกเลี่ยงการสัมผัสเมมเบรนคอลัมน์สปิน (PSC, PRC) ด้วยทิปปิเปต
- หลังจากหมุนวนหรือให้ความร้อนกับ MCT ให้หมุนเหวี่ยงสั้นๆ เพื่อขจัดหยดสารจากด้านในของฝา
- สวมถุงมือตลอดกระบวนการทั้งหมด ในกรณีที่ถุงมือกับตัวอย่างสัมผัสกัน ให้เปลี่ยนถุงมือทันที

สิ่งที่ต้องทำก่อนเริ่ม

- ต้องเก็บเลือดใน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ตามคำแนะนำในคู่มือ *PAXgene Blood RNA Tube* หากจำเป็น ดูภาคผนวก C (หน้า 77) สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับการจัดการ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- ตรวจสอบให้มั่นใจว่า PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ได้รับการบ่มอย่างน้อย 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องหลังการเก็บเลือดเพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์เม็ดเลือดแตกสมบูรณ์และมีการตกตะกอนของ RNA การบ่มโดย PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ตลอดคืนอาจเพิ่มปริมาณได้ ถ้า PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ถูกจัดเก็บไว้ที่ 2–8°C, –20°C หรือ –70°C หลังการเก็บเลือด ให้ปรับให้สมดุลกับอุณหภูมิห้องก่อนแล้วจึงจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนเริ่มขั้นตอน
- อ่านข้อมูลความปลอดภัยในหน้า 17
- อ่าน "หมายเหตุสำคัญ", หน้า 55
- อ่านคำแนะนำเกี่ยวกับการจัดการ RNA (ภาคผนวก A, หน้า 74)
- อ่านคู่มือผู้ใช้ QIAcube Connect MDx ที่เหมาะสมและข้อมูลเพิ่มเติมที่ให้มาพร้อมกับเครื่องมือโดยให้ความสำคัญต่อข้อมูลด้านความปลอดภัย
- ตรวจสอบให้มั่นใจว่าอุปกรณ์และเครื่องมือ เช่น ปิเปตและ QIAcube Connect MDx ได้รับการตรวจสอบและสอบเทียบอย่างสม่ำเสมอตามคำแนะนำของผู้ผลิต
- บัฟเฟอร์สำหรับการจับ (BR2) อาจก่อตัวเป็นตะกอนเมื่อจัดเก็บ ถ้าจำเป็นให้อุ่นที่ 37°C เพื่อละลาย
- บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 2 (BR4) จัดมาให้เป็นสารเข้มข้น ก่อนใช้ครั้งแรก ให้เติมเอทานอล(96–100% v/v, เกรดความบริสุทธิ์ p.a.) ในปริมาณที่เหมาะสมตามที่ระบุไว้บนขวดเพื่อให้ได้สารละลายที่ใช้งานได้
- หากใช้ RNase-Free DNase Set เป็นครั้งแรก ให้เตรียมสารละลายเข้มข้น DNase I ละลายของแข็ง DNase I (RNFD; 1500 หน่วย Kunitz)* ในบัฟเฟอร์สำหรับการแขวนลอย DNase (DRB) 550 µl ที่ให้มาพร้อมกับชุดอุปกรณ์ ระวังอย่าให้ DNase I (RNFD) หายไปเมื่อเปิดขวด อย่าหมุนวน DNase I (RNFD) ที่สร้างขึ้นใหม่ DNase I

* หน่วย Kunitz เป็นหน่วยที่ใช้โดยทั่วไปสำหรับการวัด DNase I ซึ่งกำหนดเป็นปริมาณ DNase I ที่ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นใน A_{260} ของ 0.001 ต่อนาทีต่อมิลลิลิตรที่ 25°C, pH 5.0 โดยมี DNA พอลิเมอไรซ์สูงเป็นสารตั้งต้น (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 และ 363)

มีความไวต่อการแปลงสภาพทางกายภาพเป็นพิเศษ การผสมควรทำโดยการพลิกขวดเบาๆ เท่านั้น

- DNase I ที่สร้างขึ้นใหม่ (RNFD) สามารถจัดเก็บได้ที่ 2–8°C ในขวดแก้วที่บรรจุมาตั้งแต่ต้น (สารละลายเข้มข้น) หรือที่ −20°C หลังจากนำสารละลายเข้มข้นออกจากขวดแก้วแล้วแบ่งเป็นส่วนย่อยสำหรับใช้ครั้งเดียว (ใช้ MCT ขนาด 1.5 ml ที่ให้มาพร้อมชุดอุปกรณ์ จะมีจำนวนมากพอแบ่งเป็นส่วนย่อยได้ 5 ส่วน) ส่วนย่อยที่ละลายแล้วสามารถจัดเก็บได้ที่ 2–8°C ห้ามนำส่วนย่อยไปแช่แข็งซ้ำอีกหลังจากละลายแล้ว
- ขณะที่ทำการสร้างใหม่และแยกส่วนย่อยของ DNase I (RNFD) ตรวจสอบให้มั่นใจว่าคุณปฏิบัติตามคำแนะนำในการจัดการ RNA (ภาคผนวก A, หน้า 74)
- ติดตั้งอะแดปเตอร์เครื่องเขย่าที่ถูกต้อง (มาพร้อมกับ QIAcube Connect MDx ใช้อะแดปเตอร์สำหรับหลอดล็อกสนิทขนาด 2 ml ที่มีเครื่องหมาย "2") และวางชั้นวางเครื่องเขย่าไว้ด้านบนของอะแดปเตอร์
- ตรวจสอบลิ้นชักขยะและเททิ้งหากจำเป็น
- ติดตั้งเกณฑ์วิธีที่เกี่ยวข้องหากยังไม่ได้ดำเนินการสำหรับการดำเนินการก่อนหน้านี้ QIAcube Connect MDx ต้องการเกณฑ์วิธีทั้งหมดที่พบในไฟล์ zip ที่เกี่ยวข้องเพื่อดาวน์โหลด ดู "การติดตั้งเกณฑ์วิธีบน QIAcube Connect MDx", หน้า 57

กระบวนการ

1. ปิดฝาครอบ QIAcube Connect MDx แล้วเปิดเครื่องมือด้วยสวิทช์เปิด/ปิด (ดู รูปที่ 15, หน้า 56)

   เสียงบี๊บดังขึ้นและหน้าจอเริ่มต้นจะปรากฏขึ้น เครื่องมือทำการทดสอบการเริ่มต้นโดยอัตโนมัติ
2. เปิดฝาครอบ QIAcube Connect MDx และใส่สารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาและอุปกรณ์พลาสติกที่จำเป็นลงในเครื่องมือ ดู "การโหลด QIAcube Connect MDx", หน้า 58

   เพื่อประหยัดเวลา การโหลดสามารถทำได้ระหว่างขั้นตอนการหมุนเหวี่ยง 10 นาที ในหนึ่งหรือทั้งสองขั้นตอนต่อไปนี้ (ขั้นตอนที่ 3 และ 5)
3. หมุนเหวี่ยง PAXgene Blood RNA Tube (BRT) เป็นเวลา 10 นาทีที่ 3,000–5,000 x *g* โดยใช้โรเตอร์แบบถังแกว่ง

ตรวจสอบให้มั่นใจว่าได้บ่มตัวอย่างเลือดในหลอด PAXgene Blood RNA Tube (BRT) เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (15–25°C) เพื่อให้ได้เซลล์เม็ดเลือดแตกอย่างสมบูรณ์และมีการตกตะกอนของ RNA

โรเตอร์ต้องมีอะแดปเตอร์หลอดสำหรับหลอดก้นกลม หากใช้อะแดปเตอร์หลอดชนิดอื่น หลอดอาจแตกระหว่างการหมุนเหวี่ยง

4. นำส่วนเหนือตะกอนออกโดยการรินหรือปิเปต หากรินสารเหนือตะกอน ให้ระวังอย่ารบกวนเม็ดและเช็ดขอบหลอดให้แห้งด้วยกระดาษเช็ดมือที่สะอาด เติมน้ำปราศจาก RNase (RNFW) 4 ml ลงในเม็ดและปิดหลอดโดยใช้แผ่นปิด BD Hemogard รองใหม่ (ให้มาพร้อมกับชุดอุปกรณ์)
5. หมุนวนจนกว่าเม็ดจะละลายอย่างเห็นได้ชัดและหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาทีที่ 3,000–5,000 x *g* โดยใช้โรเตอร์แบบถังแกว่ง นำส่วนเหนือตะกอนทั้งหมดออกและทิ้ง เศษเล็กเศษน้อยที่เหลืออยู่ในส่วนเหนือตะกอนหลังจากการหมุนวน แต่ก่อนการหมุนเหวี่ยงจะไม่ส่งผลกระทบต่อขั้นตอน

   การกำจัดส่วนเหนือตะกอนที่ไม่สมบูรณ์จะยับยั้งการแตกตัวและทำให้ไลเสตเจือจางลงดังนั้นจึงส่งผลต่อเงื่อนไขในการจับ RNA กับเมมเบรน PAXgene
6. เติมบัฟเฟอร์สำหรับการแขวนลอย (BR1) 350 µl และหมุนวนจนเม็ดละลายอย่างเห็นได้ชัด
7. ปิเปตตัวอย่างลงใน PT ขนาด 2 ml

   ใช้ PT ขนาด 2 ml ที่รวมอยู่ใน PAXgene Blood RNA Kit
8. ใส่ PT เปิดที่มีตัวอย่างบรรจุอยู่ลงในเครื่องเขย่าของ QIAcube Connect MDx (ดู รูปที่18, หน้า 60) ตำแหน่งตัวอย่างจะถูกกำหนดหมายเลขเพื่อความสะดวกในการโหลด เสียบปลั๊กของชั้นวางเครื่องเขย่า (มาพร้อมกับ QIAcube Connect MDx) ลงในช่องที่ขอบของชั้นวางเครื่องเขย่าที่อยู่ติดกับ PT แต่ละหลอด สิ่งนี้ทำให้สามารถตรวจจับตัวอย่างระหว่างการตรวจสอบโหลด

ตรวจสอบให้มั่นใจว่าได้ติดตั้งอะแดปเตอร์เครื่องเขย่าที่ถูกต้อง (อะแดปเตอร์เครื่องเขย่า, 2 ml, หลอดล็อกสนิทซึ่งมีเครื่องหมาย "2" ที่มาพร้อมกับ QIAcube Connect MDx)

หากประมวลผลน้อยกว่า 12 ตัวอย่าง ตรวจสอบให้มั่นใจว่าได้ใส่ชั้นวางเครื่องเขย่าตามที่แสดงใน รูปที่ 22, หน้า 64 ไม่สามารถดำเนินการหนึ่ง (1) ตัวอย่างหรือ 11 ตัวอย่างได้ หมายเลขตำแหน่งในชั้นวางเครื่องเขย่าจะตรงกับหมายเลขตำแหน่งในเครื่องหมุนเหวี่ยง

9. ปิดฝาครอบ QIAcube Connect MDx (ดู รูปที่ 15, หน้า 56)
10. เลือกเกณฑ์วิธี "PAXgene Blood RNA Part A" และเริ่มเกณฑ์วิธี

    ทำตามคำแนะนำที่ให้ไว้บนหน้าจอสัมผัสของ QIAcube Connect MDx

    ตรวจสอบให้มั่นใจว่าทั้งสองส่วนของโปรแกรม (ส่วน A และส่วน B) ได้รับการติดตั้งบน QIAcube Connect MDx แล้ว (ดู "การติดตั้งเกณฑ์วิธีบน QIAcube Connect MDx", หน้า 57)

    เครื่องมือนี้จะทำการตรวจสอบโหลดสำหรับตัวอย่าง ทิป โรเตอร์อะแดปเตอร์และขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา
11. หลังจากเกณฑ์วิธี "PAXgene Blood RNA Part A" เสร็จสิ้น ให้เปิดฝาครอบ QIAcube Connect MDx(ดู รูปที่ 15, หน้า 56) ถอดและทิ้ง PRC จากโรเตอร์อะแดปเตอร์และ PT เปล่าออกจากเครื่องเขย่า

    ระหว่างการดำเนินการคอลัมน์สปินจะถูกโอนจากตำแหน่งโรเตอร์อะแดปเตอร์ 1 (ตำแหน่งฝา L1) ไปยังตำแหน่งโรเตอร์อะแดปเตอร์ 3 (ตำแหน่งฝา L2) โดยเครื่องมือ (ดู รูปที่ 20, หน้า 62)
12. ปิดฝาของ MCT ขนาด 1.5 ml ทั้งหมดที่มี RNA บริสุทธิ์ในโรเตอร์อะแดปเตอร์ (ตำแหน่ง 3, ตำแหน่งฝา L3 ดู รูปที่ 20, หน้า 62) ถ่าย MCT ขนาด 1.5 ml ไปที่อะแดปเตอร์เครื่องเขย่า QIAcube Connect MDx (ดู รูปที่ 18, หน้า 60)
13. ปิดฝาครอบ QIAcube Connect MDx (ดู รูปที่ 15, หน้า 56)
14. เลือกเกณฑ์วิธี "PAXgene Blood RNA Part B" และเริ่มเกณฑ์วิธี

    ทำตามคำแนะนำที่ให้ไว้บนหน้าจอสัมผัส QIAcube Connect MDx

โปรแกรมนี้จะบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 65°C และแปลงสภาพ RNA สำหรับแอปพลิเคชันดาวน์สตรีม แม้ว่าแอปพลิเคชันดาวน์สตรีมจะมีขั้นตอนการแปลงสภาพความร้อนอย่าละเว้นขั้นตอนนี้ การแปลงสภาพ RNA อย่างเพียงพอที่จุดนี้เป็นสิ่งจำเป็นต่อการได้ประสิทธิภาพสูงสุดในแอปพลิเคชันดาวน์สตรีม

15. หลังจากเกณฑ์วิธี "PAXgene Blood RNA Part B" เสร็จสิ้น ให้เปิดฝาครอบ QIAcube Connect MDx (ดู รูปที่ 15, หน้า 56) วาง MCT ที่มี RNA บริสุทธิ์บนน้ำแข็งทันที

คำเตือน: พื้นผิวร้อน เครื่องเขย่าสามารถเข้าถึงอุณหภูมิได้สูงถึง 70°C หลีกเลี่ยงการสัมผัสเมื่อมันร้อน

อย่าปล่อยให้ RNA บริสุทธิ์ค้างอยู่ใน QIAcube Connect MDx เนื่องจากตัวอย่างไม่ได้ถูกทำให้เย็นลง RNA ที่บริสุทธิ์จึงสามารถย่อยสลายได้ ดังนั้นจึงไม่แนะนำให้ดำเนินการเตรียมตัวอย่างค้างคืนโดยไม่มีการดูแล

16. หากไม่ได้ใช้ตัวอย่าง RNA ทันที ให้จัดเก็บที่อุณหภูมิ –20°C หรือ –70°C

เนื่องจาก RNA ยังคงถูกแปลงสภาพหลังจากการแช่แข็งและการละลายซ้ำ จึงไม่จำเป็นต้องทำเกณฑ์วิธีการบ่มด้วยความร้อนซ้ำ (" PAXgene Blood RNA Part B") หากใช้ตัวอย่าง RNA ในการตรวจวินิจฉัย ให้ทำตามคำแนะนำที่จัดทำโดยผู้ผลิต

