

Únor 2023

PAXgene[®] Blood RNA Kit (příručka) Návod k použití



Verze 3 (V3)

IVD

Pro diagnostické použití in vitro



REF

762174



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

Vyrobeno QIAGEN[®] GmbH pro PreAnalytiX GmbH

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO

R2

MAT

1130774CS

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

PreAnalytiX GmbH, 8634 Hombrechtikon, CH.

© 2023 PreAnalytiX GmbH. Pokud není uvedeno jinak, PreAnalytiX, logo PreAnalytiX a ostatní ochranné známky jsou majetkem společnosti PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, Švýcarsko.

Omezená licenční smlouva pro sadu PAXgene Blood RNA Kit

Používáním tohoto výrobku vyjadřuje každý kupující nebo uživatel výrobku svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze s komponenty dodanými v panelu. Společnost PreAnalytiX® neposkytuje žádnou licenci v rámci svého duševního vlastnictví na použití nebo začlenění přiložených součástí tohoto panelu s jakýmkoliv součástmi, které součástí tohoto panelu nejsou, s výjimkou případů popsanych v protokolech dodaných s produktem, v této příručce a v dalších protokolech dostupných na webových stránkách www.qiagen.com a www.preanalytix.com.
2. Mimo výslovně uvedenou licenci společnost PreAnalytiX neposkytuje žádnou záruku, že tato sada a/nebo její použití neporušuje práva třetích stran.
3. Tato sada je licencována k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepracovávat ani opakovaně prodávat.
4. Společnost PreAnalytiX zvláště vylučuje odpovědnost za jakékoliv jiné licence, vyjádřené či implikované, než výslovně uvedené.
5. Kupující a uživatel této sady souhlasí s tím, že nepodnikne ani nikomu jinému neumožní podniknout žádné kroky, které by mohly vést k jakékoliv shora zakázané činnosti anebo ji usnadnily.
6. Společnost PreAnalytiX může prosazovat zákazy této omezené licenční smlouvy u kteréhokoliv soudu a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy, včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit tuto omezenou licenční smlouvu nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti se sadou a/nebo jejími součástmi.

Aktualizované licenční podmínky jsou uvedeny na webových stránkách www.qiagen.com a www.preanalytix.com.

HB-3009-002 BD-8945 1130774CS © 2023 PreAnalytiX GmbH, všechna práva vyhrazena.

Distributoři společnosti PreAnalytiX

Produkty PreAnalytiX vyrábějí nebo distribuují společnosti QIAGEN nebo BD pro společnost PreAnalytiX.

Obsah

Obsah.....	3
Účel použití	6
Určený uživatel.....	6
Popis a principy.....	7
Úvod	7
Princip a popis postupu.....	7
Odběr a stabilizace vzorku	8
Izolace RNA.....	8
Manuální izolace RNA	9
Automatizovaná izolace RNA.....	11
Dodávané materiály.....	14
Obsah soupravy.....	14
Součásti sady.....	15
Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky.....	16
Pro všechny protokoly.....	16
Pro manuální protokol	17
Pro automatizovaný protokol.....	17
Varování a bezpečnostní opatření	18
Informace o bezpečnosti.....	18
Informace pro případ nouze.....	18
Bezpečnostní opatření	19
Skladování reagensů a manipulace s nimi.....	22

Stabilita při používání	22
Odběr a skladování vzorků a manipulace s nimi	23
Protokol: Manuální izolace celkové RNA z plné lidské krve odebrané do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (Blood RNA Tubes, BRT)	24
Protokol: Automatizovaná izolace celkové RNA z plné lidské krve odebrané do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	32
Omezení použití produktu	39
Kontrola kvality	39
Charakteristika funkčních vlastností.....	40
Odběr a stabilizace vzorku	40
Manuální izolace RNA	45
Automatizovaná izolace RNA.....	53
Stabilita izolované RNA	56
Důležité poznámky	57
Používání přístroje QIAcube Connect MDx	57
Spuštění přístroje QIAcube Connect MDx	57
Instalace protokolů na přístroji QIAcube Connect MDx.....	59
Naplnění přístroje QIAcube Connect MDx	60
Odstředivací kolonky (PSC, PRC), mikrocentrifugační zkumavky a plastové předměty k přístroji QIAcube Connect MDx	63
Likvidace	69
Literatura.....	70
Návod na řešení potíží.....	71
Symboly	73
Kontaktní údaje	75

Příloha A: Obecné pokyny pro manipulaci s RNA	76
Příloha B: Kvantifikace a stanovení kvality celkové RNA	77
Příloha C: Manipulace se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	79
Informace pro objednání.....	81
Historie revizí dokumentu.....	83

Účel použití

Pro diagnostické použití in vitro.

Systém PAXgene Blood RNA System se skládá ze zkumavky pro odběr krve (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) a sady pro purifikaci kyseliny nukleové (PAXgene Blood RNA Kit). Je určen pro odběr, skladování a přepravu krve a stabilizaci intracelulární RNA v uzavřené zkumavce a následnou izolaci a purifikaci hostitelské RNA z plné krve pro RT-PCR používanou v molekulárních diagnostických testech.

Charakteristika funkčních vlastností systému PAXgene Blood RNA System platí pouze pro transkripty genů FOS a IL1B. Za stanovení odpovídající charakteristiky funkčních vlastností systému PAXgene Blood RNA System pro jiné transkripty je odpovědný uživatel.

Indikace k použití

Sada PAXgene Blood RNA Kit slouží k purifikaci intracelulární RNA z plné krve, která byla odebrána do zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Pokud sadu použijete ve spojení se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tube (BRT), získáte ze vzorků plné krve purifikovanou intracelulární RNA, která může být použita v molekulárních diagnostických testech založených na reakci RT-PCR.

Určený uživatel

Tento výrobek je určen pro použití profesionálními uživateli, např. techniky a lékaři vyškolenými v postupech diagnostiky in vitro.

Tato sada je určena pro profesionální použití.

Popis a principy

Úvod

Odběr vzorku plné krve je u mnoha molekulárně biologických analýz celulární RNA prvním krokem. Hlavním problémem v těchto testech je však nestabilita profilu celulární RNA in vitro. Studie prováděné ve společnosti PreAnalytiX ukázaly, že se počet kopií jednotlivých druhů mRNA v plné krvi může během přepravy nebo skladování při pokojové teplotě změnit více než tisícinásobně (Rainen a kol. 2002). Příčinou je rychlá degradace RNA a indukovaná exprese určitých genů po odběru krve. Takové změny profilu RNA znemožňují spolehlivé studie genové exprese. Metoda zachování profilu exprese RNA během odběru krve a po něm je tedy pro přesné analýzy genové exprese v plné lidské krvi nezbytná.

Princip a popis postupu

Společnost PreAnalytiX vyvinula systém, který umožňuje odběr, stabilizaci, skladování a přepravu vzorků plné lidské krve, společně s rychlým a efektivním protokolem pro izolaci intracelulární RNA. Systém vyžaduje použití zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) k odběru krve a stabilizaci RNA, po které následuje manuální nebo automatizovaná izolace RNA pomocí sady PAXgene Blood RNA Kit. Manuální i automatizovaný protokol poskytují v podstatě rovnocennou účinnost vzhledem ke kvalitě a výtěžku RNA. V této příručce jsou uvedeny údaje o účinnosti pro manuální protokol (od strany 45) a pro automatizovaný protokol (od strany 53).

Systém PAXgene Blood RNA System umožňuje standardizaci kroků předanalytického pracovního postupu od odběru krevních vzorků po izolaci buněčné RNA podle ISO 20186-1:2019, Molekulární diagnostická vyšetření in vitro – Specifikace pro procesy předvyšetření pro plnou venózní krev – Část 1: Izolovaná buněčná RNA.

Odběr a stabilizace vzorku

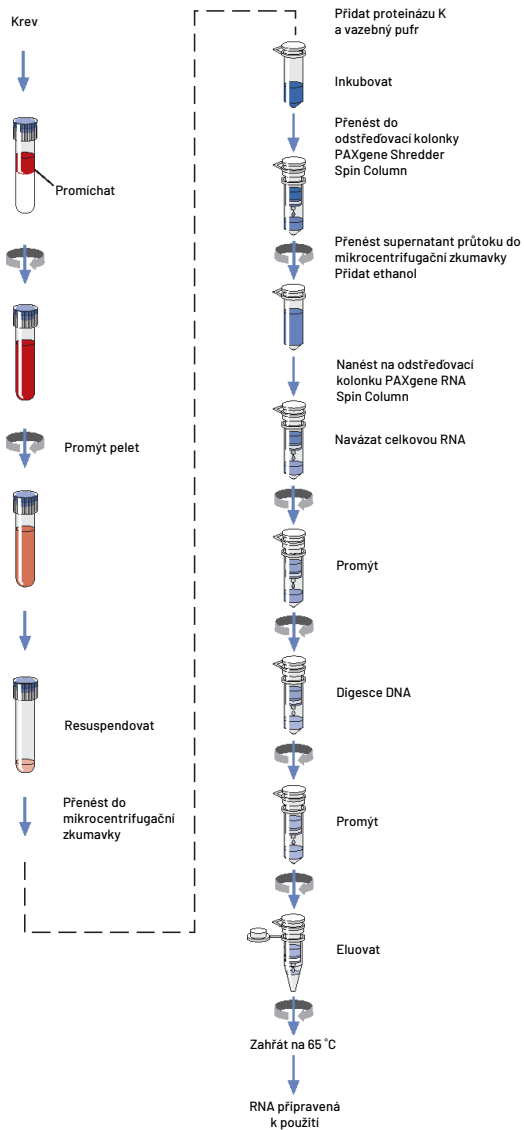
Zkumavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) obsahují patentovanou reagensii pro stabilizaci RNA. Toto aditivum chrání molekuly RNA před degradací RNázami a minimalizuje změny genové exprese ex vivo. Charakteristika funkčních vlastností systému PAXgene Blood RNA System platí pro transkripty genů FOS a IL1B, které si můžete prohlédnout od strany 40.

Izolace RNA

Sada PAXgene Blood RNA Kit je určena k izolaci celkové RNA z 2,5 ml plné lidské krve, která byla odebrána do zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Metoda je jednoduchá a může být provedena na základě manuálního i automatizovaného postupu (viz obrázek 1 nebo obrázek 3, strana 10, respektive 12). Izolace začíná v obou protokolech centrifugací za účelem peletování nukleových kyselin ve zkumavce PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Pelet se promyje a resuspenduje a následuje manuální nebo automatizovaná izolace RNA. Oba protokoly v podstatě postupují podle stejných kroků a pracují se stejnými komponenty sady.

Manuální izolace RNA

Resuspendovaný pelet se inkubuje v optimalizovaných pufrch spolu s proteinázou K (PK), aby se navodila proteinová digesce. Dodatečná centrifugace pomocí odstředovací kolony PAXgene Shredder (PSC) slouží k homogenizaci buněčného lyzátu a k odstranění zbylého buněčného odpadu. Supernatant průtoku se přenesse do nové mikrocentrifugační zkumavky (MicroCentrifuge Tube, MCT). Přidáním ethanolu se nastaví optimální vazební podmínky a lyzáat se přenesse do odstředovací kolony PAXgene RNA (PAXgene RNA spin column, PRC). Při následné krátké centrifugaci se RNA selektivně naváže na silikagelovou membránu PAXgene, kdežto kontaminanty jí projdou. Zbylé kontaminanty se odstraní několika účinnými promývacími kroky. Mezi prvním a druhým promývacím krokem se membrána inkubuje DNázou I (RNFD), aby se odstranily případné navázané zbytky DNA. Po promývacích krocích se RNA eluuje v elučním pufru (BR5) a denaturuje teplem. Charakteristiku funkčních vlastností manuální izolace RNA pomocí systému PAXgene Blood RNA System si můžete prohlédnout na straně 45.



Obrázek 1: Manuální postup PAXgene Blood RNA.

Automatizovaná izolace RNA

Izolace krevní RNA je na přístroji QIAGEN QIAcube Connect MDx automatizovaná. Inovativní přístroj využívá pokročilou technologii pro zpracování odstředivacích kolonek QIAGEN, které umožňují bezproblémovou integraci automatizované přípravy vzorku s nízkou propustností do pracovního procesu laboratoře. Příprava vzorku s použitím přístroje QIAcube Connect MDx probíhá stejným způsobem jako manuální postup (tzn. lýza, vázání, promývání a eluce) a lze ji provést pomocí stejné sady PAXgene Blood RNA Kit.

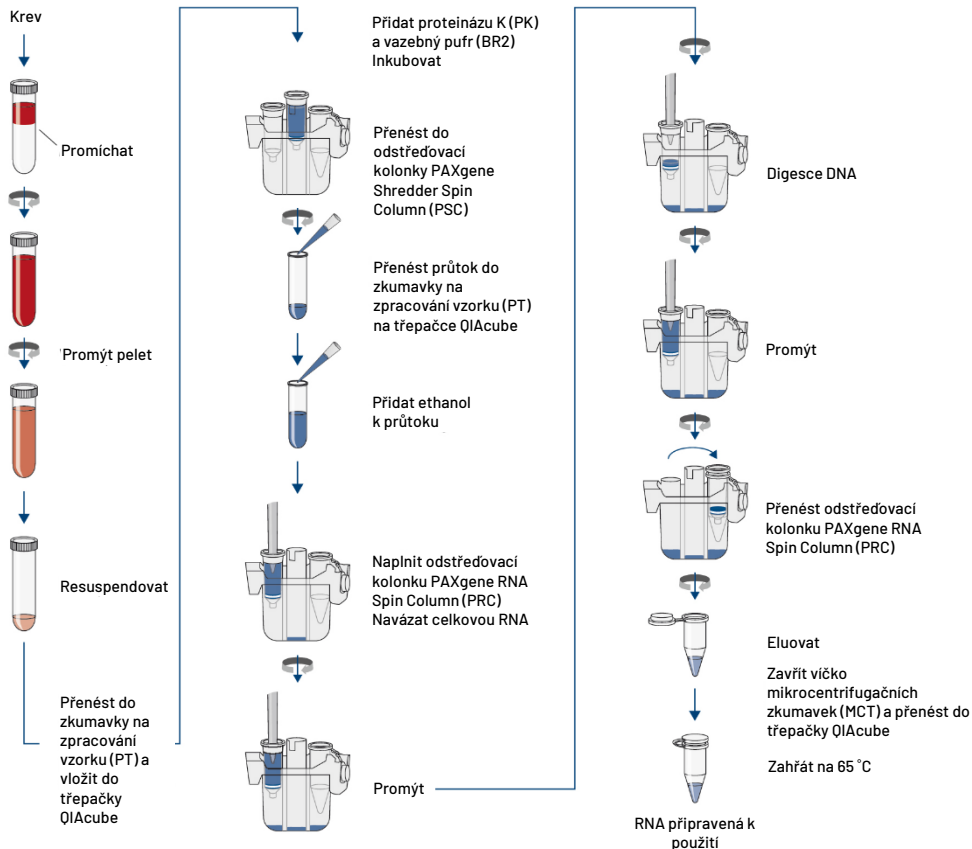


Obrázek 2: QIAcube Connect MDx.