สำหรับการหาปริมาณ RNA ที่แม่นยำโดยการดูดซับที่ 260 nm เราขอแนะนำให้เจือจางตัวอย่างใน Tris-HCl 10 mM ค่า pH 7.5* การเจือจางตัวอย่างในน้ำที่ปราศจาก RNase อาจทำให้ได้ค่าต่ำอย่างไม่ถูกต้อง

ปรับเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เป็นศูนย์โดยใช้ช่องว่างที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5) และ บัฟเฟอร์ Tris-HCl ในสัดส่วนเดียวกับในตัวอย่างที่จะวัด บัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5) มีการดูดซับสูงที่ 220 nm ซึ่งอาจทำให้ระดับการดูดซับพื้นหลังสูงหากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ไม่ได้รับการปรับค่าเป็นศูนย์อย่างเหมาะสม

สำหรับการหาปริมาณในบัฟเฟอร์ Tris-HCl ให้ใช้ความสัมพันธ์

A_{260} = 1 ⇒ 44 µg/ml. ดูภาคผนวก B, หน้า 75

* เมื่อทำงานกับสารเคมี ควรสวมเสื้อคลุมสำหรับห้องปฏิบัติการ ถุงมือแบบใช้แล้วทิ้ง และแว่นตาป้องกันที่เหมาะสมเสมอ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดศึกษาเอกสารข้อมูลความปลอดภัย (Safety Data Sheet, SDS) ที่เหมาะสมจากผู้จัดจำหน่ายของผลิตภัณฑ์นั้น

17. นำชั้นวางขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาออกจากโต๊ะทำงานของ QIAcube Connect MDx (ดู รูปที่ 18, หน้า 60), และปิดขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาทั้งหมดด้วยฝาที่มีการติดฉลากอย่างเหมาะสม ปิดฝาขวดทั้งหมดที่ใส่บัฟเฟอร์และน้ำปราศจาก RNase ขวดแก้ว และหลอดใส่เอนไซม์และบัฟเฟอร์เอนไซม์ และถึงใส่วัสดุพลาสติกจากชุดอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับเกณฑ์วิธีนี้ จัดเก็บส่วนประกอบที่เหลือของชุดอุปกรณ์และขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาตามที่อธิบายไว้ในหัวข้อ "การจัดเก็บและการจัดการน้ำยา" (หน้า 21) และ "ความคงตัวขณะใช้งาน" (หน้า 21) จนกว่าจะใช้ต่อไป ถอดและทิ้งสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาที่เหลืออยู่ใน PT ในช่องใส่ MCT ของ QIAcube Connect MDx ถอดและทิ้งโรเตอร์อะแดปเตอร์จากเครื่องหมุนเหวี่ยง เทลิ้นชักขยะของ QIAcube Connect MDx ให้ว่างเปล่า (ดู รูปที่ 15, หน้า 56) ปิดฝาครอบเครื่องมือและปิดเครื่องมือด้วยสวิตช์เปิด/ปิด

ข้อจำกัดการใช้ผลิตภัณฑ์

PAXgene Blood RNA Kit มีไว้สำหรับการแยก RNA ภายในเซลล์จากเลือดครบส่วนของมนุษย์ (4.8 x 10^6 - 1.1 x 10^7 leukocytes/ml) สำหรับใช้เพื่อการวินิจฉัยภายนอกร่างกาย เครื่องมือนี้ไม่ได้ใช้เพื่อแยก DNA ในจีโนมหรือกรดนิวคลีอิกของไวรัสจากเลือดครบส่วนของมนุษย์ เนื่องจากจำนวนการคัดลอกที่จำกัดได้รับการตรวจสอบความถูกต้องสำหรับข้อกำหนดการทำให้คงตัว (การคัดลอกยีน FOS และ IL1B) จึงไม่ได้กำหนดลักษณะการทำงานสำหรับการคัดลอกทั้งหมด ผู้ใช้ควรตรวจสอบข้อมูลของผู้ผลิตและข้อมูลของตนเองเพื่อพิจารณาว่าจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องสำหรับการคัดลอกอื่นๆ หรือไม่ ส่วนประกอบของชุดอุปกรณ์มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้งานตามเกณฑ์วิธีแบบแมนนวลและแบบอัตโนมัติตามที่อธิบายไว้ในคำแนะนำการใช้งานนี้เท่านั้น

ดูคู่มือ *PAXgene Blood RNA Tube* สำหรับข้อมูลเกี่ยวกับการใช้ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

การควบคุมคุณภาพ

ตามระบบการจัดการคุณภาพที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO ของ QIAGEN แต่ละล็อตของ PAXgene Blood RNA Kit ได้รับการทดสอบตามข้อกำหนดจำเพาะที่กำหนดไว้ล่วงหน้าเพื่อให้มั่นใจได้ถึงคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่สอดคล้องกัน

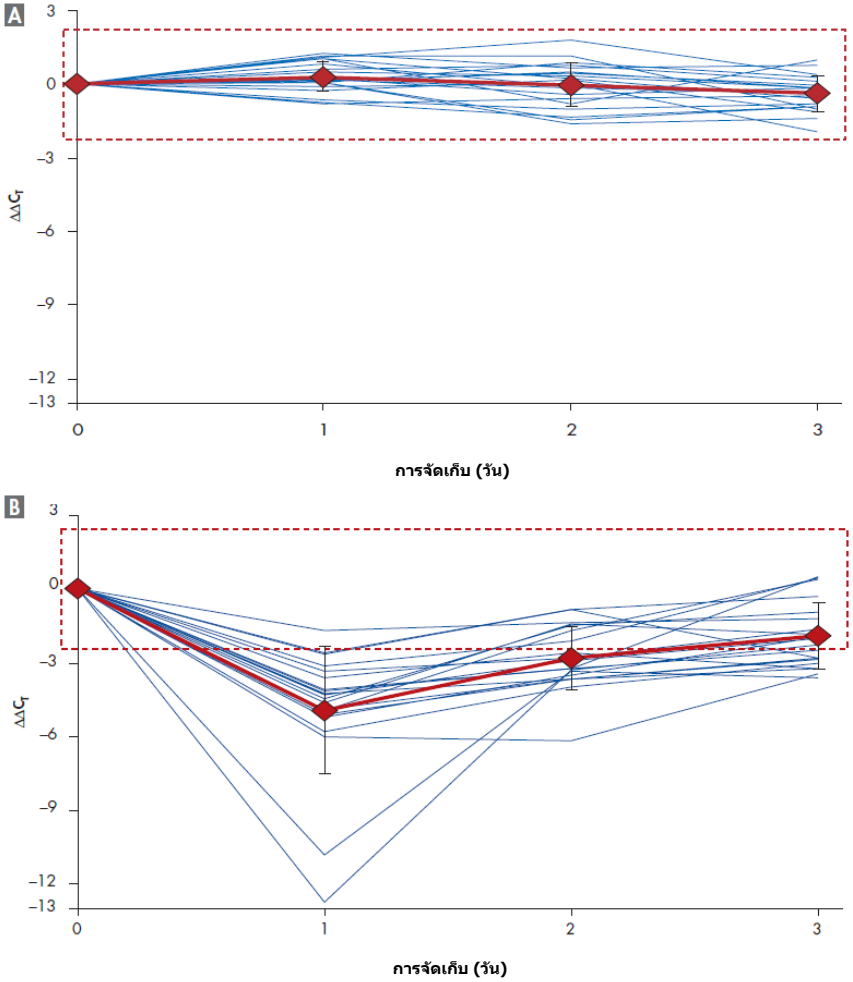
ลักษณะการทำงาน

การเก็บตัวอย่างและการทำให้คงตัว

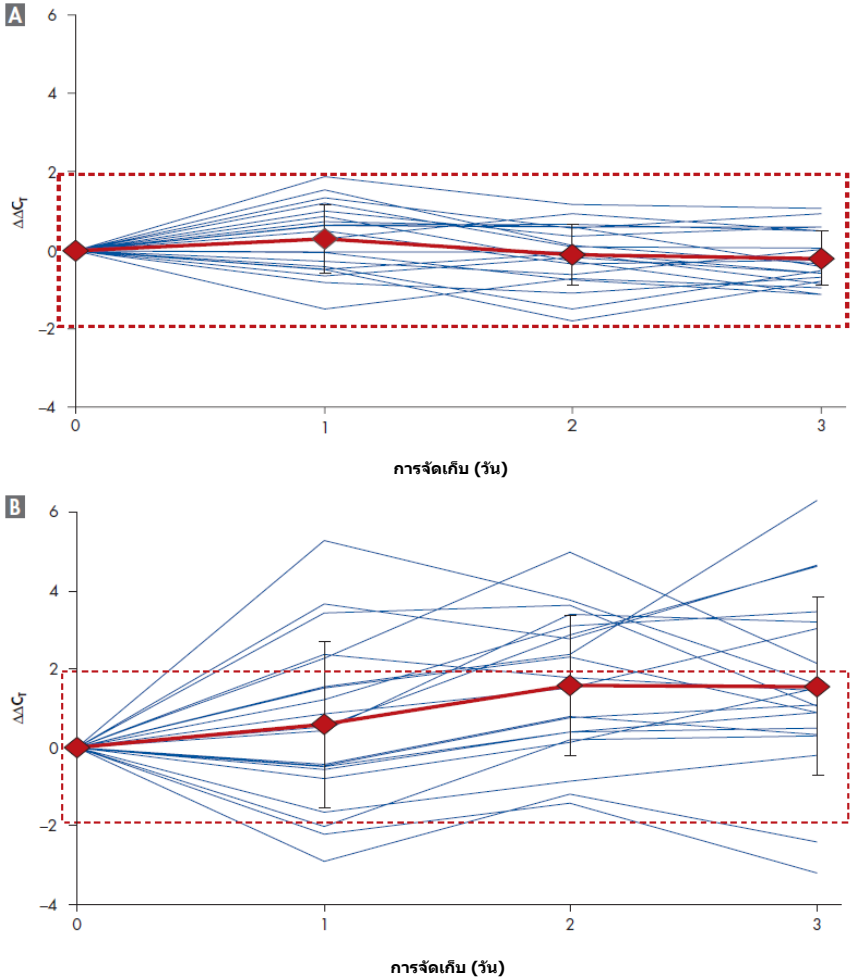
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) มีสารทำปฏิกิริยาให้เกิดการคงตัวของ RNA ที่จดทะเบียนกรรมสิทธิ์ไว้ สารเสริมนี้ช่วยปกป้องโมเลกุลของ RNA จากการแตกสลายโดย RNases และลดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนจากภายนอกร่างกายให้มีน้อยที่สุด PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) มีไว้สำหรับการเก็บตัวอย่างเลือดครบส่วนของมนุษย์และการทำให้ RNA ของเซลล์คงตัวได้นานถึง 3 วันที่อุณหภูมิ 18–25°C (รูปที่ 4 และ รูปที่ 5, หน้า 39 และ 40 ตามลำดับ) หรือถึง 5 วันที่อุณหภูมิ 2–8°C (รูปที่ 6 และ รูปที่ 7, หน้า 41 และ 42) นอกจากนี้ยังสามารถเก็บเลือดที่คงตัวแล้วโดยการแช่แข็งได้ ข้อมูลที่มีอยู่ในปัจจุบันแสดงให้เห็นถึงการทำให้ RNA ของเซลล์คงตัวเป็นเวลาอย่างน้อย 11 ปีที่ –20°C หรือ –70°C* สำหรับข้อมูลเพิ่มเติมจากการศึกษาอย่างต่อเนื่องเกี่ยวกับการประเมินความคงตัวเป็นระยะเวลานาน โปรดเยี่ยมชม **www.preanalytix.com** หรือติดต่อบริการด้านเทคนิคของ QIAGEN

ระยะเวลาที่แท้จริงของการทำให้ RNA คงตัวอาจแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของ RNA ของเซลล์และแอปพลิเคชันดาวน์สตรีมที่ใช้ เนื่องจากจำนวนการคัดลอกที่จำกัดได้รับการตรวจสอบความถูกต้องสำหรับข้อกำหนดการทำให้คงตัว (การคัดลอกยีน FOS และ IL1B) จึงไม่ได้กำหนดลักษณะการทำงานสำหรับการคัดลอกทั้งหมด ผู้ใช้ควรตรวจสอบข้อมูลของผู้ผลิตและข้อมูลของตนเองเพื่อพิจารณาว่าจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องสำหรับการคัดลอกอื่นๆ หรือไม่

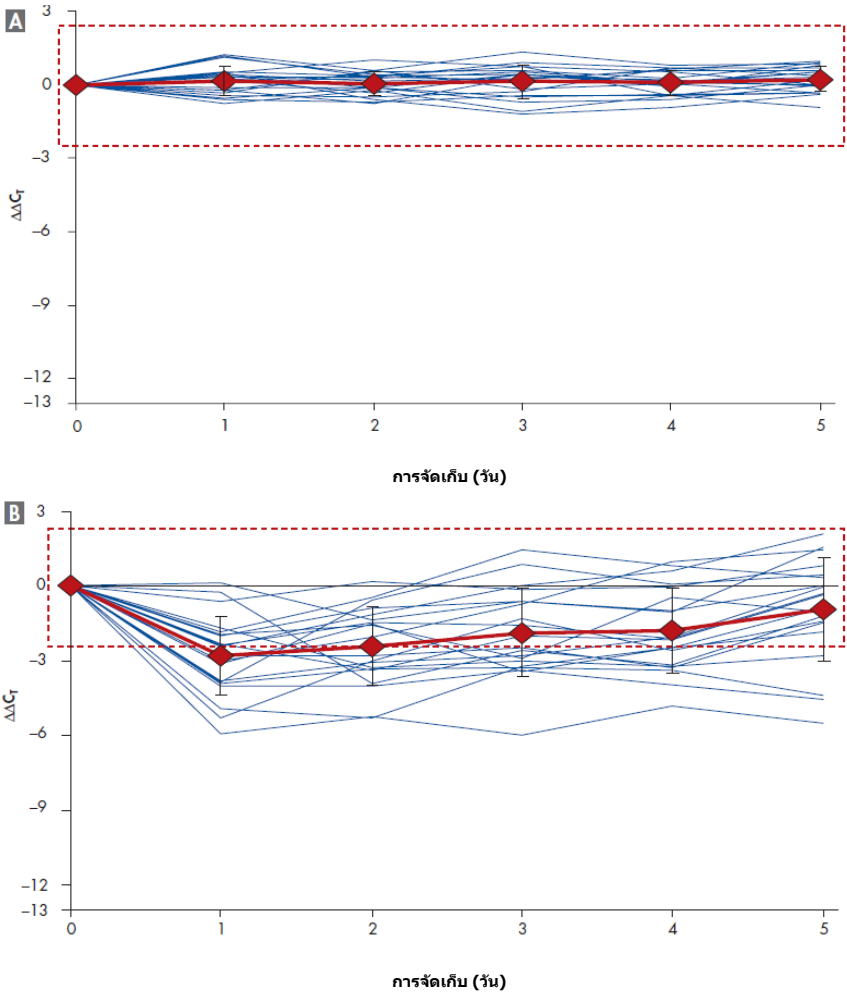
* การศึกษาระยะยาวเกี่ยวกับการจัดเก็บเลือดใน PAXgene Blood RNA Tubes กำลังดำเนินอยู่