Produkt QIAGEN QIAcube Connect MDx není dostupný ve všech zemích. Další podrobnosti poskytne technický servis společnosti QIAGEN.

Protokol automatizované izolace RNA obsahuje 2 části (resp. protokoly) „PAXgene Blood RNA Part A“ (z krve v eluční zkumavce PAXgene Blood RNA Tube) a „PAXgene Blood RNA Part B“ (po eluci do RNA připravené k použití), mezi nimiž je krátký manuální zásah u obou částí (viz obrázek 3).




Obrázek 3: Automatizovaný postup PAXgene Blood RNA.

Centrifugovaný, promytý a resuspendovaný pelet nukleové kyseliny (viz „Izolace RNA“, strana 8) se přenesse ze zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (Blood RNA Tube, BRT) do zkumavek na zpracování vzorku (Processing Tube, PT), které jsou umístěny v termotřepačce na pracovní ploše přístrojů QIAcube Connect MDx. Laborant z nabídky vybere a spustí protokol „PAXgene Blood RNA Part A“. QIAcube Connect MDx provádí kroky protokolu až po eluci RNA v elučním pufru (BR5). Laborant přenesse mikrocentrifugační zkumavky (microcentrifuge tubes, MCT) obsahující purifikovanou RNA do termotřepačky přístrojů QIAcube Connect MDx. Z nabídky laborant vybere a spustí protokol „PAXgene Blood RNA Part B“, přičemž tepelná denaturace proběhne v přístrojích QIAcube Connect MDx. Charakteristika funkčních vlastností automatizované izolace RNA prostřednictvím systému PAXgene Blood RNA System na přístroji QIAcube Connect MDx je uvedena na straně 53.

Dodávané materiály

Obsah soupravy

PAXgene Blood RNA Kit Katalogové č. Počet odběrových zařízení			(50) 762174 50
Název komponenty	Popis	Symbol	Množství
BR1	Resuspension Buffer (Pufr k resuspenzi)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (vazebný pufr)*	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (Promývací pufr 1)*	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (Promývací pufr 2)(koncentrát)†	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Eluční pufr)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (bottle)(Voda bez obsahu RNázy(lahev))	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid)(Proteináza K (zelené víčko))	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red)(Kolonky PAXgene k odstředění RNA (červené))‡	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Procesní zkumavky (2 ml)§	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard™	Secondary BD Hemogard Closures (Sekundární uzávěry BD Hemogard)	SEC CLOS	50
MCT	Mikrocentrifugační zkumavky (1,5 ml)§	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized)(DNáza I bez obsahu RNázy (lyofilizovaná))	DNA REM	1500 jednotek Kunitz¶
RDD	DNA Digestion Buffer (Pufr k digesci DNA; bílé víčko)	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid)(Pufr k resuspenzi DNázy (zkumavka, fialové víčko))	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac)(Kolonky PAXgene Shredder k rozmělnění a odstředění vzorku (fialové))‡	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Příručka	PAXgene Blood RNA Kit Handbook (Version 3)(Příručka pro sadu PAXgene Blood RNA Kit (verze 3))		1

* Nesmí přijít do kontaktu s desinfekčními prostředky, které obsahují bělidla. Obsahuje sůl guanidinu. Informace o bezpečnosti jsou uvedeny na straně 18.

† Promývací pufr 2 (BR4) je dodáván jako koncentrát. Před prvním použitím přidejte do lahvičky 4násobný objem ethanolu (96–100 % obj., stupeň čistoty p.a.), jak je popsáno na lahvičce, abyste vytvořili pracovní roztok.

‡ Každá kolonka je balena v blistru, který je určen pouze k jednorázovému použití. Pokyny k likvidaci naleznete v části Informace o bezpečnosti.

§ Zkumavky jsou k dispozici v plastových sáčcích. Každá zkumavka je určena pouze k jednomu použití. Pokyny k likvidaci naleznete v části Informace o bezpečnosti.

¶ Jednotky Kunitz jsou běžně užívanými jednotkami pro měření DNázy I; jsou definované jako množství DNázy I způsobující nárůst A_{260} o 0,001 za minutu na mililitr při teplotě 25 °C a pH 5,0, přičemž je jako substrát použita vysoce polymerní DNA (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* 33, 349 a 363).

Součásti sady

Název komponenty	Popis	Účinná přísada	Koncentrace
BR1	Resuspension Buffer (Pufr k resuspenzi)	Žádný	-
BR2	Binding Buffer (Vazebný pufr)	Guanidin thiokyanát	$\geq 30 - < 50\%$ hm/hm
BR3	Wash Buffer 1 (Promývací pufr 1)	Guanidin thiokyanát Ethanol	$\geq 10 - < 20\%$ hm/hm $\geq 3 - < 10\%$ hm/hm
BR4	Wash Buffer 2 (Promývací pufr 2) (koncentrát)	Žádný	-
BR5	Elution Buffer (Eluční pufr)	Žádný	-
RNFW	RNase-Free Water (bottle) (Voda bez obsahu RNázy (lahev))	Žádný	-
PK	Proteinase K (green lid) (Proteináza K (zelené víčko))	Proteináza K	$\geq 1 - < 3\%$ hm/hm
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNáza I bez obsahu RNázy (lyofilizovaná))	DNáza	$\geq 90 - < 100\%$ hm/hm
RDD	DNA Digestion Buffer (Pufr k digesci DNA; bílé víčko)	Žádný	-
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (Pufr k resuspenzi DNázy (zkumavka, fialové víčko))	Žádný	-

Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky

Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (BL), které obdržíte od dodavatele výrobku.

Pro všechny protokoly

- PAXgene Blood RNA Tubes (zkumavky BRT pro odběr RNA z krve, PreAnalytiX; kat. čís. 762165)
- Ethanol (96–100% obj., stupeň čistoty p.a.)
- Pipety* (10 µl – 4 ml)
- Sterilní pipetovací špičky bez obsahu RNázy, s aerosolovou bariérou jako ochranou před kontaminací†
- Odměrný váleček‡
- Centrifuga* schopná dosáhnout otáček 3000–5000 × g, vybavená otočným rotorem pro uchycení zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Vířivý mixér (Vortex)*
- Drcený led
- Permanentní fixa pro popisování

* Ujistěte se, že jsou zařízení a přístroje kontrolovány, udržovány a pravidelně kalibrovány podle doporučení výrobce.

† Zajistěte, abyste byli obeznámeni s pokyny pro manipulaci s RNA (příloha A, strana 75).

‡ K odměření množství ethanolu, které se přidává ke koncentrátu pufru BR4.

Pro manuální protokol

- Mikrocentrifuga s variabilními otáčkami* schopná dosáhnout rozsahu alespoň 1000–8000 × g, ačkoli lze použít nižší a vyšší g-síly (podrobnosti najdete v krocích protokolu), a vybavená rotorem pro 2ml mikrocentrifugační zkumavky
- Třepací inkubátor* pro inkubaci při teplotě 55 °C a 65 °C s variabilními otáčkami ≥ 400 ot./min., nepřekračujícími 1400 ot./min. (např. Eppendorf® Thermomixer Compact nebo ekvivalent)

Pro automatizovaný protokol

- Nůžky
- QIAcube Connect MDx* (QIAGEN, kat. čís. 9003070)

Spotřební materiál ke QIAcube Connect MDx:

- Špičky s filtrem Filter-Tips, 1000 µl (1024)(QIAGEN, kat. čís. 990352)†
- Reagenční lahvičky Reagent Bottles, 30 ml (6)(QIAGEN, kat. čís. 990393)†
- Adaptéry do rotoru Rotor Adapters (10× 24)(QIAGEN, kat. čís. 990394)†

Příslušenství ke QIAcube Connect MDx:

- Držák pro adaptéry do rotoru Rotor Adapter Holder (QIAGEN, kat. čís. 990392)†

Balíčky služeb pro QIAcube Connect MDx:

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

* Ujistěte se, že jsou zařízení a přístroj kontrolovány, udržovány a pravidelně kalibrovány podle doporučení výrobce.

† Obsaženo také v úvodním balíčku Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, kat. čís. 990395).

Varování a bezpečnostní opatření

Zákazníci v Evropské unii by měli vzít na vědomí, že od nich je vyžadováno hlášení závažných událostí, ke kterým došlo v souvislosti se zařízením, a to výrobci a kompetentnímu orgánu členského státu, pod nějž uživatel a/nebo pacient spadá.

Zákazníci mimo Evropskou unii by měli vzít na vědomí, že od nich může být vyžadováno, aby se seznámili s místními předpisy a hlásili tak závažné události, ke kterým došlo v souvislosti se zařízením, a to výrobci a/nebo jeho autorizovanému zástupci a regulačnímu orgánu, pod nějž uživatel a/nebo pacient spadá.

Informace o bezpečnosti

Při práci s chemikáliemi a biologicky nebezpečnými materiály noste vždy vhodný laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL). Ty jsou k dispozici také online v PDF formátu na stránkách www.qiagen.com/safety, kde můžete najít, přečíst a vytisknout bezpečnostní listy (BL) všech sad a součástí sad QIAGEN.

- Veškeré chemikálie a biologické materiály jsou potenciálně nebezpečné. Vzorky krve jsou potenciálně infekční, a musí se s nimi proto zacházet jako s biologicky nebezpečnými materiály.
- Biologicky nebezpečný odpad a odpad ze sady zlikvidujte v souladu s místními bezpečnostními předpisy.

Informace pro případ nouze

CHEMTREC

Mimo USA a Kanadu +1 703-527-3887

Bezpečnostní opatření

Při práci s krví dodržujte univerzální bezpečnostní opatření, abyste se vyhnuli riziku potenciální expozice patogenům přenášeným krví (např. HIV, hepatitida B a další krví přenosné viry). K ochraně před expozicí krví používejte rukavice, pláště, ochranu očí a další osobní ochranné prostředky a technické prostředky. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici online v pohodlném a kompaktním formátu PDF na webových stránkách www.preanalytix.com, kde můžete nalézt, zobrazit a vytisknout BL pro tuto sadu.

UPOZORNĚNÍ



NEPŘIDÁVEJTE roztoky bělicích prostředků nebo kyselin přímo do odpadních materiálů z přípravy vzorků.

Vazebný pufr (BR2) a promývací pufr 1 (BR3) obsahují guanidin isothiokyanát, který může při kontaktu s bělidly vytvářet vysoce reaktivní sloučeniny. Pokud se rozlije vazebný pufr (BR2) nebo promývací pufr 1 (BR3), vyčistěte zasažené místo vhodným laboratorním detergentem a vodou. Obsahuje-li rozlitá kapalina potenciálně infekční látky, vyčistěte zasažené místo nejprve laboratorním detergentem a vodou a potom roztokem 1% (obj.) chlornanu sodného (bělidla).

Stabilizační roztok RNA a směs krve ze zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (Blood RNA Tube, BRT) mohou být dezinfikovány pomocí 1 jednotky objemu roztoku bělidla (5% chlornan sodný) na 9 jednotek objemu stabilizačního roztoku RNA a směsi krve.

Odpad vznikající při přípravě vzorku, např. supernatanty po centrifugaci v rámci izolace RNA, by měl být vždy považován za potenciálně infekční. K likvidaci biologických materiálů používejte nádoby na biologický odpad. Likvidace musí být provedena v souladu s místními předpisy a postupy vašeho zařízení.

Specifické komponenty sady PAXgene Blood RNA Kit jsou určeny pouze k jednorázovému použití. Informace o jednotlivých komponentech najdete v části Obsah soupravy na stránce 14.

Pro jednotlivé komponenty sady PAXgene Blood RNA Kit platí následující pokyny týkající se rizika a bezpečnostních opatření. Informace o bezpečnosti týkající se zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) naleznete v příručce PAXgene Blood RNA Tube .

Buffer BR2



Obsahuje guanidin isothiokyanát. Nebezpečí! Zdraví škodlivý při požití. Může být škodlivý při kontaktu s kůží nebo při vdechnutí. Způsobuje vážné poškození očí. Škodlivý pro život ve vodním prostředí s dlouhodobými nepříznivými účinky. Při kontaktu s kyselinami uvolňuje velmi toxický plyn. Zabraňte uvolnění do prostředí. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Opatrně oplachujte vodou po dobu několika minut. Pokud zasažená osoba používá kontaktní čočky, vyjměte je (pokud je to možné). Pokračujte v oplachování. POKUD dojde k zasažení nebo důvodné obavě, že došlo k zasažení: Ihned kontaktujte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře. Obsah/nádobu likvidujte ve schváleném zařízení na likvidaci odpadu.

Buffer BR3



Obsahuje: ethanol, guanidin isothiokyanát. Nebezpečí! Hořlavá kapalina a výpary. Způsobuje vážné poškození očí. Při kontaktu s kyselinami uvolňuje velmi toxický plyn. Chraňte před teplem / jiskrami / otevřeným plamenem / horkými povrchy. Zákaz kouření. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Opatrně

oplachujte vodou po dobu několika minut. Pokud zasažená osoba používá kontaktní čočky, vyjměte je (pokud je to možné). Pokračujte v oplachování. Ihned kontaktujte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře.