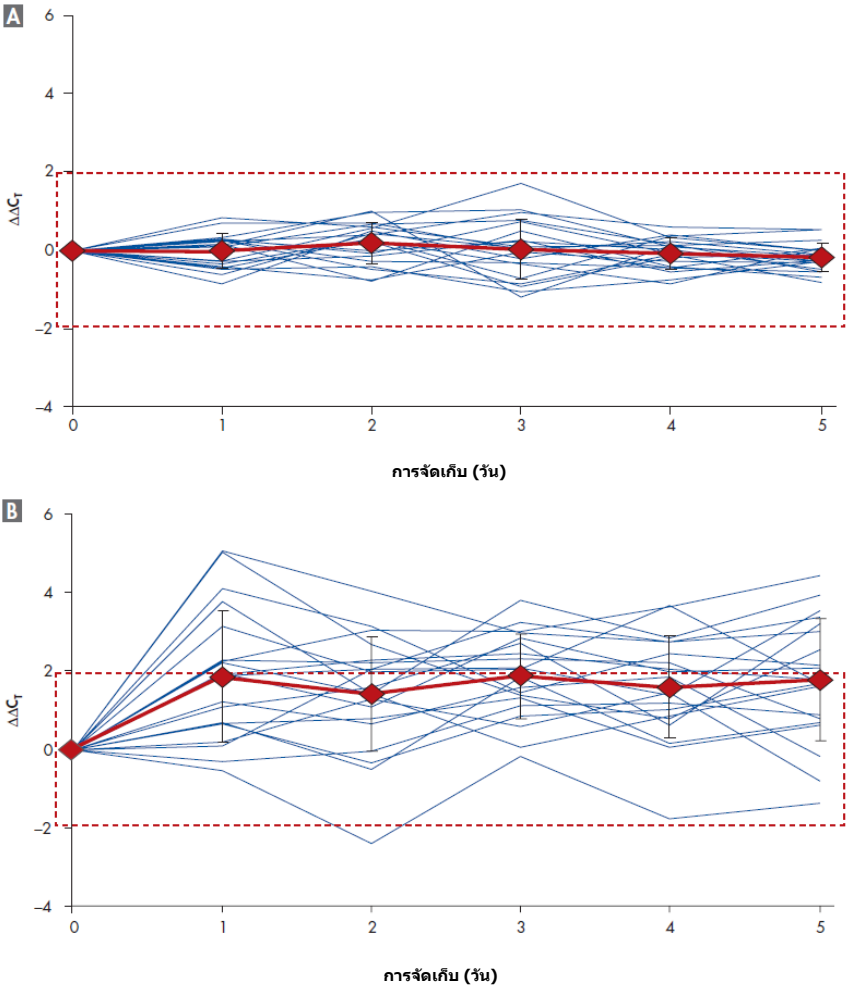
รูปที่ 4: ความคงตัวของ RNA ในตัวอย่างเลือดที่ 18–25°C: FOS เจาะเลือดจากผู้บริจาคที่ดูสุขภาพดี 10 ราย ด้วยตัวอย่างซ้ำและจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 18–25°C ตามจำนวนวันที่ระบุ ตามด้วยการแยก RNA ทั้งหมด [A] เก็บเลือดและจัดเก็บไว้ใน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) และ RNA ทั้งหมดถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ PAXgene Blood RNA Kit [B] เก็บเลือดและจัดเก็บไว้ในหลอดเก็บเลือดมาตรฐานที่มี EDTA เป็นสารต้านการแข็งตัวของเลือดและทำ RNA ทั้งหมดให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีการสกัดแยกอินทรีย์มาตรฐานด้วยการล้าง RNA ที่ใช้ซิลิกาเมมเบรน ระดับการคัดลอกสัมพัทธ์ของ FOS ถูกกำหนดโดย RT-PCR ดูเพล็กซ์แบบเรียลไทม์โดยใช้ 18S rRNA เป็นมาตรฐานภายใน ค่าสำหรับตัวอย่างทั้งหมดถูกพล็อตพร้อมค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างทั้งหมดที่แสดง เส้นประระบุความแม่นยำรวม ±3x ของการทดสอบ (2.34 C_T)



รูปที่ 5: ความคงตัวของ RNA ในตัวอย่างเลือดที่ 18–25°C: IL1B เจาะเลือดและทำ RNA ทั้งหมดให้บริสุทธิ์หลังการจัดเก็บที่อุณหภูมิ 18-25°C ตามที่อธิบายไว้ใน รูปที่ 4 ระดับการคัดลอกสัมพัทธ์ของ IL1B ถูกกำหนดโดย RT-PCR ดูเพล็กซ์แบบเรียลไทม์โดยใช้ 18S rRNA เป็นมาตรฐานภายใน ค่าสำหรับตัวอย่างทั้งหมดถูกพล็อตพร้อมค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างทั้งหมดที่แสดง เส้นประระบุความแม่นยำรวม ±3x ของการทดสอบ (1.93 C_T)



รูปที่ 6: ความคงตัวของ RNA ในตัวอย่างเลือดที่ 2-8°C: FOS เจาะเลือดจากผู้บริจาค 10 ราย ด้วยตัวอย่างซ้ำและจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2–8°C ตามจำนวนวันที่ระบุตามด้วยการแยก RNA ทั้งหมด [**A**] เก็บเลือดและจัดเก็บไว้ใน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) และ RNA ทั้งหมดถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ PAXgene Blood RNA Kit [**B**] เก็บเลือดและจัดเก็บไว้ในหลอดเก็บเลือดมาตรฐานที่มี EDTA เป็นสารต้านการแข็งตัวของเลือดและทำ RNA ทั้งหมดให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีการสกัดแยกอินทรีย์มาตรฐานด้วยการล้าง RNA ที่ใช้ซิลิกาเมมเบรน ระดับการคัดลอกสัมพัทธ์ของ FOS ถูกกำหนดโดย RT-PCR ดูเพล็กซ์แบบเรียลไทม์โดยใช้ 18S rRNA เป็นมาตรฐานภายในค่าสำหรับตัวอย่างทั้งหมดถูกพล็อตพร้อมค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างทั้งหมดที่แสดงเส้นประระบุความแม่นยำรวม ±3x ของการทดสอบ (2.34 C_T)



รูปที่ 7: ความคงตัวของ RNA ในตัวอย่างเลือดที่ 2-8°C: IL1B เจาะเลือดและทำ RNA ทั้งหมดให้บริสุทธิ์หลังการจัดเก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C ตามที่อธิบายไว้ใน รูปที่ 6 ระดับการคัดลอกสัมพัทธ์ของ IL1B ถูกกำหนดโดย RT-PCR ดูเพล็กซ์แบบเรียลไทม์โดยใช้ 18S rRNA เป็นมาตรฐานภายใน ค่าสำหรับตัวอย่างทั้งหมดถูกพล็อตพร้อมค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างทั้งหมดที่แสดง เส้นประระบุความแม่นยำรวม ±3x ของการทดสอบ (1.93 C_T)

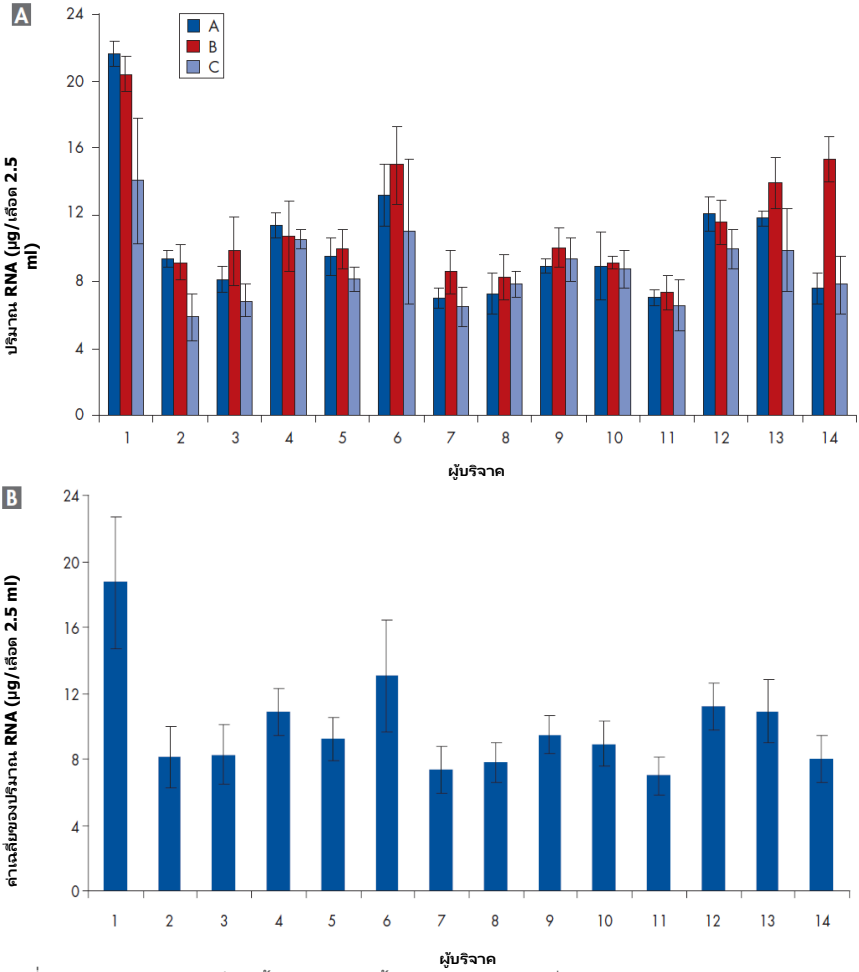
การแยก RNA แบบแมนนวล

RNA ทั้งหมดที่ถูกแยกโดยใช้ PAXgene Blood RNA System มีความบริสุทธิ์ ใช้เกณฑ์วิธีแบบแมนนวล ค่า A_{260}/A_{280} อยู่ระหว่าง 1.8 ถึง 2.2 และ ≤1% (w/w) DNA ในจีโนมมีอยู่ใน ≥95% ของตัวอย่างทั้งหมดซึ่งวัดโดย real-time PCR เชิงปริมาณของลำดับยีนเบต้า-แอกติน 95% ของตัวอย่างแสดงว่าไม่มีการยับยั้งใน RT-PCR เมื่อมีสารจากการชะถึง 30% ของปริมาณปฏิกิริยา RT-PCR

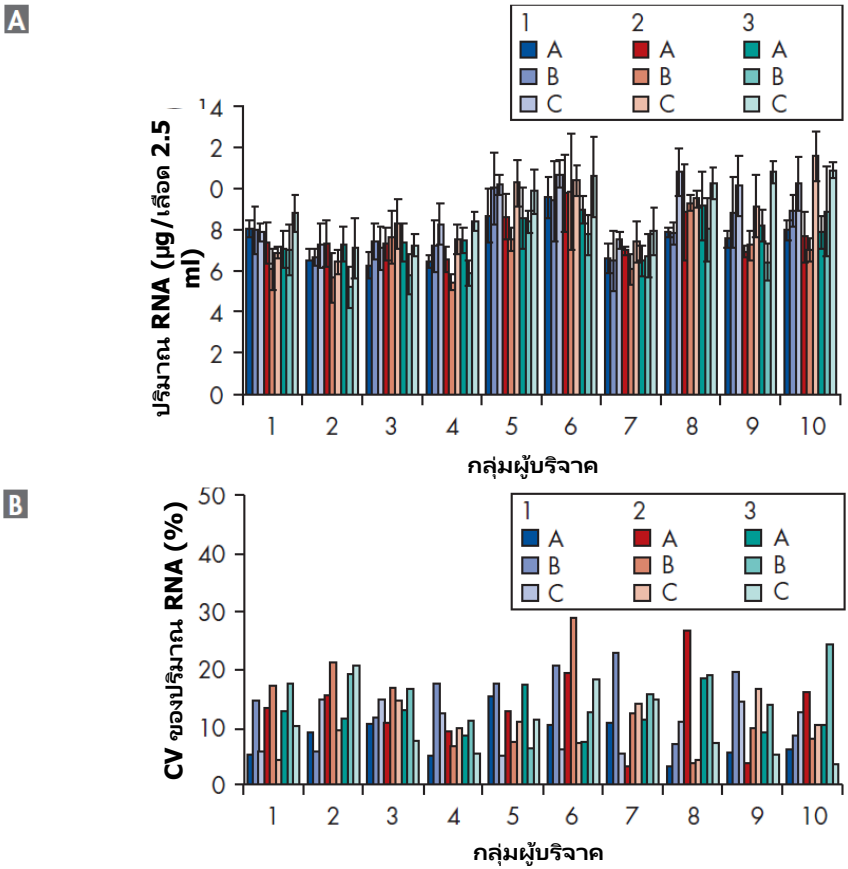
เมื่อใช้เกณฑ์วิธีแบบแมนนวล เวลาในการเตรียมตัวอย่างโดยเฉลี่ย (ตามข้อมูลจากการดำเนินการเตรียมตัวอย่าง 12 ครั้ง) อยู่ที่ประมาณ 90 นาที.* โดยใช้เวลาในการปฏิบัติจริงเพียง 40 นาที ปริมาณ RNA จากเลือดครบส่วนของมนุษย์ที่มีสุขภาพดี 2.5 ml คือ ≥3 µg สำหรับ ≥95% ของตัวอย่างที่ประมวลผล เนื่องจากปริมาณขึ้นอยู่กับผู้บริจาคเป็นอย่างยิ่ง ปริมาณของแต่ละรายอาจแตกต่างกันไป สำหรับผู้บริจาคแต่ละราย PAXgene Blood RNA System ให้ปริมาณที่สามารถวัดซ้ำได้และทำซ้ำได้สูง (รูปที่ 8 และ รูปที่ 9, หน้า 44 และ 45 ตามลำดับ) และ RT-PCR ที่วัดซ้ำได้และทำซ้ำได้ (รูปที่ 10 และ รูปที่ 11, หน้า 49 และ 50 ตามลำดับ) ทำให้มีความทนทานสูงสำหรับการทดสอบวินิจฉัยทางคลินิก

รูปที่ 8 (หน้า 44) แสดงถึงความสามารถในการวัดซ้ำและความสามารถในการทำซ้ำโดยรวมของ PAXgene Blood RNA System มีการดำเนินการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของล็อต PAXgene Blood RNA kit ที่ต่างกันและผู้ปฏิบัติงานที่ต่างกันเกี่ยวกับความสามารถในการทำซ้ำของปริมาณ RNA และประสิทธิภาพของ RT-PCR แบบเรียลไทม์ เนื่องจากมีการใช้ตัวอย่างเลือดแบบรวมกลุ่มแทนที่จะแยกแต่ละ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) สำหรับการศึกษาเหล่านี้ ผลลัพธ์จึงไม่ได้สะท้อนถึงความสามารถในการวัดซ้ำของระบบรวมถึงความผันผวนระหว่างการเจาะเลือดแต่ละครั้ง แต่เป็นเพียงความสามารถในการวัดซ้ำของการเตรียมตัวอย่างเท่านั้น (ดู รูปที่ 9, หน้า 45)

* เวลาในการดำเนินการตามเกณฑ์วิธีทั้งหมดรวมถึงการจัดการ PAXgene Blood RNA Tubes ล่วงหน้า (การหมุนเหวี่ยง การล้างเม็ด และการแขวนลอยของเม็ด)