DNase I



Obsahuje: DNázu. Nebezpečí! Může vyvolat alergickou kožní reakci. Při vdechnutí může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu, případně dechové obtíže. Vyhněte se vdechování prachu. Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít. Používejte ochranný respirátor. POKUD dojde k zasažení nebo důvodné obavě, že došlo k zasažení: Kontaktujte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře. Přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání. Kontaminovaný oděv před opětovným použitím vyperte.

Skladování reagensií a manipulace s nimi

Kolonky PAXgene k odstředění RNA (PRC), kolonky PAXgene Shredder k rozmělnění a odstředění vzorku (PSC), proteináza K (PK) a pufrы (BR1, BR2, BR3, BR4 a BR5) mají být skladovány v suchu při teplotě uvedené na štítku sady.

Sada RNase-Free DNase Set, která obsahuje DNázu I (RNFD), pufr k digesci DNA (RDD) a pufr k resuspenzi DNázy (DRB), je přepravována při teplotě okolního prostředí. Všechny komponenty sady RNase-Free DNase Set ihned po dodání uskladněte při teplotě uvedené na štítku. Při správném uchování je sada stabilní až do konce doby použitelnosti uvedeného na krabici sady.

Je třeba věnovat odpovídající pozornost datům použitelnosti a podmínkám skladování vytištěným na obalu a štítcích všech komponent. Nepoužívejte součásti s prošlým datem expirace ani nesprávně skladované součásti.

Stabilita při používání

Po prvním použití sady jsou reagenty stabilní v původních lahvičkách při teplotách a do data expirace uvedených na štítku sady.

Reagenty naplněné do lahviček na reagenty QIAcube Connect MDx jsou stabilní po dobu 3 měsíců skladování při pokojové teplotě (15–25 °C).

Rekonstituovaná DNáza I (RNFD) je stabilní při teplotě 2–8 °C po dobu 6 týdnů v originální skleněné lahvičce (zásobní roztok).

Jednorázové alikvoty zásobního roztoku v 1,5ml mikrocentrifugační zkumavce (dodané společně se sadou) jsou stabilní po dobu 9 měsíců při skladování při teplotě –20 °C. Po rozmrazení jsou jednorázové alikvoty stabilní po dobu 6 týdnů při skladování při teplotě 2–8 °C.

Odběr a skladování vzorků a manipulace s nimi

Sada PAXgene Blood RNA Kit je určena pro použití s krví odebranou do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes. Krev je nutné odebrat do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (Blood RNA Tubes, BRT) podle pokynů v příslušné příručce PAXgene Blood RNA Tube. Bude-li třeba, v příloze C (strana 79) naleznete doporučení pro manipulaci se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (Blood RNA Tubes, BRT). Se všemi vzorky se musí zacházet jako s potenciálně nebezpečným materiálem. Charakteristika funkčních vlastností systému PAXgene Blood RNA System platí pro transkripty genů FOS a IL1B, které si můžete prohlédnout na stránkách 41–44.

Protokol: Manuální izolace celkové RNA z plné lidské krve odebrané do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (Blood RNA Tubes, BRT)

Důležité body před zahájením používání

- Ujistěte se, že je sada neporušená a nepoškozená a že nedošlo k úniku pufrů. Nepoužívejte sadu, která je poškozena.
- Při užívání pipety se ujistěte, zda je správně nastaven objem a zda opatrně nasáváte a vypouštíte veškerou tekutinu.
- Abyste zabránili přenesení vzorku do špatné zkumavky či kolonky, měly by být všechny zkumavky a kolonky pečlivě označeny permanentní fixou. Označte víčko a tělo každé zkumavky (Processing Tubes, PT, MicroCentrifuge Tubes, MCT). U kolonek k odstředění nadepište také tělo příslušné zkumavky (Processing Tubes, PT). Po přidání tekutiny každou zkumavku a kolonku vždy uzavřete.
- Rozlití vzorku nebo pufru během přípravy může snížit výtěžek a čistotu RNA.
- Pokud není uvedeno jinak, měly by být všechny kroky protokolu (včetně centrifugace) provedeny při pokojové teplotě (15–25 °C).

Vzhledem k vysoké senzitivitě metod amplifikace nukleových kyselin by měla být k zamezení křížových kontaminací při manipulaci se vzorky dodržována následující preventivní opatření:

- Vzorek pipetujte do odstředivací kolonky (PSC, PRC) opatrně, abyste nepotřísnili její horní okraj.
- Před každým přenosem kapalných materiálů pipetovací špičky vždy vyměňte. Používejte pipetovací špičky s aerosolovou bariérou.
- Dbejte, abyste se pipetovací špičkou nedotkli membrány v kolonce (PSC, PRC).
- Mikrocentrifugační zkumavky po vortexování nebo ohřívání krátce centrifugujte, abyste odstranili kapky z vnitřní strany víčka.

- Během celého procesu používejte rukavice. Pokud se dotknete rukavicemi vzorku, rukavice okamžitě vyměňte.
- Kolonky (PSC, PRC) před vložením do mikrocentrifugy vždy uzavřete. Centrifugujte podle údajů v protokolu.
- Otevírejte najednou vždy jen jednu kolonku (PSC, PRC) a zabraňte tvorbě aerosolu.
- Pro efektivní paralelní zpracování více vzorků připravte stojan se zkumavkami na zpracování vzorku (Processing Tubes, PT), do kterých se po centrifugaci mohou vložit kolonky k odstředění (PAXgene Shredder spin column, PSC, PAXgene RNA spin column, PRC). Zlikvidujte použité zkumavky obsahující průtok a vložte kolonku (PAXgene Shredder spin column, PSC, PAXgene RNA spin column, PRC) do nových zkumavek před přenesením zpět do mikrocentrifugy.

Co je třeba udělat, než začnete

- Krev je nutné odebrat do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) podle pokynů v příslušné příručce *PAXgene Blood RNA Tube*. Bude-li třeba, v příloze C (strana 79) naleznete doporučení pro manipulaci se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (Blood RNA Tubes, BRT).
- Po odběru krve zkumavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkubujte minimálně 2 hodiny při pokojové teplotě, aby byla zajištěna úplná lýza krevních buněk a srážení RNA. Inkubace zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) přes noc může vést k vyšším výtěžkům. Pokud počáteční inkubace krve při pokojové teplotě po dobu 2 hodin nebyla provedena před skladováním při teplotě 2–8 °C, –20 °C nebo –70 °C, pak nejprve vytemperujte zkumavku PAXgene Blood RNA Tube (Blood RNA Tube, BRT) na pokojovou teplotu a poté ji před zahájením procedury při této teplotě inkubujte po dobu 2 hodin.
- Přečtěte si část Informace o bezpečnosti na straně 18.
- Přečtěte si pokyny pro manipulaci s RNA (příloha A, strana 76).

- Ujistěte se, že jsou přístroje, např. pipety a třepací inkubátory, pravidelně kontrolovány a kalibrovány podle doporučení výrobce.
- Třepací inkubátor je zapotřebí u kroků 5 a 20. Nastavte teplotu třepacího inkubátoru na 55 °C.
- Ve vazebném pufru (BR2) se může po delším skladování vytvořit sraženina. V takovém případě ji rozpusťte ohřátím na 37 °C.
- Promývací pufr 2 (BR4) je dodáván jako koncentrát. Před prvním použitím přidejte do lahvičky 4násobný objem ethanolu (96–100 % obj., stupeň čistoty p.a.), jak je popsáno na lahvičce, abyste vytvořili pracovní roztok.
- Před prvním použitím sady RNase-Free DNase Set připravte zásobní roztok DNázy I. Pevnou DNázu I (RNFD; 1500 jednotek Kunitz)* rozpusťte v 550 µl pufru k resuspenzi DNázy (DRB), který je dodáván se sadou. Dbejte na to, aby při otevření lahvičky žádná DNáza I (RNFD) neunikla. Rekonstituovaná DNáza I (RNFD) nesmí být vortexována. DNáza I je velmi náchylná k fyzikální denaturaci. Promíchejte pouze jemným převrácením lahvičky.
- Rekonstituovaná DNáza I (RNFD) může být skladována při teplotě 2–8 °C v původní skleněné lahvičce (zásobní roztok) nebo při teplotě –20 °C po odstranění zásobního roztoku ze skleněné lahvičky a jeho rozdělení na jednorázové alikvoty (Použijte 1,5ml mikrocentrifugační zkumavku dodávanou společně se sadou. Vystačí na 5 alikvotů.). Rozmrazené alikvoty lze skladovat při teplotě 2–8 °C. Po rozmrazení alikvoty znovu nezmrazujte.
- Při rekonstituci a alikvotaci roztoku DNázy I (RNFD) neopomeňte dodržovat pokyny pro manipulaci s RNA (příloha A, strana 76).

Postup

1. Centrifugujte zkumavku PAXgene Blood RNA Tube (Blood RNA Tube, BRT) po dobu 10 minut v otočném rotoru při otáčkách 3000–5000 × g.

* Jednotky Kunitz jsou běžně užívanými jednotkami pro měření DNázy I; jsou definované jako množství DNázy I způsobující nárůst A_{260} o 0,001 za minutu na mililitr při teplotě 25 °C a pH 5,0, přičemž je jako substrát použita vysoce polymerní DNA (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 a 363).



Ujistěte se, že byl krevní vzorek inkubován ve zkumavce PAXgene Blood RNA Tube (BRT) při pokojové teplotě (15–25 °C) minimálně 2 hodiny, aby se dosáhlo úplné lýzy krevních buněk a srážení RNA.



Rotor musí být vybaven adaptéry pro zkumavky s kulatým dnem. Při používání jiných typů adaptérů se mohou zkumavky během centrifugace poškodit.

2. Následně odstraňte supernatant dekantací nebo pipetováním. K peletu přidejte 4 ml vody bez obsahu RNázy RNase-Free Water (RNFV) a uzavřete zkumavku novým sekundárním bezpečnostním uzávěrem BD Hemogard (dodávaným se sadou).

Během dekantace supernatantu dbejte na to, aby se pelet nerozvířil, a osušte okraj zkumavky čistým papírovým ubrouskem.

3. Vortexujte, dokud není pelet viditelně rozpuštěn, a pak jej centrifugujte po dobu 10 minut v otočném rotoru při otáčkách 3000–5000 × g. Odeberte a zlikvidujte celý supernatant.

Drobné buněčné zbytky obsažené v supernatantu po vortexování, ale před centrifugací nenarušují další průběh protokolu.



Neúplné odstranění supernatantu inhibuje lýzu a ředí lyzát, a tím narušuje podmínky pro navázání RNA na membránu PAXgene.

4. Přidejte 350 µl pufru k resuspenzi (BR1) a směs vortexujte, dokud se pelet viditelně neresuspenduje.
5. Napipetujte vzorek do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky. Přidejte 300 µl vazebného pufru (BR2) a 40 µl proteinázy K (Proteinase K, PK). Promíchejte vortexem po dobu 5 s a inkubujte po dobu 10 minut při teplotě 55 °C v třepacím inkubátoru při otáčkách 400–1400 ot./min. Po inkubaci nastavte teplotu třepacího inkubátoru na 65 °C (pro krok 20).



Vazebný pufr (BR2) a proteinázu K (Proteinase K, PK) nemíchejte před přidáním do vzorku dohromady.

6. Lyzát pipetujte přímo do PSC (fialová), která je vložena do 2ml zkumavky na zpracování vzorku, a centrifugujte 3 minuty při maximálních otáčkách (max. 20 000 × g).



Lyzát opatrně přeneste pipetou do odstředovací kolonky (PSC) a pohledem se přesvědčte, že jste do kolonky (PSC) přenesli skutečně celý obsah lyzátu.

Abyste předešli poškození kolonek (PSC) a zkumavek (PT), nepřekračujte otáčky 20 000 × g.



Některé vzorky mohou projít PSC bez centrifugace. Tento jev je způsoben nízkou viskozitou některých vzorků a neměl by být považován za chybu produktu.

7. Opatrně přeneste celý supernatant průtočné frakce do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky bez narušení peletu ve zkumavce na zpracování vzorku.
8. Přidejte 350 µl ethanolu (96–100 % obj., stupeň čistoty p. a.). Promíchejte vortexem a krátce centrifugujte (1–2 s při otáčkách 500–1000 × g), abyste odstranili kapky z vnitřní strany víčka zkumavky.



Délka centrifugace nesmí překročit 1–2 s, protože by jinak mohlo dojít k peletizaci nukleových kyselin a tím k redukci výtěžku celkové RNA.

9. 700 µl vzorku přeneste pipetou do kolonky PRC (červená), která je vložena do 2ml zkumavky na zpracování vzorku, a centrifugujte 1 minutu při otáčkách 8000–20 000 × g. Umístěte odstředovací kolonku (PRC) do nové 2ml zkumavky na zpracování vzorku a použitou zkumavku na zpracování vzorku s průtočnou frakcí zlikvidujte.
10. Zbývající vzorek přeneste pipetou do kolonky PRC a centrifugujte 1 minutu při otáčkách 8000–20 000 × g. Umístěte odstředovací kolonku (PRC) do nové 2ml zkumavky na zpracování vzorku a použitou zkumavku na zpracování vzorku s průtočnou frakcí zlikvidujte.



Vzorek opatrně přeneste pipetou do odstředovací kolonky (PRC) a pohledem se přesvědčte, že jste do kolonky (PRC) přenesli skutečně celý obsah vzorku.

11. Přeneste pipetou 350 μ l promývacího pufru 1 (BR3) do kolonky PRC. Centrifugujte 1 minutu při otáčkách 8 000–20 000 \times g. Umístěte odstředovací kolonku (PRC) do nové 2ml zkumavky na zpracování vzorku a použitou zkumavku na zpracování vzorku s průtočnou frakcí zlikvidujte.
12. Přidejte 10 μ l zásobního roztoku DNázy I (RNase-Free DNase, RNFD) k 70 μ l pufru k digesci DNA (RDD) v 1,5ml mikrocentrifugační zkumavce. Promíchejte jemným poklepáváním do zkumavky a krátce centrifugujte, abyste skleпали zbylou tekutinu z vnitřních stěn zkumavky.