รูปที่ 8: การแยก RNA ที่วัดซ้ำได้และทำซ้ำได้ ตัวอย่างเลือดสี่ส่วนจากผู้บริจาค 14 รายได้รับการประมวลผลแบบแมนนวลโดยเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการ 3 ราย (A, B, C) มีการใช้อุปกรณ์สามชุดและตัวอย่างทั้งหมดที่เตรียมโดยเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการรายเดียวได้รับการประมวลผลโดยใช้อุปกรณ์เดียวกัน [**A**] ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณ RNA ต่อตัวอย่างที่ทำซ้ำจากผู้บริจาครายเดียวกันและเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการที่ต่างกันจะแสดง [**B**] ตัวอย่างเลือดที่ทำซ้ำสิบสองตัวอย่างจากผู้บริจาคแต่ละรายจาก 14 รายได้รับการประมวลผลโดยเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการที่ต่างกัน 3 ราย ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณ RNA ต่อตัวอย่างจากผู้บริจาครายเดียวกันและเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการทั้งหมดจะถูกนำเสนอ สำหรับตัวอย่าง RNA ทั้งหมด อัตราส่วน A_{260}/A_{280} อยู่ระหว่าง 1.8 ถึง 2.2



รูปที่ 9: ความสามารถในการวัดซ้ำและความสามารถในการทำซ้ำของปริมาณ RNA สำหรับผู้ปฏิบัติงานที่ต่างกันและล็อตชุดอุปกรณ์ PAXgene Blood RNA Kit โดยใช้ตัวอย่างเลือดที่รวมกัน เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้บริจาค 30 รายที่ต่างกันใน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 หลอดต่อผู้บริจาคหนึ่งราย รวม 360 หลอด) สิ่งที่บรรจุของหลอดจากผู้บริจาค 3 รายถูกรวมเข้าด้วยกันและแยกออกเป็น 36 ตัวอย่างในเวลาต่อมา ตัวอย่าง 36 รายการต่อกลุ่มผู้บริจาค 3 รายได้รับการประมวลผลแบบแมนนวลโดยผู้ปฏิบัติงานที่ต่างกัน 3 ราย ผู้ปฏิบัติงานแต่ละรายใช้ PAXgene Blood RNA Kit จากล็อตที่ต่างกัน 3 ล็อตสำหรับการแยก RNA และประมวลผลตัวอย่างสี่ส่วนจากแต่ละกลุ่มของกลุ่มผู้บริจาค 10 กลุ่ม [**A**] ปริมาณ RNA ที่ได้และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสำหรับการรวมล็อต-ผู้ปฏิบัติงานทุกราย ตัวอย่างเลือดสี่ส่วนจากกลุ่มผู้บริจาค 10 กลุ่มได้รับการประมวลผลโดยผู้ปฏิบัติงานที่แตกต่างกัน 3 ราย (A, B, C) ด้วยแต่ละล็อตของชุดอุปกรณ์ 3 ล็อต (1, 2, 3) ปริมาณเฉลี่ย (คอลัมน์) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (แถบข้อผิดพลาด) ต่อตัวอย่างสี่ส่วนจากกลุ่มผู้บริจาคเดียวกันสำหรับผู้ปฏิบัติงานที่ต่างกันและล็อตชุดอุปกรณ์ที่ต่างกันจะถูกนำเสนอ [**B**] CV ของปริมาณ RNA ที่ได้ต่อกลุ่มผู้บริจาคสำหรับการรวมล็อต-ผู้ปฏิบัติงานทั้งหมด (A, B, C; 1, 2, 3) ตามที่คำนวณจากปริมาณค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณที่แสดงใน รูปที่ 9A

ตารางที่ 1A: ความสามารถในการทำซ้ำภายในแต่ละล็อตและภายในผู้ใช้แต่ละรายสำหรับกลุ่มผู้บริจาคที่เลือก (1, 6, 9, 10)

การรวมกันของข้อมูล	กลุ่มผู้บริจาค 1 (5.1 x 10^6 cells/ml)			กลุ่มผู้บริจาค 6 (6.5 x 10^6 cells/ml)		
	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)
ล็อต 1, ผู้ใช้ A	8.03	0.42	5	9.55	0.99	10
ล็อต 1, ผู้ใช้ B	7.98	1.17	15	9.38	1.94	21
ล็อต 1, ผู้ใช้ C	7.87	0.45	6	10.71	0.65	6
ล็อต 2, ผู้ใช้ A	7.32	0.98	13	9.78	1.89	19
ล็อต 2, ผู้ใช้ B	6.09	1.04	17	9.82	2.83	29
ล็อต 2, ผู้ใช้ C	6.87	0.31	4	10.37	0.74	7
ล็อต 3, ผู้ใช้ A	7.04	0.90	13	8.96	0.68	8
ล็อต 3, ผู้ใช้ B	6.98	1.22	17	7.73	0.97	13
ล็อต 3, ผู้ใช้ C	8.78	0.89	10	10.59	1.94	18
	กลุ่มผู้บริจาค 9 (8.4 x 10^6 cells/ml)			กลุ่มผู้บริจาค 10 (10.2 x 10^6 cells/ml)		
	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)
ล็อต 1, ผู้ใช้ A	7.52	0.41	6	7.96	0.49	6
ล็อต 1, ผู้ใช้ B	8.82	1.72	19	8.90	0.76	9
ล็อต 1, ผู้ใช้ C	10.14	1.46	14	10.22	1.29	13
ล็อต 2, ผู้ใช้ A	6.92	0.27	4	7.63	1.23	16
ล็อต 2, ผู้ใช้ B	7.20	0.71	10	7.00	0.56	8
ล็อต 2, ผู้ใช้ C	9.14	1.52	17	11.56	1.21	10
ล็อต 3, ผู้ใช้ A	8.18	0.76	9	7.85	0.82	10
ล็อต 3, ผู้ใช้ B	6.41	0.88	14	8.88	2.17	24
ล็อต 3, ผู้ใช้ C	10.78	0.56	5	10.88	0.37	3

ตารางที่ 1B: ความสามารถในการทำซ้ำภายในผู้ใช้แต่ละรายและระหว่างล็อตทั้งหมดสำหรับกลุ่มผู้บริจาคที่เลือก (1, 6, 9, 10)

การรวมกันของข้อมูล	กลุ่มผู้บริจาค 1 (5.1 x 10^6 cells/ml)			กลุ่มผู้บริจาค 6 (6.5 x 10^6 cells/ml)		
	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)
ผู้ใช้ A, ล็อตทั้งหมด	7.46	0.85	11	9.43	1.22	13
ผู้ใช้ B, ล็อตทั้งหมด	7.02	1.31	19	8.98	2.09	23
ผู้ใช้ C, ล็อตทั้งหมด	7.84	0.98	13	10.56	1.15	11
	กลุ่มผู้บริจาค 9 (8.4 x 10^6 cells/ml)			กลุ่มผู้บริจาค 10 (10.2 x 10^6 cells/ml)		
	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)
ผู้ใช้ A, ล็อตทั้งหมด	7.54	0.72	10	7.81	0.82	11
ผู้ใช้ B, ล็อตทั้งหมด	7.48	1.50	20	8.26	1.54	19
ผู้ใช้ C, ล็อตทั้งหมด	10.02	1.34	13	10.89	1.10	10

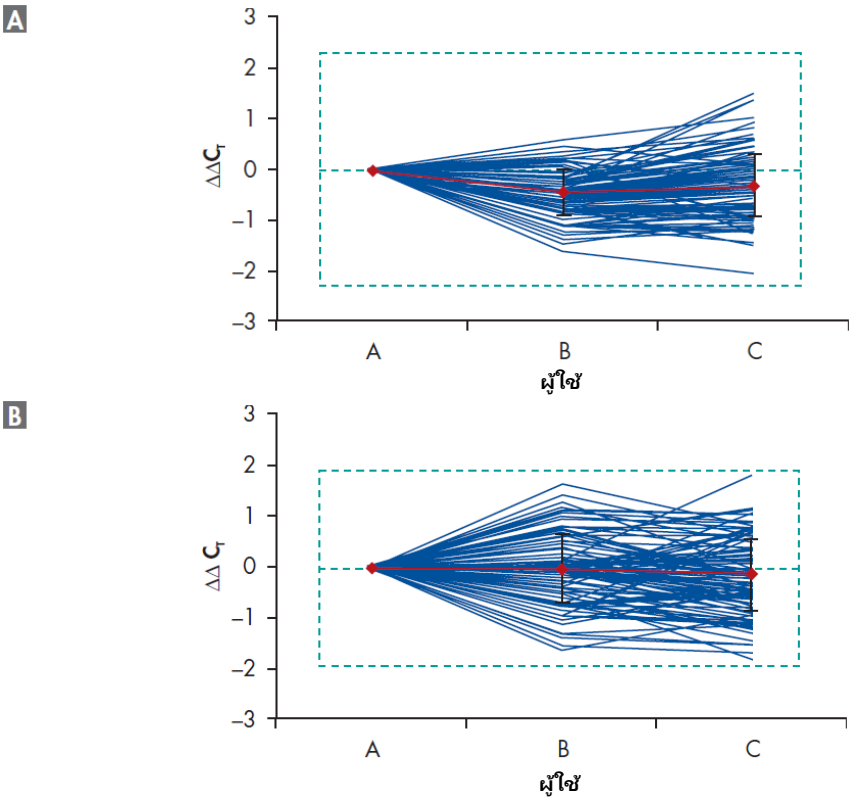
ตารางที่ 1C: ความสามารถในการทำซ้ำภายในแต่ละล็อตและระหว่างผู้ใช้ทั้งหมดสำหรับกลุ่มผู้บริจาคที่เลือก (1, 6, 9, 10)

การรวมกันของข้อมูล	กลุ่มผู้บริจาค 1 (5.1 x 10^6 cells/ml)			กลุ่มผู้บริจาค 6 (6.5 x 10^6 cells/ml)		
	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)
ล็อต 1, ผู้ใช้ทั้งหมด	7.96	0.69	9	9.88	1.34	14
ล็อต 2, ผู้ใช้ทั้งหมด	6.76	0.93	14	9.99	1.84	18
ล็อต 3, ผู้ใช้ทั้งหมด	7.60	1.27	17	9.09	1.71	19
	กลุ่มผู้บริจาค 9 (8.4 x 10^6 cells/ml)			กลุ่มผู้บริจาค 10 (10.2 x 10^6 cells/ml)		
	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)
ล็อต 1, ผู้ใช้ทั้งหมด	8.83	1.63	19	9.02	1.27	14
ล็อต 2, ผู้ใช้ทั้งหมด	7.75	1.36	18	8.73	2.31	26
ล็อต 3, ผู้ใช้ทั้งหมด	8.46	1.99	24	9.20	1.80	20

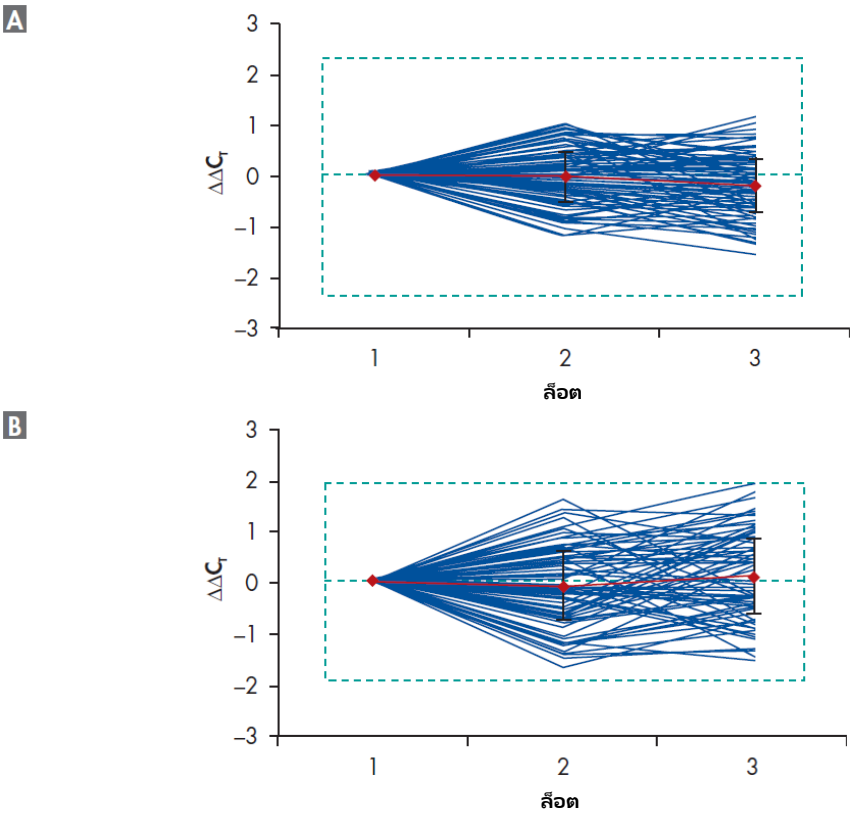
ตารางที่ 1D: ความสามารถในการทำซ้ำระหว่างล็อตทั้งหมดและผู้ใช้ทั้งหมดสำหรับกลุ่มผู้บริจาคที่เลือก (1, 6, 9, 10)

การรวมกันของข้อมูล	กลุ่มผู้บริจาค 1 (5.1 x 10^6 cells/ml)			กลุ่มผู้บริจาค 6 (6.5 x 10^6 cells/ml)		
	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)
ล็อต 1, ผู้ใช้ทั้งหมด	7.44	1.09	15	9.66	1.65	17
	กลุ่มผู้บริจาค 9 (8.4 x 10^6 cells/ml)			กลุ่มผู้บริจาค 10 (10.2 x 10^6 cells/ml)		
	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)	ปริมาณเฉลี่ย (µg)	SD (µg)	CV (%)
ล็อต 1, ผู้ใช้ทั้งหมด	8.35	1.70	20	8.99	1.80	20

การวิเคราะห์รายละเอียดของกลุ่มผู้บริจาคตัวแทน 4 กลุ่ม กลุ่มถูกคัดเลือกตามจำนวนเม็ดเลือดขาวและแสดงค่าสูง ค่ากลางและค่าต่ำของช่วงปกติของจำนวนเม็ดเลือดขาว (4.8 x 10^6 - 1.1 x 10^7 leukocytes/ml) จำนวนเม็ดเลือดขาวแสดงถึงค่าเฉลี่ยของจำนวนเม็ดเลือดขาว 3 ตัวจากผู้บริจาค 3 รายต่อกลุ่มผู้บริจาค



รูปที่ 10: ความสามารถในการทำซ้ำของ RT-PCR - ระหว่างผู้ใช้ RNA บริสุทธิ์ในการทดลองที่อธิบายไว้ใน รูปที่ 9 ถูกใช้สำหรับ RT-PCR แบบเรียลไทม์ ระดับการคัดลอกสัมพัทธ์ของ [**A**] FOS และ [**B**] IL1B ถูกกำหนดโดย RT-PCR ดูเพล็กซ์แบบเรียลไทม์โดยใช้ 18S rRNA เป็นมาตรฐานภายใน ค่าสำหรับตัวอย่างทั้งหมดจะถูกพล็อต สัมพันธ์กับค่าสำหรับผู้ใช้ A (กลุ่มผู้บริจาค 10 x ล็อตชุดอุปกรณ์ 3 x การทำซ้ำ 4 = ชุดข้อมูลสำหรับแต่ละยีน 120) โดยมีค่าเฉลี่ย (เส้นสีแดง) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (แถบสีดำ) สำหรับตัวอย่างทั้งหมดที่แสดงเส้นประระบุความแม่นยำรวมของการทดสอบ ±3x (FOS: 2.34 C_T; IL1B: 1.93 C_T)



รูปที่ 11: ความสามารถในการทำซ้ำของ RT-PCR - ระหว่างล็อตชุดอุปกรณ์ RNA บริสุทธิ์ในการทดลองที่อธิบายไว้ใน รูปที่ 9 ถูกใช้สำหรับ RT-PCR แบบเรียลไทม์ ระดับการคัดลอกสัมพัทธ์ของ [**A**] FOS และ [**B**] IL1B ถูกกำหนดโดย RT-PCR ดูเพล็กซ์แบบเรียลไทม์โดยใช้ 18S rRNA เป็นมาตรฐานภายใน ค่าสำหรับตัวอย่างทั้งหมดจะถูกพล็อต สัมพันธ์กับค่าสำหรับล็อตชุดอุปกรณ์ 1 (กลุ่มผู้บริจาค 10 x ผู้ใช้ 3 x การทำซ้ำ 4 = ชุดข้อมูลสำหรับแต่ละยีน 120) โดยมีค่าเฉลี่ย (เส้นสีแดง) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (แถบสีดำ) สำหรับตัวอย่างทั้งหมดที่แสดงเส้นประระบุความแม่นยำรวมของการทดสอบ ±3x (FOS: 2.34 C_T; IL1B: 1.93 C_T)

ตารางที่ 2: สรุปข้อมูล RT-PCR จาก รูปที่ 10 และ รูปที่ 11

ระบบทดสอบ	การทดสอบ FOS/18S rRNA		การทดสอบ IL1B/18S rRNA	
การเปรียบเทียบข้อมูล	ค่าเฉลี่ย ($\Delta\Delta C_T$)	± SD ($\Delta\Delta C_T$)	ค่าเฉลี่ย ($\Delta\Delta C_T$)	± SD ($\Delta\Delta C_T$)
ความสามารถในการทำซ้ำภายในผู้ใช้แต่ละรายและระหว่างล็อตทั้งหมด				
ผู้ใช้ทั้งหมด, ล็อต 1–ล็อต 1	0.00	0.00	0.00	0.00
ผู้ใช้ทั้งหมด, ล็อต 1–ล็อต 2	-0.03	0.48	-0.07	0.66
ผู้ใช้ทั้งหมด, ล็อต 1–ล็อต 3	-0.21	0.52	0.11	0.71
ความสามารถในการทำซ้ำภายในผู้ใช้แต่ละรายและระหว่างล็อตทั้งหมด				
ล็อตทั้งหมด, ผู้ใช้ A–ผู้ใช้ A	0.00	0.00	0.00	0.00
ล็อตทั้งหมด, ผู้ใช้ A–ผู้ใช้ B	-0.46	0.44	-0.06	0.69
ล็อตทั้งหมด, ผู้ใช้ A–ผู้ใช้ C	-0.31	0.60	-0.15	0.71

ผู้ใช้: เจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการ ทำการศึกษา
ล็อต: จำนวนล็อตชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษานี้
SD: ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
แสดงค่าเฉลี่ย $\Delta\Delta C_T$ (N = 120) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสำหรับข้อมูลที่เสนอใน รูปที่ 10 และ รูปที่ 11

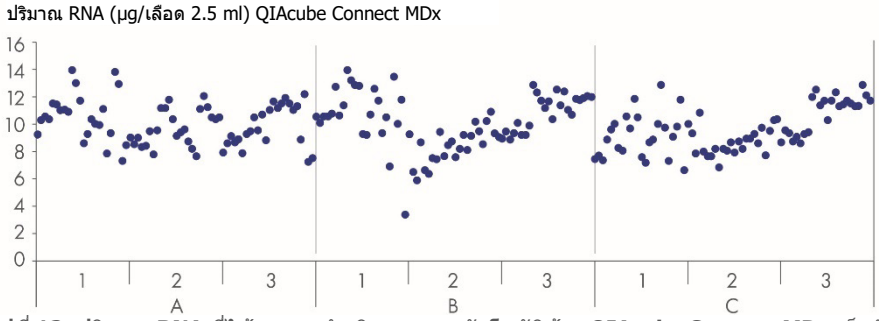
การแยก RNA แบบอัตโนมัติ

ปริมาณ RNA จากเลือดครบส่วนของมนุษย์ที่มีสุขภาพดี 2.5 ml คือ ≥3 µg สำหรับ ≥95% ของตัวอย่างที่ประมวลผล รูปที่ 12 (หน้า 52) ระบุปริมาณ RNA ที่ได้จากตัวอย่างทั้งหมด 216 ตัวอย่างที่เตรียมโดยใช้เกณฑ์วิธีแบบอัตโนมัติด้วยชุดอุปกรณ์จาก 3 ล็อต โดยผู้ปฏิบัติงาน 3 ราย เนื่องจากมีการใช้ตัวอย่างเลือดที่รวมกันแทน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) สำหรับการศึกษาเหล่านี้ ผลลัพธ์ไม่ได้แสดงถึงปริมาณ RNA ที่คาดหวังจากตัวอย่างเดียวของการเจาะเลือดแต่ละครั้ง เนื่องจากปริมาณขึ้นอยู่กับผู้บริจาคเป็นอย่างยิ่ง ปริมาณของแต่ละรายอาจแตกต่างกันไป (รูปที่ 12, หน้า 52)

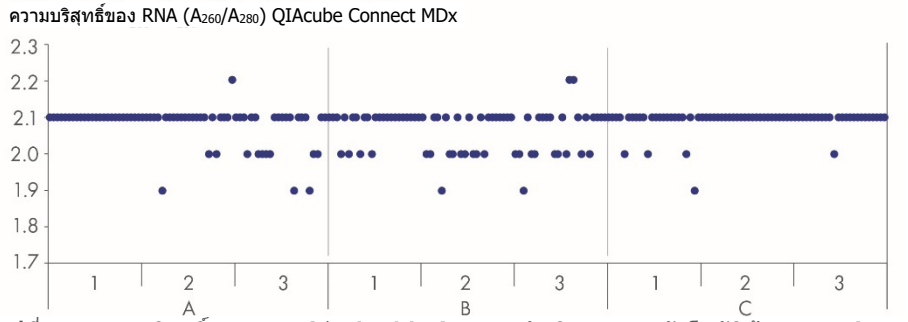
95% ของตัวอย่างแสดงว่าไม่มีการยับยั้งใน RT-PCR เมื่อมีสารจากการชะถึง 30% ของปริมาณปฏิกิริยา RT-PCR เมื่อใช้เกณฑ์วิธีแบบอัตโนมัติ ไม่สามารถตรวจจับการปนเปื้อนข้ามระหว่างตัวอย่างตามการวัด real-time RT-PCR เชิงปริมาณของลำดับการคัดลอก ABL1 และ

FOS ในตัวอย่างที่ RNA เป็นลบ (น้ำ) ซึ่งจับคู่กับตัวอย่างที่ RNA เป็นบวก (เลือดครบส่วนของมนุษย์) ในการดำเนินการเดียวกัน

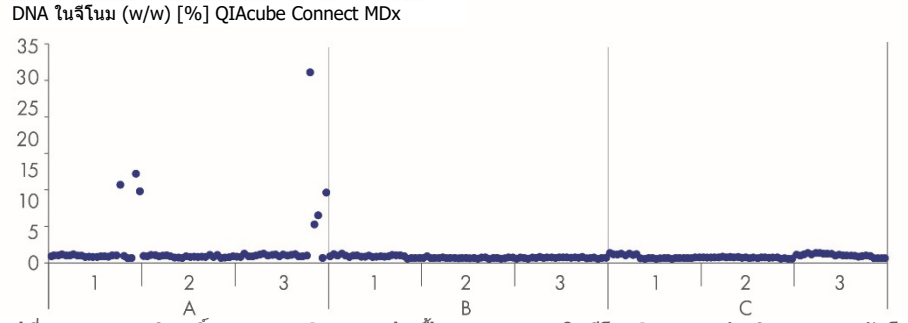
RNA ที่แยกด้วย PAXgene Blood RNA System และเกณฑ์วิธีแบบอัตโนมัติมีความบริสุทธิ์ดังที่แสดงโดยไม่มีการยับยั้ง RT-PCR และค่า A_{260}/A_{280} ระหว่าง 1.8 ถึง 2.2 DNA ของจีโนมมีอยู่ที่ ≤1% (w/w) ใน ≥95% ของตัวอย่างทั้งหมด ซึ่งวัดโดย real-time PCR เชิงปริมาณของลำดับของยีนเบต้า - แอกติน รูปที่ 13 และ รูปที่ 14 (หน้า 53) แสดงค่า A_{260}/A_{280} และ DNA ของจีโนมสัมพัทธ์จากตัวอย่างทั้งหมด 216 ตัวอย่างที่เตรียมโดยใช้เกณฑ์วิธีแบบอัตโนมัติด้วยชุดอุปกรณ์จาก 3 ล็อตโดยผู้ปฏิบัติงาน 3 ราย



รูปที่ 12: ปริมาณ RNA ที่ได้ — การดำเนินการแบบอัตโนมัติด้วย QIAcube Connect MDx เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้บริจาคแต่ละรายใน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ตัวอย่างเลือดที่เก็บในหลอดถูกนำมารวมกลุ่มเป็นกลุ่มผู้บริจาค 6 กลุ่ม และมีการจัดสรรใหม่หลังจากนั้น ตัวอย่างทั้งหมด 216 หลอด (นั่นคือมี 36 ตัวอย่างต่อกลุ่ม) ถูกประมวลผลโดยผู้ปฏิบัติงาน 3 ราย (A, B, C) ผู้ปฏิบัติงานแต่ละรายใช้ PAXgene Blood RNA Kit จากล็อตต่างกัน 3 ล็อต (1, 2, 3) สำหรับการแยกแบบอัตโนมัติด้วย QIAcube Connect MDx และประมวลผลตัวอย่างสี่ส่วนจากแต่ละกลุ่มของผู้บริจาค 6 กลุ่ม แสดงปริมาณ RNA ที่ได้ของแต่ละตัวอย่างทั้งหมดสำหรับการรวมล็อต - ผู้ปฏิบัติงานทุกราย



รูปที่ 13: ความบริสุทธิ์ของ RNA (ค่า A_{260}/A_{280}) — การดำเนินการแบบอัตโนมัติด้วย QIAcube Connect MDx RNA ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAcube Connect MDx โดยผู้ปฏิบัติงาน 3 ราย (A, B, C) โดยใช้ PAXgene Blood RNA Kit จาก 3 ล็อตที่ต่างกัน (1, 2, 3) ในการทดลองที่อธิบายไว้ใน รูปที่ 12 มีการแสดงค่า A_{260}/A_{280} ของแต่ละตัวอย่างสำหรับการรวมล็อต- ผู้ปฏิบัติงานทุกราย



รูปที่ 14: ความบริสุทธิ์ของ RNA (% การปนเปื้อนของ DNA ในจีโนม) — การดำเนินการแบบอัตโนมัติด้วย QIAcube Connect MDx RNA ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAcube Connect MDx โดยผู้ปฏิบัติงาน 3 ราย (A, B, C) โดยใช้ PAXgene Blood RNA Kit จาก 3 ล็อตที่ต่างกัน (1, 2, 3) ในการทดลองที่อธิบายไว้ใน รูปที่ 12 มีการแสดงจำนวน DNA ในจีโนม (w/w) ในแต่ละตัวอย่างสำหรับการรวมล็อต - ผู้ปฏิบัติงานทุกราย

เกณฑ์วิธีแบบอัตโนมัติของการแยก RNA โดยใช้ PAXgene Blood RNA System ให้ผลลัพธ์ RT-PCR ที่วัดซ้ำได้และทำซ้ำได้ทำให้มีความทนทานสูงสำหรับการตรวจวินิจฉัยทางคลินิก

การคงตัวของ RNA ที่แยกได้

ตัวอย่าง RNA ที่แยกจาก PAXgene Blood RNA Tubes บรรจุเลือดด้วย PAXgene Blood RNA Kit จะคงตัวอยู่ได้นาน 5 ปีในการจัดเก็บที่ –20°C และ 7 ปีในการจัดเก็บที่ –70°C (จุดยุติของการศึกษา)

หมายเหตุสำคัญ

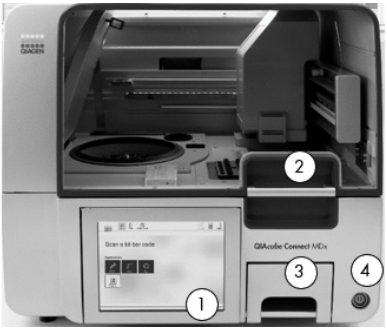
การใช้ QIAcube Connect MDx

ตรวจสอบให้มั่นใจว่าคุณคุ้นเคยกับการใช้งาน QIAcube Connect MDx โปรดอ่านคู่มือผู้ใช้และข้อมูลเพิ่มเติมใดๆ ที่ให้มาพร้อมกับเครื่องโดยให้ความสำคัญกับข้อมูลความปลอดภัยก่อนที่จะเริ่มเกณฑ์วิธี PAXgene Blood RNA แบบอัตโนมัติ

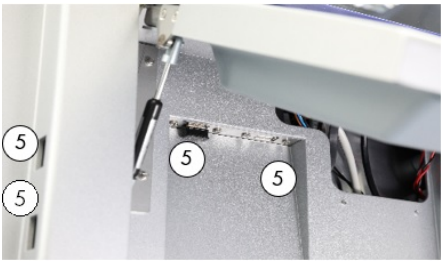
การเริ่มใช้ QIAcube Connect MDx

ปิดฝาครอบ QIAcube Connect MDx แล้วเปิดเครื่องมือด้วยสวิทช์เปิด/ปิด (ดู รูปที่ 15, หน้า 56)

เสียงบี๊บดังขึ้นและหน้าจอเริ่มต้นจะปรากฏขึ้น เครื่องมือทำการทดสอบการเริ่มต้นโดยอัตโนมัติ



มุมมองด้านหน้าของ **QIAcube Connect MDx**



หน้าจอสัมผัสแบบดึงออก

มุมมองด้านหลังของ **QIAcube Connect MDx (ข้างซ้าย)**

มุมมองด้านหลังของ **QIAcube Connect MDx (ข้างขวา)**

รูปที่ 15: คุณลักษณะภายนอกของ QIAcube Connect MDx

1	หน้าจอสัมผัส	5	พอร์ต USB 2 พอร์ตที่ด้านซ้ายของหน้าจอสัมผัส พอร์ต USB 2 พอร์ตด้านหลังหน้าจอสัมผัส (โมดูล Wi-Fi เสียบเข้ากับพอร์ต USB 1 พอร์ต)
2	ฝาครอบ	6	พอร์ต RJ-45 Ethernet
3	ลิ้นชักขยะ	7	ซ็อกเก็ตสายไฟ
4	สวิตช์เปิด/ปิด	8	ช่องระบายความร้อน