Pro zpracování například 10 vzorků přidejte 100 μ l zásobního koncentrovaného roztoku DNázy I (RNFD) k 700 μ l pufru k digesci DNA (RDD). Používejte 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky dodávané se sadou.



DNáza I je velmi náchylná k fyzikální denaturaci. Roztok promíchejte lehkým poklepáváním do zkumavky. Nevortexujte.

13. Inkubační směs DNázy I (RNase-Free DNase, RNFD) (80 μ l) pipetujte přímo na membránu kolonky PRC a ponechte na pracovní ploše 15 minut (při teplotě 20–30 °C).



Ujistěte se, že byla inkubační směs DNázy I (RNase-Free DNase, RNFD) umístěna přímo na membránu. Digesce pomocí DNázy by mohla proběhnout neúplně, pokud by část směsi zůstala na vnitřní stěně nebo na O-kroužku kolonky (PRC).

14. Přeneste pipetou 350 μ l promývacího pufru 1 (BR3) do odstředovací kolonky a centrifugujte 1 minutu při otáčkách 8000–20 000 \times g. Umístěte odstředovací kolonku (PRC) do nové 2ml zkumavky na zpracování vzorku a použitou zkumavku na zpracování vzorku s průtočnou frakcí zlikvidujte.

15. Přeneste pipetou 500 µl promývacího pufru 2 (BR4) do odstředovací kolonky a centrifugujte 1 minutu při otáčkách 8000–20 000 × g. Umístěte odstředovací kolonku (PRC) do nové 2ml zkumavky na zpracování vzorku a použitou zkumavku na zpracování vzorku s průtočnou frakcí zlikvidujte.



Promývací pufr 2 (BR4) je dodáván jako koncentrát. Ujistěte se, že byl před použitím k promývacímu pufru 2 (BR4) přidán ethanol (viz „Co je třeba udělat, než začnete“, strana 25).

16. Přidejte dalších 500 µl promývacího pufru 2 (BR4) do kolonky PRC. Centrifugujte 3 minuty při otáčkách 8000–20 000 × g.

17. Zlikvidujte zkumavku na zpracování vzorku s průtočnou frakcí a kolonku PRC vložte do nové 2ml zkumavky na zpracování vzorku. Centrifugujte 1 minutu při otáčkách 8000–20 000 × g.

18. Zkumavku na zpracování vzorku s průtokem zlikvidujte. Kolonku PRC vložte do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky a 40 µl elučního pufru (BR5) přeneste pipetou přímo na membránu v kolonce PRC. Centrifugujte 1 minutu při otáčkách 8000–20 000 × g za účelem eluce RNA.

Abyste docílili maximální efektivity eluce, je důležité pokrýt celou plochu membrány elučním pufrům (BR5).

19. Zopakujte eluční krok (krok 18), jak je popsáno, se 40 µl elučního pufru (BR5) a se stejnou mikrocentrifugační zkumavkou.

20. Eluát inkubujte 5 minut při 65 °C v třepacím inkubátoru (od kroku 5), ale bez třepání. Vzorky poté ihned zchladte na ledu.



Touto inkubací vzorků při 65 °C se RNA denaturuje pro následující aplikace. Tento krok nevynechávejte ani v případě, že následující aplikace také obsahují tepelnou denaturaci. Dostatečná denaturace RNA je v této chvíli nezbytná pro maximální efektivitu následných aplikací.

Nepřekročte přitom dobu ani teplotu inkubace.

21. Pokud vzorky RNA nebudou ihned použity, skladujte je při -20°C nebo -70°C .

Jelikož RNA zůstává denaturovaná i po opakovaném zmrazení a rozmrazení, není nutné inkubaci při 65°C opakovat. Pokud chcete vzorky RNA použít pro diagnostické analýzy, dbejte pokynů výrobce.

Pro co nejpřesnější kvantifikaci RNA měřením absorbance při 260 nm doporučujeme zředit vzorek 10 mM Tris-HCl (pH 7,5). * Naředění vzorku vodou bez obsahu RNázy RNase-Free Water by mohlo vést k nepřesným nízkým hodnotám.

Pro vynulování spektrálního fotometru použijte slepý vzorek (blank), jehož poměr elučního pufru (BR5) a ředícího pufru Tris-HCl odpovídá měřeným vzorkům. Eluční pufr (BR5) má při 220 nm vysokou absorbanci, což může vést k vysokým hodnotám absorbance pozadí, pokud nebyl nulový bod spektrálního fotometru nastaven správně.



Pro kvantifikaci v pufru Tris HCl použijte vztah $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Viz Příloha B, strana 77.

22. Znovu uzavřete všechny lahve obsahující pufr a vodu bez RNázy, menší lahvičky a zkumavky obsahující enzymy a enzymatické pufr a sáčky obsahující plastové materiály ze sady použité pro protokol. Zbývající obsah sady skladujte do dalšího použití podle popisu v části „Skladování reagentů a manipulace s nimi“ (strana 22) a „Stabilita při používání“ (strana 22).

* Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (BL), které obdržíte od dodavatele výrobku.

Protokol: Automatizovaná izolace celkové RNA z plné lidské krve odebrané do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Důležité body před zahájením používání

- Ujistěte se, že je sada neporušená a nepoškozená a že nedošlo k úniku pufrů. Nepoužívejte sadu, která je poškozena.
- Při užívání pipety se ujistěte, zda je správně nastaven objem a zda opatrně nasáváte a vypouštíte veškerou tekutinu.
- Abyste zabránili přenesení vzorků do nesprávné zkumavky či plastového spotřebního materiálu, ujistěte se, že jsou všechny zkumavky na zpracování vzorku, mikrocentrifugační zkumavky a adaptéry do rotoru správně označeny permanentní fixou. Označte víčko a tělo všech mikrocentrifugačních zkumavek, tělo všech zkumavek na zpracování vzorku a vnější stranu všech adaptérů do rotoru.
- Rozlítí vzorku nebo pufru během přípravy může snížit výtěžek a čistotu RNA.
- Pokud není uvedeno jinak, měly by být všechny kroky protokolu (včetně centrifugace) provedeny při pokojové teplotě (15–25 °C).

Vzhledem k vysoké senzitivitě metod amplifikace nukleových kyselin by měla být k zamezení křížových kontaminací při manipulaci se vzorky dodržována následující preventivní opatření:

- Vzorek opatrně přeneste pipetou na dno zkumavky na zpracování vzorku tak, abyste nepotřísnili její horní okraj.
- Před každým přenosem kapalných materiálů pipetovací špičky vždy vyměňte. Používejte pipetovací špičky s aerosolovou bariérou.
- Dbejte, abyste se pipetovací špičkou nedotkli membrány v kolonce (PSC, PRC).

- Mikrocentrifugační zkumavky po vortexování nebo ohřívání krátce centrifugujte, abyste odstranili kapky z vnitřní strany víčka.
- Během celého procesu používejte rukavice. Pokud se dotknete rukavicemi vzorku, rukavice okamžitě vyměňte.

Co je třeba udělat, než začnete

- Krev je nutné odebrat do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) podle pokynů v příslušné příručce *PAXgene Blood RNA Tube*. Bude-li třeba, v příloze C (strana 79) naleznete doporučení pro manipulaci se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (Blood RNA Tubes, BRT).
- Po odběru krve zkumavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkubujte minimálně 2 hodiny při pokojové teplotě, aby byla zajištěna úplná lýza krevních buněk a srážení RNA. Inkubace zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) přes noc může vést k vyšším výtěžkům. Byla-li zkumavka PAXgene Blood RNA Tube (Blood RNA Tube, BRT) po odběru krve skladována při teplotě 2–8 °C, –20 °C nebo –70 °C, před začátkem protokolu ji nejdříve vytemperujte na pokojovou teplotu a potom ji nechte při pokojové teplotě 2 hodiny inkubovat.
- Přečtěte si část Informace o bezpečnosti na straně 18.
- Viz „Důležité poznámky“, strana 57.
- Přečtěte si pokyny pro manipulaci s RNA (příloha A, strana 76).
- Přečtěte si uživatelskou příručku k příslušnému přístroji QIAcube Connect MDx a veškeré další informace, které jsou s přístrojem dodávány. Zvláštní pozornost věnujte především části Informace o bezpečnosti.
- Ujistěte se, že jsou zařízení a přístroje, např. pipety a přístroj QIAcube Connect MDx, pravidelně kontrolovány a kalibrovány podle doporučení výrobce.
- Ve vazebném pufru (BR2) se může po delším skladování vytvořit sraženina. V takovém případě ji rozpusťte ohřátím na 37 °C.

- Promývací pufr 2 (BR4) je dodáván jako koncentrát. Před prvním použitím přidejte příslušný objem ethanolu (96–100 % obj., stupeň čistoty p.a.), jak je popsáno na lahvi, abyste vytvořili pracovní roztok.
- Před prvním použitím sady RNase-Free DNase Set připravte zásobní roztok DNázy I. Pevnou DNázu I (RNFD; 1500 jednotek Kunitz)* rozpusťte v 550 µl pufru k resuspenzi DNázy (DRB), který je dodáván se sadou. Dbejte na to, aby při otevření lahvičky žádná DNáza I (RNFD) neunikla. Rekonstituovaná DNáza I (RNFD) nesmí být vortexována. DNáza I je velmi náchylná k fyzikální denaturaci. Promíchejte pouze jemným převrácením lahvičky.
- Rekonstituovaná DNáza I (RNFD) může být skladována při teplotě 2–8 °C v původní skleněné lahvičce (zásobní roztok) nebo při teplotě –20 °C po odstranění zásobního roztoku ze skleněné lahvičky a jeho rozdělení na jednorázové alikvoty (Použijte 1,5ml mikrocentrifugační zkumavku dodávanou společně se sadou. Vystačí na 5 alikvotů.). Rozmrazené alikvoty lze skladovat při teplotě 2–8 °C. Po rozmrazení alikvoty znovu nezmrazujte.
- Při rekonstituci a alikvotaci roztoku DNázy I (RNFD) neopomeňte dodržovat pokyny pro manipulaci s RNA (příloha A, strana 76).
- Vložte správný adaptér třepačky (dodávaný spolu s přístrojem QIAcube Connect MDx. Používejte adaptéry pro 2ml zkumavky s bezpečnostním uzávěrem, označené číslem „2“) a umístěte stojan třepačky na horní část adaptéru.
- Zkontrolujte zásuvku na odpad a v případě potřeby ji vyprázdněte.
- Nainstalujte související protokoly, pokud již nejsou nainstalovány z předešlých běhů. V přístroji QIAcube Connect MDx musí být stažené všechny protokoly, které se nacházejí v souvisejícím souboru zip. Viz „Instalace protokolů na přístroji QIAcube Connect MDx“, strana 59.

* Jednotky Kunitz jsou běžně užívanými jednotkami pro měření DNázy I; jsou definované jako množství DNázy I způsobující nárůst A_{260} o 0,001 za minutu na mililitr při teplotě 25 °C a pH 5,0, přičemž je jako substrát použita vysoce polymerní DNA (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 a 363).

Postup

1. Zavřete kryt přístroje QIAcube Connect MDx a pomocí vypínače přístroj zapněte (viz obrázek 15, strana 58).

Ozve se pípnutí a zobrazí se úvodní obrazovka. Přístroj automaticky provede zahajovací testy.

2. Otevřete kryt přístroje QIAcube Connect MDx a vložte do něj potřebné reagensie a umělohmotné vybavení. Viz „Naplnění přístroje QIAcube Connect MDx“, strana 60.

Abyste ušetřili čas, můžete přístroj naplnit během jednoho nebo obou následujících centrifugačních kroků o délce 10 minut (krok 3 a 5).

3. Centrifugujte zkumavku PAXgene Blood RNA Tube (Blood RNA Tube, BRT) po dobu 10 minut v otočném rotoru při otáčkách 3000–5000 × g.









Ujistěte se, že byl krevní vzorek inkubován ve zkumavce PAXgene Blood RNA Tube (BRT) při pokojové teplotě (15–25 °C) minimálně 2 hodiny, aby se dosáhlo úplné lýzy krevních buněk a srážení RNA.



Rotor musí být vybaven adaptéry pro zkumavky s kulatým dnem. Při používání jiných typů adaptérů se mohou zkumavky během centrifugace poškodit.

4. Následně odstraňte supernatant dekantací nebo pipetováním. Během dekantace supernatantu dbejte na to, aby se pelet nerozvířil, a osušte okraj zkumavky čistým papírovým ubrouskem. K peletu přidejte 4 ml vody bez obsahu RNázy RNase-Free Water (RNFV) a uzavřete zkumavku novým sekundárním bezpečnostním uzávěrem BD Hemogard (dodávaným se sadou).
5. Vortexujte, dokud není pelet viditelně rozpuštěn, a pak jej centrifugujte po dobu 10 minut v otočném rotoru při otáčkách 3000–5000 × g. Odeberte a zlikvidujte celý supernatant.

Drobné buněčné zbytky obsažené v supernatantu po vortexování, ale před centrifugací nenarušují další průběh protokolu.