หน้าจอสัมผัส

ทำการควบคุม QIAcube Connect MDx โดยใช้หน้าจอสัมผัส หน้าจอสัมผัสช่วยให้ผู้ใช้สามารถใช้งานเครื่องมือและให้แนวทางผู้ใช้ผ่านการตั้งค่าบนโต๊ะทำงาน ระหว่างการประมวลผลตัวอย่าง หน้าจอสัมผัสจะแสดงสถานะเกณฑ์วิธีและเวลาที่เหลือ

รูปที่ 16: หน้าจอสัมผัสแบบดึงออกของ QIAcube Connect MDx

การติดตั้งเกณฑ์วิธีบน QIAcube Connect MDx

อาจจำเป็นต้องทำการติดตั้งเกณฑ์วิธีเบื้องต้นก่อนที่จะสามารถดำเนินการจัดเตรียม RNA ครั้งแรกบน QIAcube Connect MDx ได้ ติดตั้งทั้งเกณฑ์วิธี "PAXgene Blood RNA Part A" และ "PAXgene Blood RNA Part B"

มีเกณฑ์วิธีสำหรับ QIAcube Connect MDx ให้ที่ **www.qiagen.com** และจำเป็นต้องดาวน์โหลดลงแท่ง USB ที่ให้มากับเครื่องมือ เกณฑ์วิธีเหล่านี้จะถูกถ่ายโอนไปยังเครื่องมือผ่านทางพอร์ต USB

พอร์ต USB (ตั้งอยู่ที่ด้านข้างของหน้าจอสัมผัส; ดู รูปที่ 15, หน้า 56) ทำให้มีการเชื่อมต่อของ QIAcube Connect MDx กับแท่ง USB ที่ให้มากับเครื่องมือ ไฟล์ข้อมูล เช่น ไฟล์บันทึกหรือไฟล์รายงานสามารถถ่ายโอนผ่านพอร์ต USB จากเครื่องมือไปยังแท่ง USB ได้

พอร์ต USB ใช้กับแท่ง USB ที่ QIAGEN จัดให้เท่านั้น อย่าเชื่อมต่ออุปกรณ์อื่นเข้ากับพอร์ตนี้

อย่าถอดแท่ง USB ออกขณะดาวน์โหลดเกณฑ์วิธีหรือถ่ายโอนไฟล์ข้อมูลหรือในระหว่างการเรียกใช้เกณฑ์วิธี

สำหรับรายละเอียดเพิ่มเติมเกี่ยวกับขั้นตอนการอัปโหลดเกณฑ์วิธีไปยัง QIAcube Connect MDx โปรดดูคู่มือผู้ใช้ของเครื่อง

การโหลด QIAcube Connect MDx

เพื่อประหยัดเวลา การโหลดสามารถทำได้ระหว่างขั้นตอนการหมุนเหวี่ยง 10 นาที หนึ่งขั้นตอนหรือทั้งสองขั้นตอน (ขั้นตอนที่ 3 และ 5) ใน "เกณฑ์วิธี: การแยก RNA ทั้งหมดแบบอัตโนมัติจากเลือดครบส่วนของมนุษย์ที่เก็บตัวอย่างไว้ใน PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)", หน้า 30

ขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา

ก่อนที่จะใช้ QIAcube Connect MDx ทุกครั้ง ให้เติมขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาทั้ง 4 ขวดอย่างระมัดระวังด้วยสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาที่ระบุไว้ใน ตารางที่ 3 (หน้า 59) จนถึงระดับตัวบ่งชี้สูงสุดหรือถ้าเป็นไปไม่ได้ให้ถึงระดับที่อนุญาตโดยปริมาณบัฟเฟอร์ที่ให้มาใน PAXgene Blood RNA Kit ปิดฉลากขวดและฝาให้ชัดเจนด้วยชื่อบัฟเฟอร์ และวางขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาที่เติมลงในตำแหน่งที่เหมาะสมบนชั้นวางขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา ใส่ชั้นวางลงบนโต๊ะทำงานของเครื่องมือดังที่แสดง (รูปที่ 17 และ รูปที่ 18, หน้า 59 และ 60ตามลำดับ)

ปริมาตรของบัฟเฟอร์ BR2 ที่ให้มาจะไม่เติมขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาจนถึงระดับตัวบ่งชี้ บัฟเฟอร์ BR3 และ BR4 ไม่สามารถเติมขวดจนถึงระดับตัวบ่งชี้หลังจากประมวลผลหลายตัวอย่างในการการดำเนินการครั้งก่อน

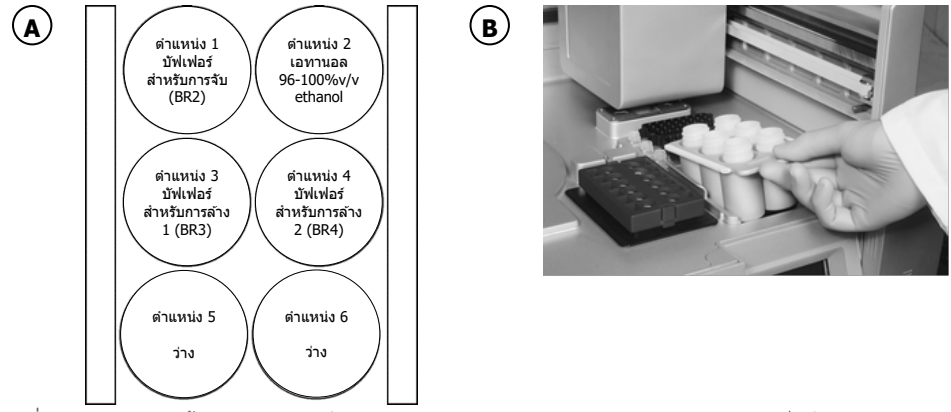
อย่าลืมถอดฝาออกจากขวดก่อนวางลงบนโต๊ะทำงาน

ปริมาณบัฟเฟอร์ที่ให้มาใน PAXgene Blood RNA Kit (50) เพียงพอสำหรับการดำเนินการเตรียม RNA สูงสุด 7 ครั้งบน QIAcube Connect MDx โดยดำเนินการได้ 2 ถึง 12 ตัวอย่างต่อครั้ง โดยทั่วไปแล้วควรหลีกเลี่ยงการดำเนินการโดยใช้ตัวอย่างจำนวนน้อยต่อครั้งเพื่อให้ประมวลผลได้ทั้งหมด 50 ตัวอย่างต่อชุดอุปกรณ์ การดำเนินการเตรียม RNA มากกว่า 7 ครั้งอาจทำให้ปริมาณบัฟเฟอร์ไม่เพียงพอสำหรับการประมวลผลตัวอย่างสุดท้าย

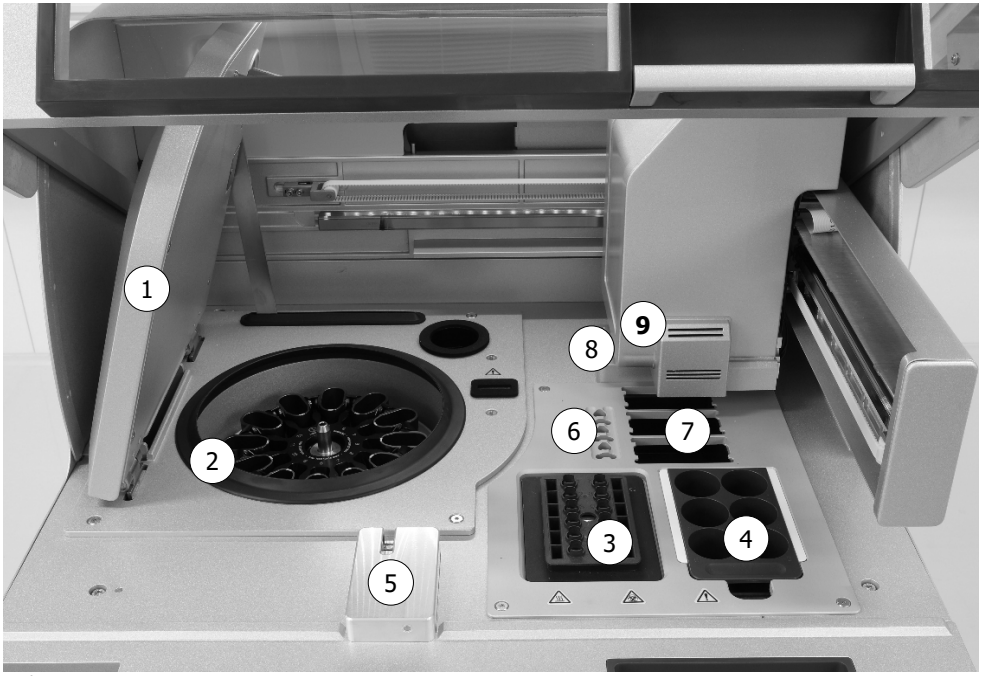
ตารางที่ 3: ตำแหน่งในชั้นวางขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา

ตำแหน่ง	สารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา
1	บัฟเฟอร์สำหรับการจับ (BR2)
2	เอทานอล (96–100% v/v)
3	บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 1 (BR3)
4	บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 2 (BR4)*
5	- (เว้นว่าง)
6	- (เว้นว่าง)

* บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 2 (BR4) จัดมาให้เป็นสารเข้มข้น ก่อนใช้ครั้งแรก ให้เติมเอทานอล 4 ปริมาตร (96–100% v/v, เกรดความบริสุทธิ์ p.a.) ตามที่ระบุไว้บนขวดเพื่อให้ได้สารละลายที่ใช้งานได้



รูปที่ 17: การโหลดชั้นวางขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา [A]แผนผังตำแหน่งและสิ่งที่บรรจุในขวดบนชั้นวางขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา **[B]** การโหลดชั้นลงใน QIAcube Connect MDx



รูปที่ 18: มุมมองภายในของ QIAcube Connect MDx

1. ฝาหมุนเหวี่ยง
2. เครื่องหมุนเหวี่ยง
3. เครื่องเขย่า
4. ชั้นวางขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา
5. เซนเซอร์ทิปและตัวล็อกฝาครอบ
6. ช่องใส่ MCT
7. 3 ช่องสำหรับชั้นวางทิป
8. ช่องทิ้งสำหรับทิปและคอลัมน์
9. แขนกล (ประกอบด้วย pipettor 1 ช่อง, กริปเปอร์, เซนเซอร์อัลตราโซนิกและออปติคอล และ UV LED)

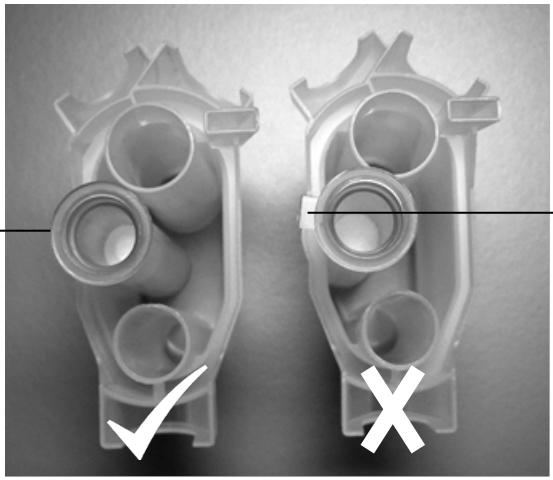
คอลัมน์สปิน (PSC, PRC), MCT และอุปกรณ์พลาสติกสำหรับ QIAcube Connect MDx

วางชั้นวางทิป 2 อันที่มีทิปฟิลเตอร์ 1,000 µl ลงบน QIAcube Connect MDx (ดูรูปที่ 18, หน้า 60) เติมชั้นวางพร้อมทิปเมื่อจำเป็น

ใช้เฉพาะทิปฟิลเตอร์ 1,000 µl ที่ออกแบบมาเพื่อใช้กับ QIAcube Connect MDx เท่านั้น

ติดฉลากโรเตอร์อะแดปเตอร์และ MCT สำหรับแต่ละตัวอย่างโดยใช้ปากกาชนิดหมึกติดถาวร เปิด PSC ที่จะใช้และตัดฝาออกให้หมดโดยใช้กรรไกร (ดู รูปที่ 19)

เพื่อการทำงานที่เหมาะสมของอุปกรณ์จับยึดแขนกล QIAcube Connect MDx ให้ถอด (ตัด) ฝาและชิ้นส่วนพลาสติกทั้งหมดที่เชื่อมต่อฝาเข้ากับ PSC ออกให้หมด (ดู รูปที่ 19) มิฉะนั้นอุปกรณ์จับยึดแขนกลจะไม่สามารถจับ PSC ได้อย่างถูกต้อง



รูปที่ 19: การโหลด PSC. PSC ถูกโหลดลงในตำแหน่งกลางของโรเตอร์อะแดปเตอร์ ตัดฝา PSC ก่อนโหลดคอลัมน์

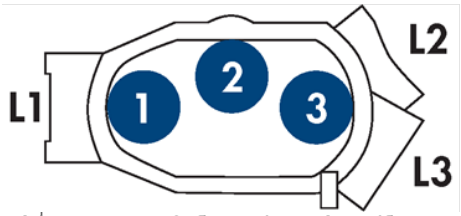
โหลด PSC (ไม่มีฝาปิด ดู รูปที่ 19, หน้า 61) PRC และ MCT ที่ติดฉลากลงในตำแหน่งที่เหมาะสมในโรเตอร์อะแดปเตอร์ติดฉลากแต่ละตัวดังแสดงใน ตารางที่ 4 และ รูปที่ 20

ตรวจสอบให้มั่นใจว่าได้ดันฝาคอลัมน์สปิน (PRC) และฝา MCT ลงไปจนสุดที่ด้านล่างของช่องที่ขอบของโรเตอร์อะแดปเตอร์ มิฉะนั้นฝาจะแตกระหว่างการหมุนเหวี่ยง

ตารางที่ 4: วัสดุสิ้นเปลืองพลาสติกในโรเตอร์อะแดปเตอร์

ตำแหน่ง	สารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา	ตำแหน่งฝา
1	คอลัมน์สปิน PAXgene RNA (สีแดง, PRC)	L1
2	คอลัมน์สปิน PAXgene Shredder (สีม่วง, PSC) (ดัดฝาก่อนวางในโรเตอร์อะแดปเตอร์)	–
3	MCT*	L3