-  Neúplné odstranění supernatantu inhibuje lýzu a ředí lyzát, a tím narušuje podmínky pro navázání RNA na membránu PAXgene.
6. Přidejte 350 µl pufru k resuspenzi (BR1) a směs vortexujte, dokud se pelet viditelně neresuspenduje.
7. Napipetujte vzorek do 2ml zkumavky na zpracování vzorku.
-  Použijte 2ml zkumavky na zpracování vzorku dodávané se sadou PAXgene Blood RNA Kit.
8. Vložte otevřené mikrocentrifugační zkumavky obsahující vzorek do třepačky QIAcube Connect MDx (viz obrázek 18, strana 62). Pozice vzorků jsou pro snadnější vkládání do třepačky očíslované. Zasuňte zátky stojanu (dodávané s přístrojem QIAcube Connect MDx) do drážek na okraji stojanu třepačky vedle každé zkumavky na zpracování vzorku. To umožní detekci vzorků během kontroly naplnění.
-  Ujistěte se, že byl vložen správný adaptér třepačky (Shaker Adapter, 2ml zkumavky s bezpečnostním uzávěrem, označené „2“, dodávané s přístrojem QIAcube Connect MDx).
-  Pokud zpracováváte méně než 12 vzorků, ujistěte se, že byl stojan třepačky naplněn, jak je zobrazeno na obrázku 22, strana 66. Jeden (1) nebo 11 vzorků nelze zpracovat. Čísla pozic ve stojanu třepačky odpovídají číslům pozic v centrifuze.
9. Zavřete kryt přístroje QIAcube Connect MDx (viz obrázek 15, strana 58).
10. Zvolte a spusťte protokol „PAXgene Blood RNA Part A“.
- Postupujte podle pokynů uvedených na dotykové obrazovce přístroje QIAcube Connect MDx.
-  Ujistěte se, že jsou na přístroji QIAcube Connect MDx nainstalovány obě části programu (část A a B) (viz „Instalace protokolů na přístroji QIAcube Connect MDx“, strana 59).
-  Přístroj provede kontrolu naplnění u vzorků, špiček, adaptérů do rotoru a reagenčních lahvíček.

11. Po ukončení protokolu „PAXgene Blood RNA Part A“ otevřete kryt přístroje QIAcube Connect MDx (viz obrázek 15, strana 58). Vyjměte a zlikvidujte odstředivací kolonky z adaptérů do rotoru a prázdné zkumavky na zpracování vzorku z třepačky.



Během svého běhu přístroj převede kolonky z pozice 1 adaptéru do rotoru (pozice víčka L1) do pozice 3 adaptéru do rotoru (pozice víčka L2) (viz obrázek 20, strana 64).

12. Uzavřete víčka všech 1,5ml mikrocentrifugačních zkumavek obsahujících purifikovanou RNA v adaptérech do rotoru (pozice 3, pozice víčka L3, viz obrázek 20, strana 64). Převedte 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky do adaptéru třepačky přístroje QIAcube Connect MDx (viz obrázek 18, strana 62).
13. Zavřete kryt přístroje QIAcube Connect MDx (viz obrázek 15, strana 58).
14. Zvolte a spusťte protokol „PAXgene Blood RNA Part B“.

Postupujte podle pokynů uvedených na dotykové obrazovce přístroje QIAcube Connect MDx.



Tento program inkubuje vzorky při 65 °C a denaturuje RNA pro následující aplikace. Tento krok nevynechávejte ani v případě, že následující aplikace také obsahují tepelnou denaturaci. Dostatečná denaturace RNA je v této chvíli nezbytná pro maximální efektivitu následných aplikací.

15. Po ukončení programu „PAXgene Blood RNA Part B“ otevřete kryt přístroje QIAcube Connect MDx (viz obrázek 15, strana 58). Mikrocentrifugační zkumavky obsahující purifikovanou RNA ihned uložte na led.



VAROVÁNÍ: Horký povrch. Třepačka může dosáhnout teploty až 70 °C. Nedotýkejte se jí, dokud je horká.



Nenechávejte purifikovanou RNA v přístroji QIAcube Connect MDx. Jelikož nejsou vzorky chlazeny, může purifikovaná RNA degradovat. Nedoporučují se tedy běhy přípravy vzorku přes noc a bez dozoru.

16. Pokud vzorky RNA nebudou ihned použity, skladujte je při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Jelikož RNA zůstává denaturovaná i po opakovaném zmrazení a rozmrazení, není nutné tepelnou inkubaci (protokol „PAXgene Blood RNA Part B“) opakovat. Pokud chcete vzorky RNA použít pro diagnostické analýzy, dbejte pokynů výrobce.

Pro co nejpřesnější kvantifikaci RNA měřením absorbance při 260 nm doporučujeme zředit vzorek v 10 mM Tris-HCl (pH 7,5). * Naředění vzorku vodou bez obsahu RNázy RNase-Free Water by mohlo vést k nepřesným nízkým hodnotám.

Pro vynulování spektrálního fotometru použijte slepý vzorek (blank), jehož poměr elučního pufru (BR5) a ředícího pufru Tris-HCl odpovídá měřeným vzorkům. Eluční pufr (BR5) má při 220 nm vysokou absorbanci, což může vést k vysokým hodnotám absorbance pozadí, pokud nebyl nulový bod spektrálního fotometru nastaven správně.



Pro kvantifikaci v pufru Tris-HCl, použijte vztah

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44\text{ }\mu\text{g/ml}$. Viz Příloha B, strana 77.

17. Odeberte stojan na reagenční lahvičky z pracovní desky přístroje QIAcube Connect MDx (viz obrázek 18, strana 62) a všechny lahvičky uzavřete správně označenými víčky. Znovu uzavřete všechny lahve obsahující pufrы a vodu bez RNázy, menší lahvičky a zkumavky obsahující enzymy a enzymatické pufrы a sáčky obsahující plastové materiály ze sady použité pro protokol. Uložte zbývající obsah sady a reagenčních lahviček do dalšího použití podle popisu v části „Skladování reagentů a manipulace s nimi“ (strana 22) a „Stabilita při používání“ (strana 22).

Vyjměte a zlikvidujte zbývající reagentie ve zkumavkách na zpracování vzorku umístěné v drážkách pro mikrocentrifugační zkumavky přístroje QIAcube Connect MDx. Vyjměte adaptéry do rotoru z centrifugy a zlikvidujte je.

Vyprázdněte odpadní zásuvku přístroje QIAcube Connect MDx (viz obrázek 15, strana 58). Zavřete kryt přístroje a pomocí síťového vypínače přístroj vypněte.

* Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (BL), které obdržíte od dodavatele výrobku.

Omezení použití produktu

Sada PAXgene Blood RNA Kit je koncipována jako prostředek k izolaci intracelulární RNA z plné lidské krve ($4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$ leukocytů/ml) pro diagnostické použití in vitro. Není určena k izolaci genomové DNA nebo virových nukleových kyselin z plné lidské krve. Vzhledem k tomu, že byl pro stabilizační podmínky validován jen omezený počet transkriptů (transkripty genů FOS a IL1B), charakteristika funkčních vlastností nebyla stanovena pro všechny transkripty. Uživatelé sady by měli zhodnotit vlastní data a údaje výrobce, aby určili, zda je validace nezbytná i pro jiné transkripty. Komponenty sady jsou určeny pouze k použití v manuálním a automatizovaném protokolu popsáném v tomto návodu k použití.

Pokyny k použití zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) naleznete v příručce ke zkumavce PAXgene Blood RNA Tube.

Kontrola kvality

V souladu se systémem managementu jakosti společnosti QIAGEN certifikovaným podle norem ISO byla každá šarže sady PAXgene Blood RNA Kit testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zaručena jednotná kvalita produktu.

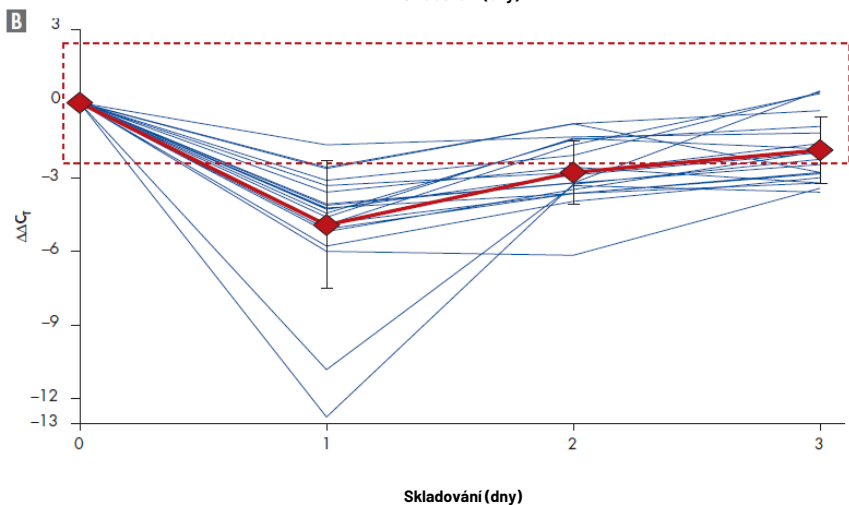
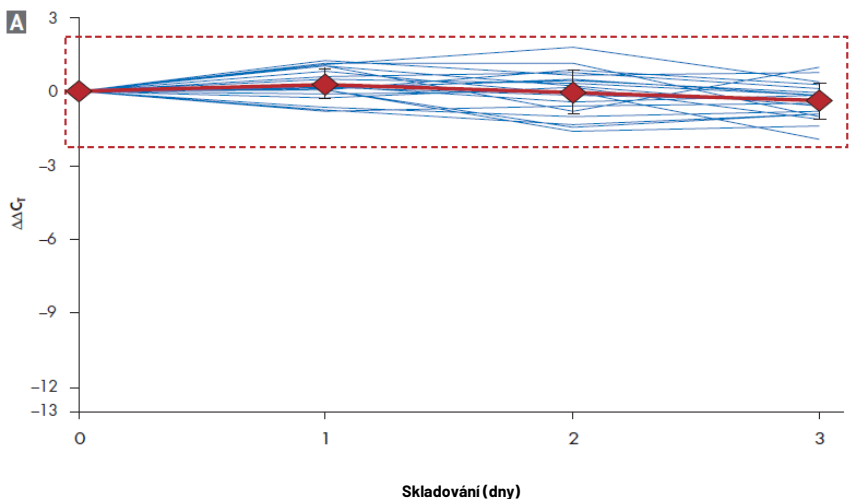
Charakteristika funkčních vlastností

Odběr a stabilizace vzorku

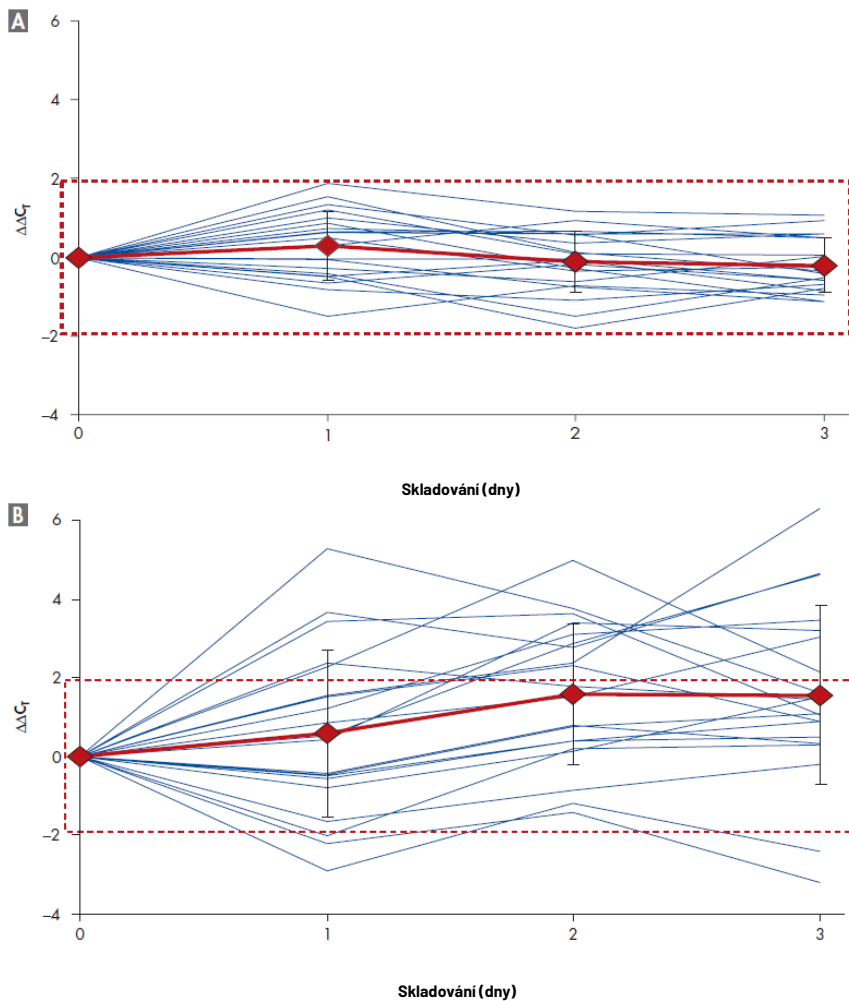
Zkumavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) obsahují patentovanou reagensii pro stabilizaci RNA. Toto aditivum chrání molekuly RNA před degradací RNázami a minimalizuje změny genové exprese ex vivo. Zkumavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) jsou určeny pro odběr plné lidské krve a stabilizaci celulórní RNA až po 3 dny při teplotě 18–25 °C (obrázek 4 a obrázek 5, strany 41 a 42) nebo až po 5 dnů při teplotě 2–8 °C (obrázek 6 a obrázek 7, strana 43 a 44). Stabilizovaná krev může být navíc skladována ve zmrazeném stavu. Aktuálně dostupné údaje prokazují stabilitu celulórní RNA minimálně po dobu 11 let při teplotě –20 °C, případně –70 °C*. Další informace o právě probíhajících studiích, které posuzují stabilitu po ještě delší dobu, jsou uvedeny na webových stránkách www.preanalytix.com nebo kontaktujte technické služby společnosti QIAGEN.

Skutečná doba stabilizace RNA se může měnit podle druhu celulórní RNA a použité následné aplikace. Vzhledem k tomu, že byl pro stabilizační podmínky validován jen omezený počet transkriptů (transkripty genů FOS a IL1B), charakteristika funkčních vlastností nebyla stanovena pro všechny transkripty. Uživatelé sady by měli zhodnotit vlastní data a údaje výrobce, aby určili, zda je validace nezbytná i pro jiné transkripty.

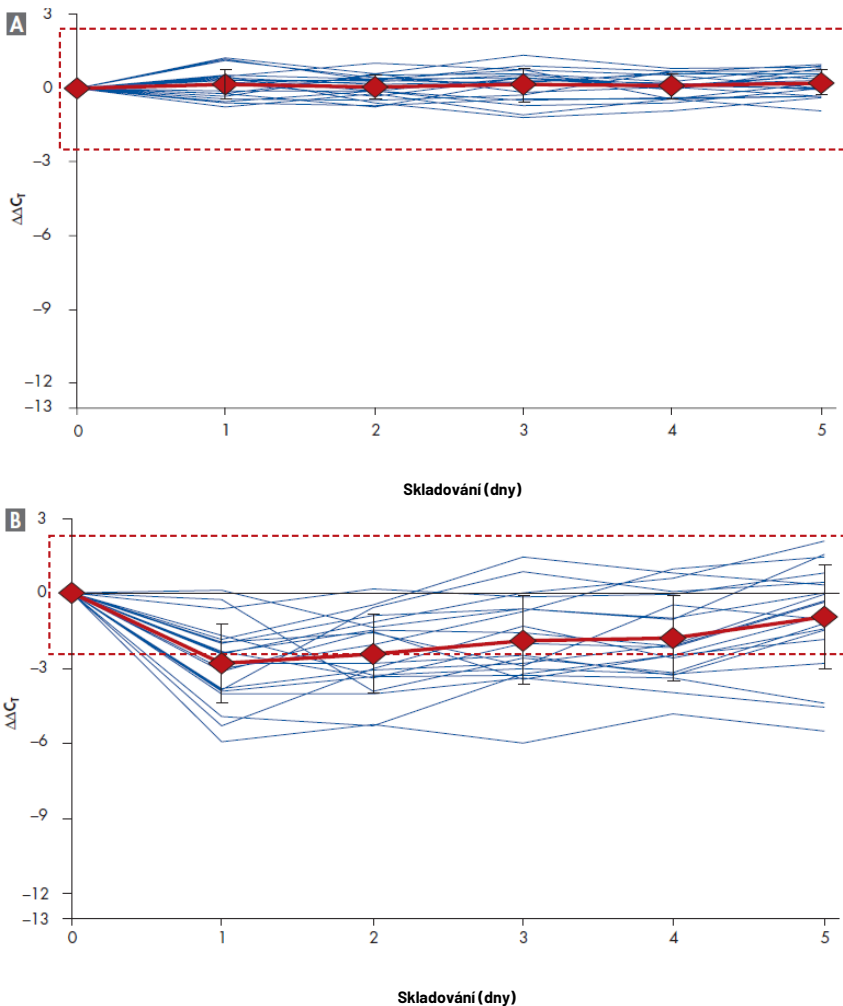
* Právě probíhá dlouhodobá studie uchovávání krve ve zkumavkách PAXgene Blood RNA Tubes.



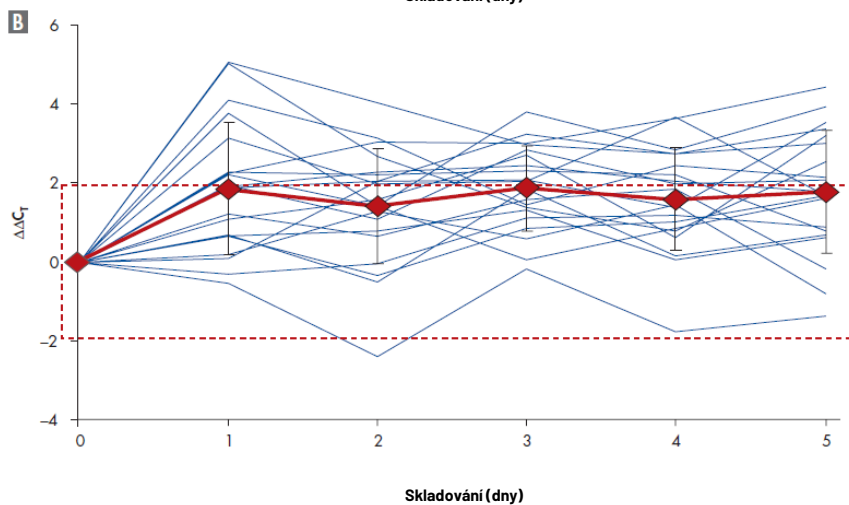
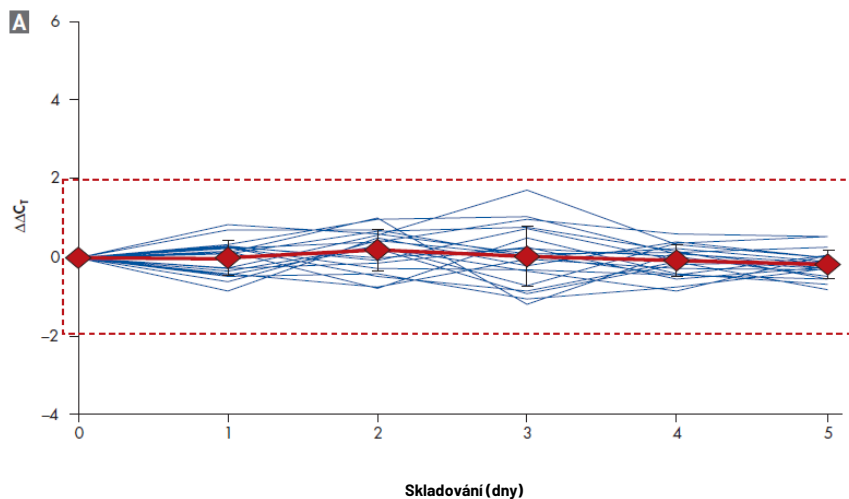
Obrázek 4: Stabilita RNA v krevních vzorcích při teplotě 18–25 °C: FOS. Krev byla odebrána 10 zjevně zdravým dárcům, s duplicitními vzorky a skladována při 18–25 °C po uvedený počet dní, po čemž následovala izolace celkové RNA. **[A]** Odběr a skladování krve ve zkumavkách PAXgene Blood RNA Tubes (Blood RNA Tube, BRT) a purifikace celkové RNA pomocí sady PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Odběr a skladování krve ve standardních odběrových zkumavkách, s EDTA jako antikoagulantem, purifikace celkové RNA standardní metodou organické izolace a čištění RNA pomocí silikátové membrány. Relativní koncentrace transkriptů FOS byly určeny pomocí duplexní RT-PCR v reálném čase za použití 18S-rRNA jako interního standardu. Zaneseny jsou hodnoty všech analyzovaných vzorků s průměrem a směrodatnou odchylkou. Čárkované linie znázorňují oblast přesnosti analýzy (± 3 násobná celková přesnost 2,34 °C_T).



Obrázek 5: Stabilita RNA v krevních vzorcích při teplotě 18–25 °C: IL1B. Odběr krevních vzorků a purifikace celkové RNA po uskladnění při 18–25 °C proběhly tak, jak je popsáno na obrázku 4. Relativní koncentrace transkriptů IL1B byly určeny pomocí duplexní RT-PCR v reálném čase za použití 18S-rRNA jako interního standardu. Zaneseny jsou hodnoty všech analyzovaných vzorků s průměrem a směrodatnou odchylkou. Čárkované linie znázorňují oblast přesnosti analýzy (± 3 násobná celková přesnost 1,93 °C_T).



Obrazek 6: Stabilita RNA v krevních vzorcích při teplotě 2–8 °C: FOS. Krev byla odebrána 10 dárcům, s duplicitními vzorky a skladována při teplotě 2–8 °C po uvedený počet dní, po čemž následovala izolace celkové RNA. **[A]** Odběr a skladování krve ve zkumavkách PAXgene Blood RNA Tubes (Blood RNA Tube, BRT) a purifikace celkové RNA pomocí sady PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Odběr a skladování krve ve standardních odběrových zkumavkách, s EDTA jako antikoagulantem, purifikace celkové RNA standardní metodou organické izolace a čištění RNA pomocí silikátové membrány. Relativní koncentrace transkriptů FOS byly určeny pomocí duplexní RT-PCR v reálném čase za použití 18S-rRNA jako interního standardu. Zaneseny jsou hodnoty všech analyzovaných vzorků s průměrem a směrodatnou odchylkou. Čárkované linie znázorňují oblast přesnosti analýzy (± 3 násobná celková přesnost $2,34 \text{ } ^\circ C_t$).



Obrázek 7: Stabilita RNA v krevních vzorcích při teplotě 2–8 °C: IL1B. Odběr krevních vzorků a purifikace celkové RNA po uskladnění při 2–8 °C proběhly tak, jak je popsáno na obrázku 6. Relativní koncentrace transkriptů IL1B byly určeny pomocí duplexní RT-PCR v reálném čase za použití 18S-rRNA jako interního standardu. Zaneseny jsou hodnoty všech analyzovaných vzorků s průměrem a směrodatnou odchylkou. Čárkované linie znázorňují oblast přesnosti analýzy (± 3 násobná celková přesnost 1,93 °C_T).

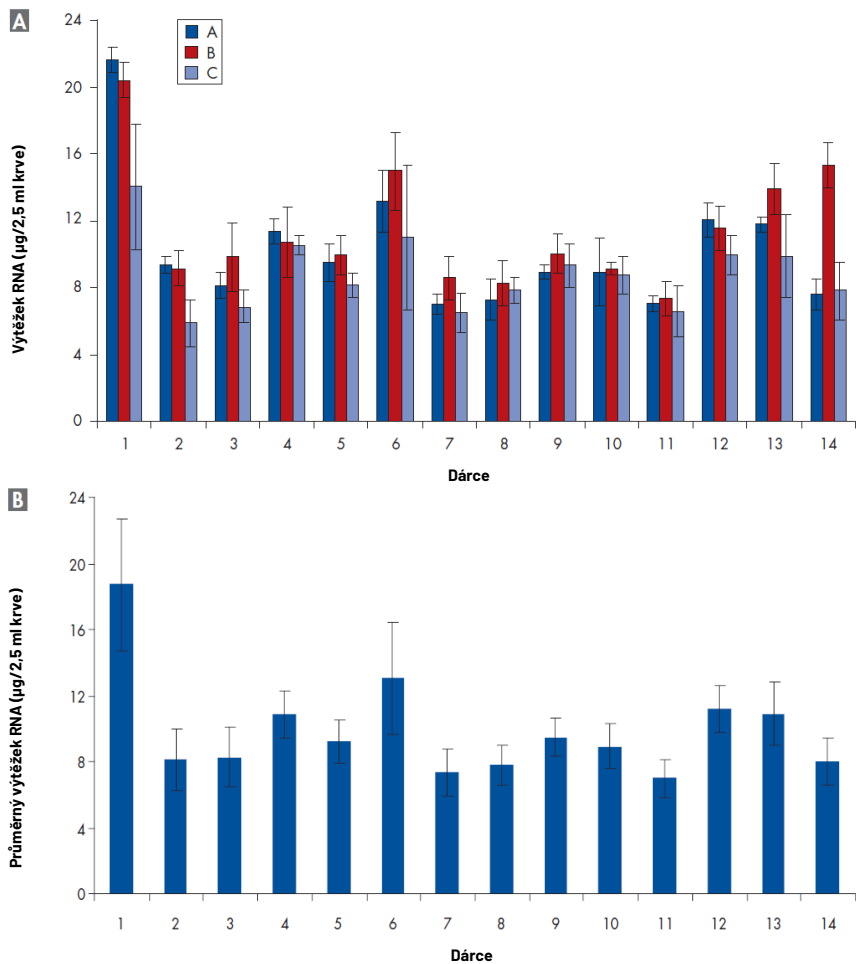
Manuální izolace RNA

Celková RNA izolovaná pomocí systému PAXgene Blood RNA System je čistá. Při použití manuálního protokolu leží hodnoty A_{260}/A_{280} mezi 1,8 a 2,2; podíl genomové DNA tvoří u $\geq 95\%$ všech vzorků $\leq 1,0\%$ (w/w), jak bylo změřeno pomocí kvantitativní real-time PCR u jedné sekvence genu beta aktinu. Přinejmenším 95 % vzorků nevykazovalo žádnou inhibici v RT-PCR v reálném čase, když eluát tvořil až 30 % reakčního objemu RT-PCR.

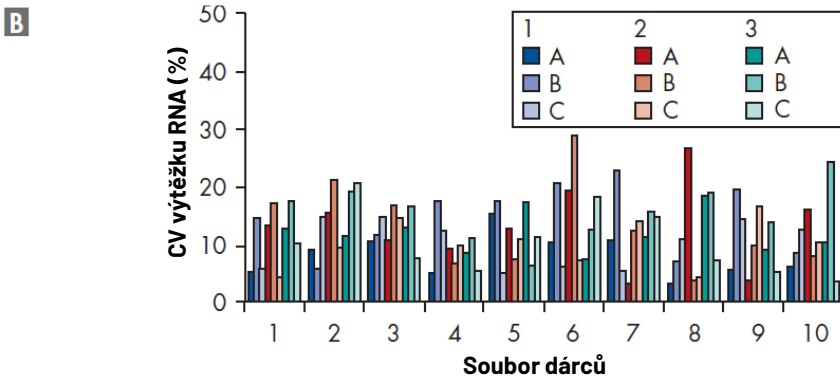
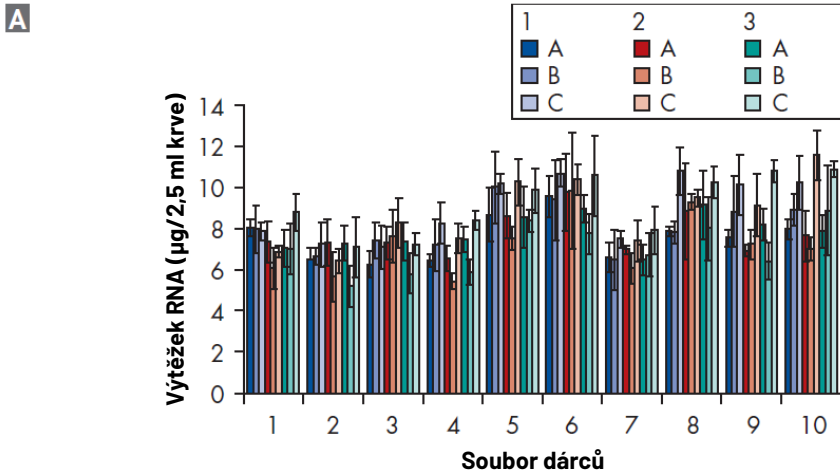
Při použití manuálního protokolu je průměrná doba přípravy vzorku (určeno na základě 12 provedených příprav vzorků) přibližně 90 minut*, přičemž doba manipulace činí pouze 40 minut. U minimálně 95 % zpracovaných vzorků byl dosažen výtěžek RNA $\geq 3 \mu\text{g}$ z 2,5 ml plné lidské krve zdravých dárců. Protože výtěžky silně závisí na dárcích, mohou se jednotlivé výtěžky lišit. Systém PAXgene Blood RNA System poskytuje při testování jednotlivých dárců vysoce reprodukovatelné a opakovatelné výtěžky (obrázek 8 a obrázek 9 strany 46 a 47), stejně jako reprodukovatelné a opakovatelné výsledky RT-PCR (obrázek 10 a obrázek 11 strana 51 a 52), takže v klinicko-diagnostických testech vykazuje vysokou robustnost.