* ใช้ MCT (1.5 ml) ที่รวมอยู่ใน PAXgene Blood RNA Kit



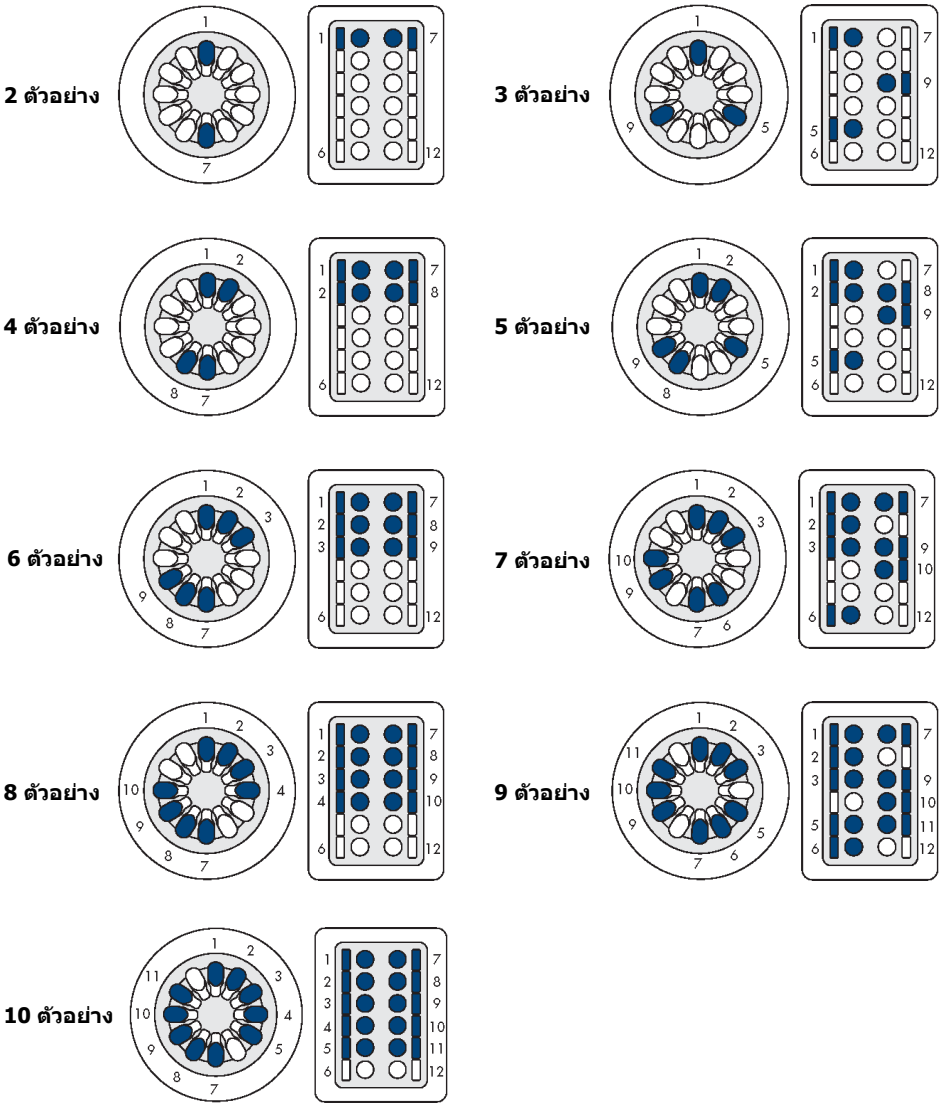
รูปที่ 20: ตำแหน่งในโรเตอร์อะแดปเตอร์ โรเตอร์อะแดปเตอร์มีตำแหน่งหลอดสามตำแหน่ง (1–3) และตำแหน่งฝาสามตำแหน่ง (L1 – L3)

กำลังโหลดเครื่องหมุนเหวี่ยง

โหลดโรเตอร์อะแดปเตอร์ที่ประกอบแล้วเข้ากับถังหมุนเหวี่ยงของ QIAcube Connect MDx ตามที่แสดงใน รูปที่ 21 ด้านล่าง

หากประมวลผลน้อยกว่า 12 ตัวอย่าง ตรวจสอบให้มั่นใจว่าได้โหลดโรเตอร์หมุนเหวี่ยงที่สมดุลในแนวรัศมี (ดู รูปที่ 22, หน้า 64) ต้องติดตั้งถังหมุนเหวี่ยงทั้งหมดก่อนเริ่มการดำเนินการเกณฑ์วิธีแม้ว่าจะดำเนินการน้อยกว่า 12 ตัวอย่างก็ตาม ไม่สามารถประมวลผลตัวอย่างเดียว (หนึ่ง) หรือ 11 ตัวอย่างได้

รูปที่ 21: การโหลดเครื่องหมุนเหวี่ยงบน QIAcube Connect MDx โหลดโรเตอร์อะแดปเตอร์ที่ประกอบแล้วเข้ากับถังหมุนเหวี่ยง



รูปที่ 22: กำลังโหลดเครื่องหมุนเหวี่ยงและเขย่า ตำแหน่งเครื่องหมุนเหวี่ยงและเขย่าจะแสดงสำหรับการประมวลผลจากสอง (2) ถึงสิบ (10) ตัวอย่าง ไม่สามารถดำเนินการหนึ่ง (1) ตัวอย่างหรือ 11 ตัวอย่างได้ สำหรับการประมวลผล 12 ตัวอย่างจะมีการโหลดตำแหน่งเครื่องหมุนเหวี่ยงและเขย่าทั้งหมด (ไม่แสดงภาพ)

หลอดแปรรูป

นำหลอด PT ใดๆ ที่ยังค้างอยู่ในช่องใส่ MCT จากการดำเนินการครั้งก่อนออก (ดู รูปที่ 18, หน้า 60) เติม PT 3 หลอดด้วยสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาตามปริมาณที่ให้ไว้ใน ตารางที่ 5 ตาม จำนวนตัวอย่างในการดำเนินการ

สำหรับส่วนผสมการบ่ม DNase I ให้ปิเปตปริมาตรที่ระบุของบัฟเฟอร์สำหรับการย่อย DNA (RDD) ลงใน PT และเติมสารละลายเข้มข้น DNase I (RNFD) ตามปริมาตรที่ระบุ ผสมโดยค่อยๆ ปิเปตส่วนผสมทั้งหมดขึ้นและลง 3 ครั้งโดยใช้ทิปปิเปต 1,000 µl

ใช้ PT ขนาด 2 ml ที่รวมอยู่ใน PAXgene Blood RNA Kit ติดฉลากหลอดด้วยชื่อสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาอย่างชัดเจนและวางไว้ในตำแหน่งที่เหมาะสมในช่องใส่ MCT ตามที่ระบุไว้ใน ตารางที่ 6 (หน้า 66)

DNase I (RNFD) มีความไวต่อการแปลงสภาพทางกายภาพเป็นพิเศษ ผสมโดยการปิเปตเท่านั้นโดยใช้ทิปปิเปตแบบเจาะกว้างเพื่อลดการตัดเฉือน อย่าหมุนวน

ตรวจสอบให้มั่นใจว่าได้ปิเปตเฉพาะปริมาตรที่ต้องการตามที่ระบุไว้ใน ตารางที่ 5 ด้านล่าง

ตารางที่ 5: ปริมาณของสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาที่ต้องใช้ใน PT สำหรับช่องใส่ MCT

จำนวนตัวอย่าง	ปริมาณสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาสำหรับจำนวนตัวอย่างที่ระบุ (µl)		
	Proteinase K (โปรติเนส K) (PK)	ผสมการบ่ม DNase I	บัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5)
2	126	187 (23 DNase I + 164 บัฟเฟอร์ RDD)	313
3	170	261 (33 DNase I + 228 บัฟเฟอร์ RDD)	399
4	213	334 (42 DNase I + 292 บัฟเฟอร์ RDD)	486
5	256	407 (51 DNase I + 356 บัฟเฟอร์ RDD)	572
6	299	481 (60 DNase I + 421 บัฟเฟอร์ RDD)	658
7	342	554 (69 DNase I + 485 บัฟเฟอร์ RDD)	745
8	386	627 (78 DNase I + 549 บัฟเฟอร์ RDD)	831
9	429	701 (88 DNase I + 613 บัฟเฟอร์ RDD)	918
10	472	775 (97 DNase I + 678 บัฟเฟอร์ RDD)	1004
12	558	921 (115 DNase I + 806 บัฟเฟอร์ RDD)	1177

ตารางที่ 6: ช่องใส่ MCT

	ตำแหน่ง		
	A	B	C
สิ่งที่บรรจุ	Proteinase K (โปรตีเนส K)	ผสมการบ่ม DNase I	บัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5)
หลอด	หลอดแปรรูป*	หลอดแปรรูป*	หลอดแปรรูป*

*ใช้ PT ขนาด 2 ml ที่รวมอยู่ใน PAXgene Blood RNA Kit

การทิ้งอุปกรณ์

สำหรับการทิ้งอุปกรณ์อย่างปลอดภัยหลังจากการเก็บตัวอย่าง และการแยก RNA แบบแมนนวล โปรดดูข้อมูลความปลอดภัยและข้อควรระวังในหน้า 17 และ 18 ตามลำดับ

นอกจากนี้ สำหรับ การแยก RNA แบบอัตโนมัติโดยใช้ QIAcube Connect MDx โปรดดู รูปที่ 21 และ รูปที่ 22, หน้า 63 และ 64 ตามลำดับ ที่แสดงช่องสำหรับใส่ทิปและคอลัมน์ใช้แล้วเพื่อกำจัดทิ้งโดยเฉพาะ

เอกสารอ้างอิง

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.

แนวทางการแก้ไขปัญหา

แนวทางการแก้ไขปัญหานี้อาจช่วยแก้ปัญหาที่อาจเกิดขึ้น สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดดูหน้าคำถามที่พบบ่อยที่ศูนย์สนับสนุนด้านเทคนิคของเรา: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx นักวิทยาศาสตร์ในฝ่ายบริการด้านเทคนิคของบริษัท QIAGEN ยินดีตอบคำถามที่คุณอาจมีเกี่ยวกับทั้งข้อมูลและกณฑ์วิธีในคู่มือฉบับนี้ หรือตัวอย่างและเทคโนโลยีการทดสอบ (สำหรับข้อมูลติดต่อ ดูหน้าสุดท้าย หรือไปที่ www.qiagen.com)

	ความคิดเห็น และคำแนะนำ
RNA ย่อยสลาย	
การปนเปื้อนของ RNase	ระวังอย่านำ RNases เข้าไปในสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาในระหว่างขั้นตอนหรือการจัดการในภายหลัง (ดูภาคผนวก A หน้า 74)
ปริมาณ RNA ต่ำ	
a) เลือดน้อยกว่า 2.5 ml ที่เก็บใน PAXgene Blood RNA Tube (BRT)	ตรวจสอบให้มั่นใจว่าได้เก็บเลือด 2.5 ml ใน PAXgene Blood RNA Tube (BRT ดู *คู่มือ PAXgene Blood RNA Tube*)
b) ความเข้มข้นของ RNA ที่วัดได้ในน้ำ	RNA ต้องเจือจางใน Tris-HCl 10 mM ค่า pH 7.5* เพื่อการหาปริมาณที่ถูกต้อง (ดูภาคผนวก B หน้า75)
c) เศษเซลล์ที่ถ่ายโอนไปยัง PRC ในขั้นตอนที่ 9 และ 10 ของเกณฑ์วิธีแบบแมนนวล	หลีกเลี่ยงการถ่ายโอนอนุภาคขนาดใหญ่เมื่อทำการปิเปตส่วนเหนือตะกอนในขั้นตอนที่ 7 ของเกณฑ์วิธีแบบแมนนวล (การถ่ายโอนเศษเล็กเศษน้อยจะไม่ส่งผลกระทบต่อขั้นตอน)
d) ส่วนเหนือตะกอนไม่ได้ถูกกำจัดออกทั้งหมดในขั้นตอนที่ 3	ตรวจสอบให้มั่นใจว่าได้นำส่วนเหนือตะกอนออกทั้งหมดแล้ว หากรินส่วนเหนือตะกอน ให้นำหยดออกจากขอบของ PAXgene Blood RNA Tube (BRT) โดยการซับลงบนกระดาษ ใช้มาตรการป้องกันที่เหมาะสมเพื่อป้องกันการปนเปื้อนข้าม
e) หลังจากเก็บเลือดเข้า PAXgene Blood RNA Tube (BRT) แล้ว เลือดจะถูกบ่มเป็นเวลาน้อยกว่า 2 ชั่วโมง	บ่มเลือดใน PAXgene Blood RNA Tube (BRT) อย่างน้อย 2 ชั่วโมง หลังการเก็บ

* เมื่อทำงานกับสารเคมี ควรสวมเสื้อคลุมสำหรับห้องปฏิบัติการ ถุงมือแบบใช้แล้วทิ้ง และแว่นตาป้องกันที่เหมาะสมเสมอ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดศึกษาเอกสารข้อมูลความปลอดภัย (Safety Data Sheet, SDS) ที่เหมาะสมจากผู้จัดจำหน่ายของผลิตภัณฑ์นั้น

	ความคิดเห็น และคำแนะนำ
ค่า A_{260}/A_{280} ต่ำ	
f) น้ำที่ใช้ในการเจือจาง RNA สำหรับการวัด A_{260}/A_{280}	ใช้ Tris-HCl 10 mM ค่า pH 7.5 เพื่อเจือจาง RNA ก่อนวัดความบริสุทธิ์.* (ดูภาคผนวก B หน้า75)
g) เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ไม่ได้ปรับเป็นศูนย์อย่างเหมาะสม	ปรับสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เป็นศูนย์โดยใช้ช่องว่างที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์สำหรับชะล้าง (BR5) และ Tris-HCl 10 mM ค่า pH 7.5 ในสัดส่วนเดียวกับในตัวอย่างที่จะวัด บัฟเฟอร์สำหรับชะล้าง (BR5) มีการดูดซับสูงที่ 220 nm ซึ่งอาจทำให้ระดับการดูดซับพื้นหลังสูงหากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ไม่ได้รับการปรับค่าเป็นศูนย์อย่างเหมาะสม
เครื่องมือทำงานผิดปกติ	
QIAcube Connect MDx ทำงานไม่ถูกต้อง	อ่าน *คู่มือผู้ใช้ QIAcube Connect MDx* โดยให้ความสำคัญกับส่วนการแก้ไขปัญหา ตรวจสอบให้มั่นใจว่าเครื่องมือได้รับการบำรุงรักษาอย่างเหมาะสมตามที่อธิบายไว้ในคู่มือผู้ใช้

* 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.