Obrázek 8 (strana 46) zobrazuje celkovou opakovatelnost a reprodukovatelnost systému PAXgene Blood RNA System. V dalších studiích byl zkoumán jednak vliv různých šarží sady PAXgene Blood RNA Kit, jednak vliv laborantů provádějících testy na reprodukovatelnost výtěžku RNA a výsledků real-time RT-PCR. Protože byly pro tyto studie použity sdružené krevní vzorky, nikoli individuální vzorky odebrané do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), výsledky neodráží opakovatelnost systému, která zohledňuje také rozdíly při odběru krve, nýbrž pouze opakovatelnost přípravy vzorku (viz obrázek 9, strana 47).

* Celkové trvání běhu včetně přímé manipulace se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugace, promývání pelet a resuspendování pelet).



Obrazek 8: Reprodukovatelná a opakovatelná izolace RNA. Čtyřnásobná stanovení krevních vzorků 14 dárců byla manuálně provedena 3 různými laboranty (A, B, C). Byly použity tři různé soupravy laboratorních přístrojů a jiných pomocných prostředků, přičemž každý laborant používal pro zpracování vzorků vždy jednu a tu samou soupravu přístrojů. [A] Zobrazeny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky výtěžku RNA pro každý replikát vzorku stejného dárce zpracovaného různými laboranty. [B] Dvanáct replikátů krevních vzorků každého ze 14 dárců bylo zpracováno 3 různými laboranty. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky výtěžku RNA pro každý vzorek stejného dárce zpracovaný všemi laboranty. U všech vzorků RNA ležel poměr absorpance A_{260}/A_{280} v oblasti od 1,8 do 2,2.



Obrázek 9: Opakovatelnost a reprodukovatelnost výtěžku RNA u různých laborantů a různých šarží sady PAXgene Blood RNA Kit za užití sdružených krevních vzorků. Krevní vzorky 30 různých dárců byly odebrány do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (Blood RNA Tube, BRT; 12 zkumavek na dárce, celkově 360 zkumavek). Obsah všech zkumavek od 3 dárců byl sdružen a následně znovu rozpipetován na 36 vzorků. Těchto 36 vzorků na jeden soubor 3 dárců bylo manuálně zpracováno 3 různými laboranty. Každý laborant použil pro izolaci RNA 3 různé šarže sady PAXgene Blood RNA Kit a zpracoval čtyři replikáty z každého z 10 souborů dárců. [A] Výtěžek RNA a směrodatná odchylka pro každou kombinaci laborant-šarže. Čtyřikrát opakovaně zpracování krevních vzorků z 10 souborů dárců bylo provedeno 3 různými laboranty (A, B, C) pomocí každé ze tří šarží sady (1, 2, 3). Zobrazeny jsou průměrné výtěžky (sloupce) a směrodatné odchylky (chybové úsečky) na jedno čtyřnásobné stanovení ze stejného souboru dárců pro různé laboranty a šarže sady. [B] Variační koeficient výtěžku RNA na jeden soubor dárců pro všechny kombinace laborant-šarže (A, B, C; 1, 2, 3) – vypočítáno z průměrných výtěžků a směrodatných odchylek výtěžků zobrazených na obrázku 9A.

Tabulka 1A: Reprodukovatelnost v rámci každé šarže a každého uživatele pro zvolené soubory dárců (1, 6, 9, 10)

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

Tabulka 1B: Reprodukovatelnost v rámci každého uživatele a mezi všemi šaržemi pro zvolené soubory dárců (1, 6, 9, 10)

Kombinace dat	Soubor dárců 1 ($5,1 \times 10^6$ buněk/ml)			Soubor dárců 6 ($6,5 \times 10^6$ buněk/ml)		
	Průměrný výtěžek (μg)	SD (μg)	CV (%)	Průměrný výtěžek (μg)	SD (μg)	CV (%)
Uživatel A, všechny šarže	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Uživatel B, všechny šarže	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Uživatel C, všechny šarže	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Kombinace dat	Soubor dárců 9 ($8,4 \times 10^6$ buněk/ml)			Soubor dárců 10 ($10,2 \times 10^6$ buněk/ml)		
	Průměrný výtěžek (μg)	SD (μg)	CV (%)	Průměrný výtěžek (μg)	SD (μg)	CV (%)
Uživatel A, všechny šarže	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Uživatel B, všechny šarže	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Uživatel C, všechny šarže	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

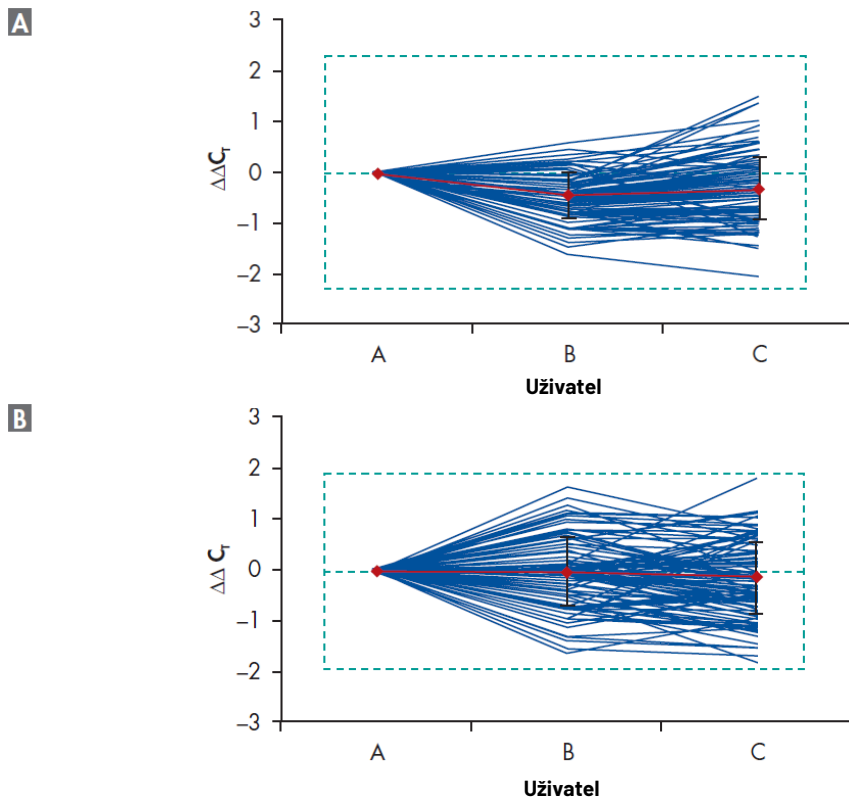
Tabulka 1C: Reprodukovatelnost v rámci každé šarže a mezi všemi uživateli pro zvolené soubory dárců (1, 6, 9, 10)

Kombinace dat	Soubor dárců 1 ($5,1 \times 10^6$ buněk/ml)			Soubor dárců 6 ($6,5 \times 10^6$ buněk/ml)		
	Průměrný výtěžek (μg)	SD (μg)	CV (%)	Průměrný výtěžek (μg)	SD (μg)	CV (%)
Šarže 1, všichni uživatelé	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Šarže 2, všichni uživatelé	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Šarže 3, všichni uživatelé	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Kombinace dat	Soubor dárců 9 ($8,4 \times 10^6$ buněk/ml)			Soubor dárců 10 ($10,2 \times 10^6$ buněk/ml)		
	Průměrný výtěžek (μg)	SD (μg)	CV (%)	Průměrný výtěžek (μg)	SD (μg)	CV (%)
Šarže 1, všichni uživatelé	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Šarže 2, všichni uživatelé	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Šarže 3, všichni uživatelé	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

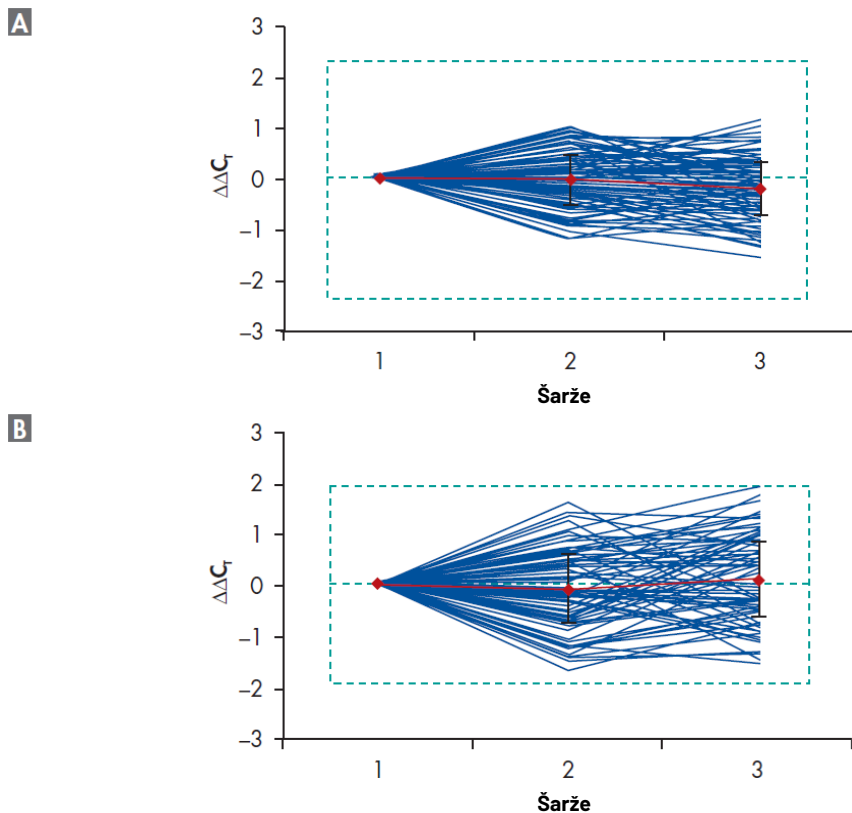
Tabulka 1D: Reprodukovatelnost mezi všemi šaržemi a všemi uživateli pro zvolené soubory dárců (1, 6, 9, 10)

Kombinace dat	Soubor dárců 1 ($5,1 \times 10^6$ buněk/ml)			Soubor dárců 6 ($6,5 \times 10^6$ buněk/ml)		
	Průměrný výtěžek (μg)	SD (μg)	CV (%)	Průměrný výtěžek (μg)	SD (μg)	CV (%)
Šarže 1, všichni uživatelé	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
	Soubor dárců 9 ($8,4 \times 10^6$ buněk/ml)			Soubor dárců 10 ($10,2 \times 10^6$ buněk/ml)		
	Průměrný výtěžek (μg)	SD (μg)	CV (%)	Průměrný výtěžek (μg)	SD (μg)	CV (%)
Šarže 1, všichni uživatelé	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Detailní analýza 4 reprezentativních souborů dárců. Soubory byly vybrány podle počtu leukocytů a odrážejí nejvyšší, střední a nejnižší hodnotu normálního rozsahu počtu leukocytů ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocytů/ml). Počet bílých krvinek představuje průměrnou hodnotu 3 testů počtu bílých krvinek od 3 dárců na jeden soubor dárců.



Obrázek 10: Reprodukovatelnost RT-PCR – mezi uživateli. Vzorky RNA purifikované v experimentu popsáném na obr. 9 byly použity pro real-time RT-PCR. Relativní koncentrace transkriptu [A] FOS a [B] IL1B byly určeny pomocí duplexní real-time RT-PCR za užití 18S-rRNA jako interního standardu. Zobrazeny jsou hodnoty všech vzorků, a sice v poměru k hodnotám pro uživatele A (10 souborů dárců × 3 šarže sady × 4 replikáty = 120 souborů dat pro každý gen) s průměrem (červená čára) a směrodatnou odchylkou (černá úsečka). Čárkované čáry znázorňují ± 3 násobnou celkovou přesnost analýz (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).



Obrázek 11: Reprodukovanost RT-PCR – mezi šaržemi sady. Vzorky RNA purifikované v experimentu popsaném na obr. 9 byly použity pro real-time RT-PCR. Relativní koncentrace transkriptu [A] FOS a [B] IL1B byly určeny pomocí duplexní real-time RT-PCR za užití 18S-rRNA jako interního standardu. Zobrazeny jsou hodnoty všech vzorků, a sice v poměru k hodnotám pro šarži sady 1 (10 souborů dárců \times 3 šarže sady \times 4 replikáty = 120 souborů dat pro každý gen) s průměrem (červená čára) a směrodatnou odchylkou (černá úsečka). Čárkované čáry znázorňují ± 3 násobnou celkovou přesnost analýz (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

Tabulka 2: Souhrn dat RT-PCR z obrázku 10 a obrázku 11

Testovací systém	Analýza FOS/18S-rRNA		Analýza IL1B/18S-rRNA	
Porovnání dat	Průměr ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Průměr ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Reprodukovatelnost v rámci každého uživatele a mezi všemi šaržemi				
Všichni uživatelé, šarže 1 – šarže 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Všichni uživatelé, šarže 1 – šarže 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Všichni uživatelé, šarže 1 – šarže 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Reprodukovatelnost v rámci každého uživatele a mezi všemi šaržemi				
Všechny šarže, uživatel A – uživatel A	0,00	0,00	0,00	0,00
Všechny šarže, uživatel A – uživatel B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Všechny šarže, uživatel A – uživatel C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Uživatel: Laboratorní technik, který prováděl experimenty.