สัญลักษณ์

สัญลักษณ์ต่อไปนี้อาจปรากฏในคำแนะนำสำหรับใช้งานหรือบนบรรจุภัณฑ์และฉลากกำกับ สัญลักษณ์เพิ่มเติมอธิบายไว้ใน ส่วนประกอบที่มีในชุดอุปกรณ์ (หน้า 5)

สัญลักษณ์	นิยามของสัญลักษณ์
V<N1>	เวอร์ชัน <N1> ของผลิตภัณฑ์
<N2>	บรรจุสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาที่เพียงพอสำหรับ <N2> การทดสอบ
	อ่านคำแนะนำในการใช้งาน
	ใช้ก่อน
IVD	อุปกรณ์การแพทย์สำหรับการวินิจฉัยภายนอกร่างกาย
REF	หมายเลขแค็ตตาล็อก
LOT	หมายเลขล็อต
MAT	หมายเลขวัสดุ
COMP	ส่วนประกอบ
NUM	หมายเลข
KU	หน่วย Kunitz
ADD	การเพิ่ม
CONT	ประกอบด้วย
RCNS	สร้างใหม่

DNase	ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส I
EtOH	เอทานอล
GITC	Guanidine isothiocyanate
RNase-Free DNase Set	RNase-Free DNase Set
GTIN	หมายเลขรายการการค้าทั่วโลก
	ขีดจำกัดอุณหภูมิ
	ขีดจำกัดสูงสุดของอุณหภูมิ
	ผู้ผลิต
EC REP	ตัวแทนผู้ได้รับอนุญาตในยุโรป ตามกฎระเบียบ (EU) 2017/746
	หมายเหตุสำคัญ
	มีการเติมเอทานอล
CE	เครื่องหมาย CE ผลิตภัณฑ์นี้เป็นไปตามข้อกำหนดของกฎระเบียบ (EU) 2017/746 สำหรับอุปกรณ์การแพทย์เพื่อการวินิจฉัยในหลอดทดลอง
UDI	ตัวระบุอุปกรณ์ที่เป็นเอกลักษณ์
	ข้อควรระวัง
	คำเตือน: พื้นผิวร้อน

ข้อมูลติดต่อ

ที่ QIAGEN เราภูมิใจในคุณภาพและความพร้อมของการสนับสนุนทางเทคนิคของเรา แผนกบริการด้านเทคนิคของเรามีเจ้าหน้าที่ที่เป็นนักวิทยาศาสตร์ที่มีประสบการณ์ซึ่งมีความเชี่ยวชาญในเชิงปฏิบัติและเชิงทฤษฎีอย่างกว้างขวางในอณูชีววิทยาและการใช้ผลิตภัณฑ์ PreAnalytiX หากคุณมีคำถามใดๆ เกี่ยวกับ PAXgene Blood RNA Kit โปรดอย่าลังเลที่จะติดต่อเรา

หากต้องการขอรับความช่วยเหลือด้านเทคนิคหรือต้องการทราบข้อมูลเพิ่มเติม โปรดติดต่อศูนย์สนับสนุนด้านเทคนิคของเรา ที่ **www.qiagen.com/Support**, โทรศัพท์ 00800-22-44-6000, หรือติดต่อแผนกบริการด้านเทคนิคของ QIAGEN ที่ใดที่หนึ่งหรือผู้จัดจำหน่ายในท้องถิ่นของท่าน (ดูที่ปกหลัง หรือไปที่ **www.qiagen.com**)

ภาคผนวก A: ข้อสังเกตทั่วไปเกี่ยวกับการจัดการ RNA

การจัดการ RNA

ไรโบนิวคลีเอส (RNases) เป็นเอ็นไซม์ที่มีความเสถียรและแอคทีฟมากซึ่งโดยทั่วไปไม่ต้องการปัจจัยร่วมในการทำงาน เนื่องจากการทำให้ RNases หมดฤทธิ์เป็นเรื่องยากและแม้ปริมาณเพียงน้อยนิดก็เพียงพอต่อการย่อยสลาย RNA จึงต้องกำจัดการปนเปื้อนของ RNase ที่อาจเป็นไปได้บนอุปกรณ์พลาสติกหรือเครื่องแก้วใดๆ ก่อนนำมาใช้ทุกครั้ง ควรใช้ความระมัดระวังเป็นอย่างยิ่งเพื่อหลีกเลี่ยงการนำ RNases เข้าสู่ตัวอย่าง RNA โดยไม่ได้ตั้งใจระหว่างหรือหลังขั้นตอนการแยก ในการสร้างและรักษาสภาพแวดล้อมที่ปราศจาก RNase ต้องใช้ความระมัดระวังในระหว่างการปรับสภาพและการใช้ภาชนะแบบใช้แล้วทิ้งและใช้แล้วไม่ทิ้งรวมทั้งสารละลายในขณะที่ทำงานกับ RNA

การจัดการทั่วไป

ควรใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาและปลอดเชื้อที่เหมาะสมเมื่อทำงานกับ RNA มือและอนุภาคฝุ่นเป็นพาหะของแบคทีเรียและเชื้อราและเป็นแหล่งที่มาของการปนเปื้อน RNase ที่พบบ่อยที่สุด สวมถุงมือลาเท็กซ์หรือไวนิลทุกครั้งในขณะที่จัดการสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาและตัวอย่าง RNA เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของ RNase จากพื้นผิวของผิวหรือจากอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการที่เต็มไปด้วยฝุ่น เปลี่ยนถุงมือบ่อยๆ และปิดหลอดทุกครั้งที่ทำได้ เก็บ RNA ที่บริสุทธิ์ไว้บนน้ำแข็งเมื่อปิเปตส่วนย่อยสำหรับแอปพลิเคชันดาวน์สตรีม

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

ภาคผนวก B: การหาปริมาณและการกำหนดคุณภาพของ RNA ทั้งหมด

การหาปริมาณของ RNA

ความเข้มข้นของ RNA ควรถูกกำหนดโดยการวัดการดูดซับที่ 260 nm (A_{260}) ในเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ตรวจสอบให้มั่นใจว่ามีความสำคัญ การอ่านควรอยู่ในช่วงเชิงเส้นของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ การดูดซับ 1 หน่วยที่ 260 nm สอดคล้องกับ 44 µg ของ RNA ต่อ ml (A_{260} = 1⇒ 44 µg/m) ความสัมพันธ์นี้ใช้ได้กับการวัดใน Tris-HCl 10 mM ค่า pH 7.5 เท่านั้น.* ดังนั้นหากจำเป็นต้องเจือจางตัวอย่าง RNA และควรทำใน Tris-HCl 10 mM ตามที่กล่าวไว้ด้านล่าง (ดู "ความบริสุทธิ์ของ RNA", หน้า 76) อัตราส่วนระหว่างค่าการดูดซับที่ 260 และ 280 nm ให้ความบริสุทธิ์ของ RNA โดยประมาณ เมื่อทำการวัดตัวอย่าง RNA ต้องแน่ใจว่า Cuvettes นั้นปราศจาก RNase ปรับเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เป็นศูนย์โดยใช้ช่องว่างที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5) และบัฟเฟอร์สำหรับ Tris-HCl ในสัดส่วนเดียวกับในตัวอย่างที่จะวัด บัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5) มีการดูดซับสูงที่ 220 nm ซึ่งอาจทำให้ระดับการดูดซับพื้นหลังสูงหากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ไม่ได้รับการปรับค่าเป็นศูนย์อย่างเหมาะสม ตัวอย่างการคำนวณที่เกี่ยวข้องกับการหาปริมาณ RNA แสดงไว้ด้านล่าง

ปริมาตรของตัวอย่าง RNA	=	80 µl
การเจือจาง (1/15)	=	ตัวอย่าง RNA 10 µl + 10 mM Tris-HCl 140 µl ค่า pH 7.5
วัดการดูดซับของตัวอย่างเจือจางใน Cuvette (ปราศจาก RNase)		
A_{260}	=	0.3
ความเข้มข้นของตัวอย่าง	=	44 x A_{260} x ปัจจัยการเจือจาง
	=	44 x 0.3 x 15
	=	198 µg/ml
ปริมาณรวม	=	ความเข้มข้น x ปริมาตรของตัวอย่างเป็นมิลลิลิตร
	=	198 µg/ml x 0.08 ml
	=	15.8 µg RNA

* เมื่อทำงานกับสารเคมี ควรสวมเสื้อคลุมสำหรับห้องปฏิบัติการ ถุงมือแบบใช้แล้วทิ้ง และแว่นตาป้องกันที่เหมาะสมเสมอ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดศึกษาเอกสารข้อมูลความปลอดภัย (Safety Data Sheet, SDS) ที่เหมาะสมจากผู้จัดจำหน่ายของผลิตภัณฑ์นั้น

ความบริสุทธิ์ของ RNA

อัตราส่วนของการอ่านที่ 260 nm และ 280 nm (A_{260}/A_{280}) ให้ความบริสุทธิ์ของ RNA โดยประมาณตามสารปนเปื้อนที่ดูดซับใน UV เช่นโปรตีน อย่างไรก็ตาม อัตราส่วน A_{260}/A_{280} ได้รับอิทธิพลอย่างมากจาก pH pH ที่ต่ำลงส่งผลให้อัตราส่วน A_{260}/A_{280} และลดความไวในการปนเปื้อนของโปรตีน.* สำหรับค่าที่ถูกต้อง เราขอแนะนำให้วัดค่าการดูดซับใน Tris-HCl 10 mM ค่า pH 7.5 RNA บริสุทธิ์มีอัตราส่วน A_{260}/A_{280} ของ 1.8–2.2 ใน Tris-HCl 10 mM ค่า pH 7.5 ปรับเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เป็นศูนย์โดยใช้ช่องว่างที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5) และบัฟเฟอร์สำหรับ Tris-HCl ในสัดส่วนเดียวกับในตัวอย่างที่จะวัด บัฟเฟอร์สำหรับการชะล้าง (BR5) มีการดูดซับสูงที่ 220 nm ซึ่งอาจทำให้ระดับการดูดซับพื้นหลังสูงหากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ไม่ได้รับการปรับค่าเป็นศูนย์อย่างเหมาะสม

* 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.

ภาคผนวก C: การจัดการ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

คำแนะนำต่อไปนี้จาก BD อาจเป็นประโยชน์เมื่อจัดการ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ดูคู่มือ *PAXgene Blood RNA Tube* สำหรับข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

คำแนะนำในการกำจัดฝาปิด BD Hemogard

1. จับ PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ด้วยมือเดียวโดยวางนิ้วหัวแม่มือไว้ใต้ฝาปิด BD Hemogard (เพื่อเพิ่มความมั่นคง ให้วางแขนบนพื้นผิวทึบ) ใช้มืออีกข้างหนึ่ง บิดฝาปิด BD Hemogard ในขณะที่ดันขึ้นพร้อมกันด้วยนิ้วหัวแม่มือของมืออีกข้างหนึ่งจนกว่าจุกปิดหลอดจะคลายเท่านั้น
2. เลื่อนนิ้วหัวแม่มือออกไปก่อนยกฝาปิด ห้ามใช้นิ้วหัวแม่มือดันฝาปิดหลอด PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ออก ข้อควรระวัง: มีอันตรายจากการสัมผัสหาก PAXgene Blood RNA Tube (BRT) บรรจุเลือด เพื่อช่วยป้องกันการบาดเจ็บในระหว่างการถอดฝาปิดออก สิ่งสำคัญคือต้องเอานิ้วหัวแม่มือที่ใช้ดันฝาปิดขึ้นด้านบนออกจากการสัมผัสกับ PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ทันทีที่ฝาปิด BD Hemogard คลายออก
3. ยกฝาปิด PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ออก ในกรณีที่ไม่น่าจะเกิดขึ้นได้ที่ตัวป้องกันพลาสติกแยกออกจากจุกยาง ห้ามประกอบฝาปิดใหม่ ถอดจุกยางออกจาก PAXgene Blood RNA Tube (BRT) อย่างระมัดระวัง

คำแนะนำสำหรับการใส่ฝาปิด BD Hemogard รอง

1. เปลี่ยนฝาปิด PAXgene Blood RNA Tube (BRT)
2. บิดและดันลงให้แน่นจนกระทั่งจุกปิดเข้าที่จนสุด จำเป็นต้องใส่จุกปิดเข้าไปใหม่อย่างสมบูรณ์เพื่อให้ฝาปิดยังคงอยู่อย่างปลอดภัยบน PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ในระหว่างการจัดการ

ข้อมูลการสั่งซื้อ

ผลิตภัณฑ์	สิ่งที่บรรจุ	หมายเลขแค็ตตาล็อก
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, หลอดแปรรูป, RNase-Free DNase I, สารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาและบัฟเฟอร์ที่ปราศจาก RNase เพื่อใช้ร่วมกับ PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	หลอดเก็บเลือด 100	762165
ผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องซึ่งสามารถสั่งได้จาก QIAGEN สำหรับการแยก RNA แบบอัตโนมัติบน QIAcube		
Starter Pack, QIAcube	แพ็คประกอบด้วย: ชั้นวางขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา (3); แถบติดฉลากชั้นวาง (8); ทิปฟิลเตอร์ 200 µl (1024); ทิปฟิลเตอร์ 1000 µl (1024); ทิปฟิลเตอร์ 1000 µl, wide-bore (1024); ขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา 30 ml (18); อะแดปเตอร์โรเตอร์ (240); ที่ยึดอะแดปเตอร์โรเตอร์	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	ทิปฟิลเตอร์แบบใช้แล้วทิ้งที่ปราศจากเชื้อ วางบนชั้น	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	ขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา (30 ml) พร้อมฝา แพ็ค 6 ขวด; สำหรับใช้กับชั้นวางขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาเครื่องมือ QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	สำหรับ 240 ชุด: โรเตอร์อะแดปเตอร์แบบใช้แล้วทิ้ง 240 ตัว; สำหรับใช้กับเครื่องมือ QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	ชั้นวางสำหรับใส่ขวดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาขนาด 30 ml 6 ขวดบนโต๊ะทำงานของ QIAcube	9026197
Rotor Adapter Holder	ที่ยึดสำหรับอะแดปเตอร์โรเตอร์แบบใช้แล้วทิ้ง 12 ตัว; สำหรับใช้กับ QIAcube	990392
ผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องซึ่งสามารถสั่งได้จาก BD สำหรับการเก็บตัวอย่างเลือดด้วย PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)*		
Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 21G, เข็ม 0.75 inch (0.8 × 19 mm), หลอด 12 inch (305 mm) พร้อมอะแดปเตอร์ Luer; 50 ต่อกล่อง, 200 ต่อลัง	367286

ผลิตภัณฑ์	สิ่งที่บรรจุ	หมายเลขแค็ตตาล็อก
BD Vacutainer One-Use Holder	ลังสำหรับเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm และ 16 mm เท่านั้น 1,000/ลัง	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	หลอดดูด 13 x 75 mm ขนาด 4.0 ml พร้อมฝาปิด BD Hemogard สีแดงและฉลากกระดาษ 100/กล่อง 1,000/ลัง	368975
BD Vacutainer EST Tube	หลอดดูด 13 x 75 mm ขนาด 3.0 ml พร้อมฝาปิด BD Hemogard แบบใสและ-ฉลากใส; 100/กล่อง 1,000/ลัง	362725
BD Vacutainer No Additive (Z) Tube	หลอดดูด 13 x 75 mm ขนาด 3.0 ml พร้อมฝาปิด BD Hemogard แบบใสและฉลากกระดาษ 100/กล่อง 1,000/ลัง	366703

* อุปกรณ์เสริมสำหรับการเก็บเลือดเหล่านี้เป็นตัวแทนของผลิตภัณฑ์ทั่วไปที่สามารถใช้กับ PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ได้ หากต้องการข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับอุปกรณ์เสริมเหล่านี้รวมถึงวิธีการสั่งซื้อโปรดไปที่ www.preanalytix.com

ประวัติการแก้ไขเอกสาร

วันที่	การเปลี่ยนแปลง
04/2022	เผยแพร่ IVDR ครั้งแรก

หมายเหตุ

หมายเหตุ

สำหรับข้อมูลใบอนุญาตและข้อมูลปฏิเสธความรับผิดชอบผลิตภัณฑ์จำเพาะที่เป็นปัจจุบัน ดูคู่มือ PreAnalytiX® หรือ คู่มือชุดอุปกรณ์ QIAGEN หรือคู่มือผู้ใช้ที่เกี่ยวข้อง คู่มือชุดอุปกรณ์และคู่มือผู้ใช้งาน Pre AnalytiX และ QIAGEN จะมีให้ที่www.preanalytix.com และ www.qiagen.comหรือสามารถขอได้จากฝ่ายบริการด้านเทคนิคของ PreAnalytiX

BLOOD · TISSUE · BONE MARROW
The better the source, the more to eXplore.

สำรวจเพิ่มเติมที่: **www.preanalytix.com**

HB-3009-001 04/2022

PreAnalytiX
A QIAGEN / BD Company