Šarže: Číslo šarže použité sady v této studii.

SD: Směrodatná odchylka.

Zobrazeny jsou průměry hodnot $\Delta\Delta C_T$ (N = 120) a směrodatné odchylky dat znázorněných na obrázku 10 a obrázku 11.

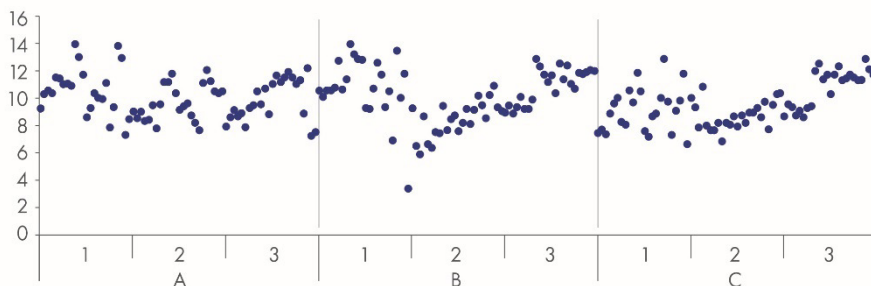
Automatizovaná izolace RNA

U minimálně 95 % zpracovaných vzorků byl dosažen výtěžek RNA $\geq 3 \mu\text{g}$ z 2,5 ml plné lidské krve zdravých dárců. Obrázek 12 (strana 54) uvádí výtěžky RNA z celkového počtu 216 vzorků, které byly za užití automatizovaného protokolu zpracovány 3 laboranty se 3 šaržemi sady. Protože byly pro tyto studie použity sdružené krevní vzorky, nikoli individuální vzorky odebrané do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), výsledky neodráží výtěžky RNA očekávané u individuálních vzorků z jednotlivých odběrů krve. Protože výtěžky silně závisí na dárcích, mohou se jednotlivé výtěžky lišit (obrázek 12, strana 54).

Přínejmenším 95 % vzorků nevykazovalo žádnou inhibici v RT-PCR v reálném čase, když eluát tvořil až 30 % reakčního objemu RT-PCR. U automatizovaného protokolu nebyly detekovány žádné křížové kontaminace mezi vzorky, jak prokázala kvantitativní real-time RT-PCR u sekvencí transkriptů ABL1 a FOS v RNA negativních vzorcích (voda) spárovaných s RNA pozitivními vzorky (plná lidská krev) ve stejném běhu.

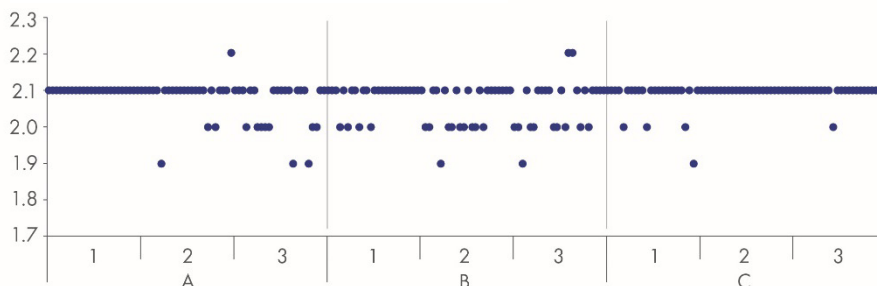
RNA izolovaná pomocí systému PAXgene Blood RNA System a automatizovaného protokolu je vysoce čistá, jak ukazuje nepřítomnost inhibice RT-PCR a hodnoty A_{260}/A_{280} mezi 1,8 a 2,2. Podíl genomové DNA tvoří u ≥ 95 % všech vzorků $\leq 1,0$ % (w/w), jak bylo změřeno pomocí kvantitativní real-time PCR u jedné sekvence genu beta aktinu. Obrázek 13 a obrázek 14 (strana 55) znázorňují hodnoty A_{260}/A_{280} a relativní genomovou DNA všech 216 vzorků připravených pomocí automatizovaného protokolu 3 laboranty se 3 šaržemi sady.

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



Obrázek 12: Výtěžek RNA – automatizované zpracování pomocí přístroje QIAcube Connect MDx. Vzorky krve od jednotlivých dárců byly odebrány do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Obsah zkumavek byl sdružen do 6 souborů dárců a následně znovu rozpipetován. Celkem 216 zkumavek (tj. 36 v každém souboru) bylo zpracováno 3 různými laboranty (A, B, C). Každý laborant použil pro automatizovanou izolaci pomocí přístroje QIAcube Connect MDx 3 různé šarže (1, 2, 3) sady PAXgene Blood RNA Kit a zpracoval čtyři replikáty z každého z 6 souborů dárců. Zobrazeny jsou výtěžky RNA všech jednotlivých vzorků na každou kombinaci laborant-šarže.

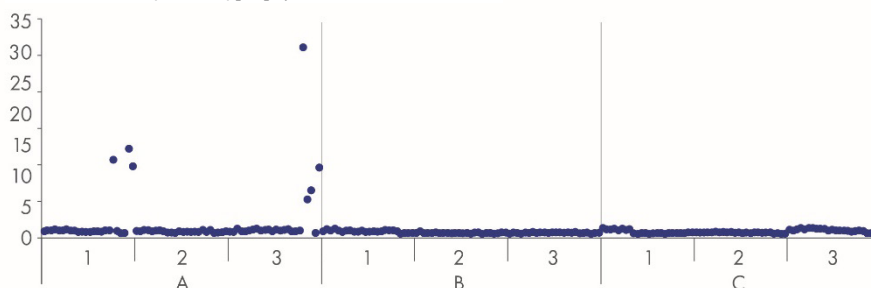
Čistota RNA (A_{260}/A_{280}) QIAcube Connect MDx



Obrázek 13: Čistota RNA (hodnoty A_{260}/A_{280}) – automatizované zpracování pomocí přístroje QIAcube Connect MDx.

RNA byla v rámci experimentu popsaném na obrázku 12 purifikována 3 různými laboranty (A, B, C) za užití 3 různých šarží (1, 2, 3) sady PAXgene Blood RNA Kit pomocí přístroje QIAcube Connect MDx. Zobrazeny jsou hodnoty A_{260}/A_{280} všech jednotlivých vzorků na každou kombinaci laborant–šarže.

Genomová DNA (hm/hm) [%], QIAcube Connect MDx



Obrázek 14: Čistota RNA (% kontaminace genomovou DNA) – automatizované zpracování pomocí přístroje QIAcube Connect MDx.

RNA byla v rámci experimentu popsaném na obrázku 12 purifikována 3 různými laboranty (A, B, C) za užití 3 různých šarží (1, 2, 3) sady PAXgene Blood RNA Kit pomocí přístroje QIAcube Connect MDx. Zobrazeno je množství genomové DNA (hm/hm) ve všech jednotlivých vzorcích pro každou kombinaci laborant–šarže.

Automatizovaný protokol izolace RNA za užití systému PAXgene Blood RNA System poskytuje vysoce reprodukovatelné a opakovatelné výsledky RT-PCR, takže v klinicko-diagnostických testech vykazuje vysokou robustnost.

Stabilita izolované RNA

Vzorky RNA izolované z krví naplněných zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes pomocí sady PAXgene Blood RNA Kit jsou stabilní po dobu 5 let při skladování při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 7 let při skladování při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (koncový bod studií).

Důležité poznámky

Používání přístroje QIAcube Connect MDx

Ujistěte se, že jste obeznámeni s fungováním přístroje QIAcube Connect MDx. Prostudujte si uživatelskou příručku k přístroji a veškeré dodatečné informace, které jsou s ním dodávány. Před zahájením automatizovaného protokolu PAXgene Blood RNA věnujte zvláštní pozornost části Informace o bezpečnosti.

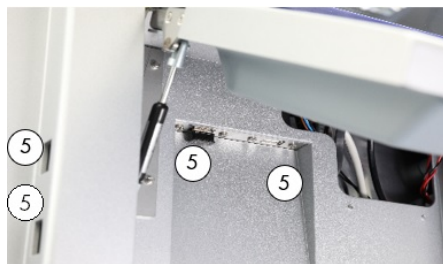
Spuštění přístroje QIAcube Connect MDx

Zavřete kryt přístroje QIAcube Connect MDx a pomocí vypínače přístroj zapněte (viz obrázek 15, strana 58).

Ozve se pípnutí a zobrazí se úvodní obrazovka. Přístroj automaticky provede zahajovací testy.



Přední strana přístroje QIAcube Connect MDx



Vysunutá dotyková obrazovka



Pohled na přístroj QIAcube Connect MDx zezadu (levá strana)



Pohled na přístroj QIAcube Connect MDx zezadu (pravá strana)

Obrázek 15: Vnější prvky přístroje QIAcube Connect MDx.

- | | |
|--|--|
| <p>1 Dotyková obrazovka</p> <p>2 Kryt</p> <p>3 Odpadní zásuvka</p> <p>4 Síťový vypínač</p> | <p>5 2 porty USB na levé straně dotykové obrazovky; 2 porty USB za dotykovou obrazovkou (modul Wi-Fi zasunutý do 1 portu USB)</p> <p>6 Ethernetový port RJ-45</p> <p>7 Zásuvka pro napájecí kabel</p> <p>8 Výstup chladicího vzduchu</p> |
|--|--|

Dotyková obrazovka

Přístroj QIAcube Connect MDx je řízen pomocí dotykové obrazovky. Dotyková obrazovka uživateli umožňuje ovládat přístroj a provést jej nastavením pracovní plochy. V průběhu zpracování vzorku dotyková obrazovka zobrazuje stav protokolu a zbývající čas.




Obrázek 16: Vysunutá dotyková obrazovka přístroje QIAcube Connect MDx.


Instalace protokolů na přístroji QIAcube Connect MDx

Před první přípravou RNA na přístroji QIAcube Connect MDx může být nutné provést úvodní instalaci protokolů. Nainstalujte oba protokoly „PAXgene Blood RNA Part A“ a „PAXgene Blood RNA Part B“.

Protokoly pro přístroj QIAcube Connect MDx jsou k dispozici na stránkách **www.qiagen.com**. Je zapotřebí je stáhnout na USB flash disk dodaný s přístrojem. Tyto protokoly budou do přístroje přeneseny prostřednictvím portu USB.

Port USB (nachází se na straně dotykové obrazovky, viz obrázek 15, strana 58) umožňuje spojení mezi přístrojem QIAcube Connect MDx a USB flash diskem dodávaným s přístrojem. Soubory dat, jako například soubory typu log či report, mohou být také z přístroje přeneseny přes port USB na USB flash disk.

 Port USB se smí používat pouze pro USB flash disk dodávaný společností QIAGEN. Do tohoto portu nepřipojujte jiná zařízení.

 Nevyjímejte USB flash disk během stahování protokolů, přenosu souborů dat nebo při běhu protokolu.


Další podrobnosti o procesu nahrávání protokolů do přístroje QIAcube Connect MDx si prosím přečtěte v příslušné příručce k přístroji.


Naplnění přístroje QIAcube Connect MDx

Abyste ušetřili čas, můžete přístroj naplnit během jednoho nebo obou 10minutových centrifugačních kroků (krok 3 a 5), jak uvádí kapitola „Protokol: Automatizovaná izolace celkové RNA z plné lidské krve odebrané do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)“ na straně 32.

Reagenční lahvičky

Před každým během na přístroji QIAcube Connect MDx opatrně naplňte 4 reagenční lahvičky uvedené v tabulce 3 (strana 61) reagenциemi až po vyznačenou rysku pro maximum. Pokud to není možné, naplňte je do úrovně dané objemy pufrů dodávaných v sadě PAXgene Blood RNA Kit. Na naplněné lahvičky a víčka jasně napište názvy pufrů a umístěte je do náležitých pozic na stojanu na reagenční lahvičky. Stojan umístěte na pracovní desku přístroje, jak je znázorněno (obrázek 17 a obrázek 18, na stranách 61 a 62).

 Dodávaný objem pufru BR2 nenaplní reagenční lahvičku po vyznačenou rysku. Pufry BR3 a BR4 nemusí naplnit lahvičku po vyznačenou rysku, pokud byly použity ke zpracování většího počtu vzorků v předchozích bězích.

 Před umístěním lahviček na pracovní desku se ujistěte, že jste z nich odstranili víčka.



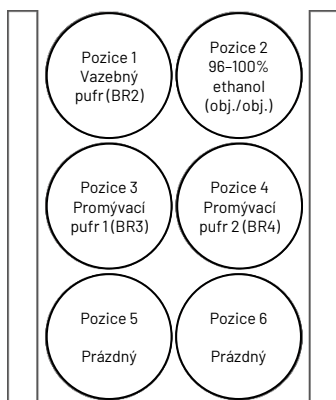
Objem pufrů dodávaných se sadou PAXgene Blood RNA Kit (50) vystačí maximálně na 7 příprav RNA v přístroji QIAcube Connect MDx, přičemž v každém běhu budou 2 až 12 vzorků. Obecně je třeba se vyhnout běhům s malým počtem vzorků na jeden běh, aby bylo možné zpracovat celkem 50 vzorků na sadu. Více než 7 běhů přípravy RNA může mít za následek nedostatečný objem pufru pro zpracování posledních vzorků.

Tabulka 3: Pozice na stojanu na reagenční lahvičky

Pozice	Reagencie
1	Vazebný pufr (BR2)
2	Ethanol (96–100 %, obj.)
3	Promývací pufr 1 (BR3)
4	Promývací pufr 2 (BR4)*
5	– (ponechte prázdné)
6	– (ponechte prázdné)

* Promývací pufr 2 (BR4) je dodáván jako koncentrát. Před prvním použitím přidejte do lahvičky 4násobný objem ethanolu (96–100 % obj., stupeň čistoty p.a.), jak je popsáno na lahvičce, abyste vytvořili pracovní roztok.

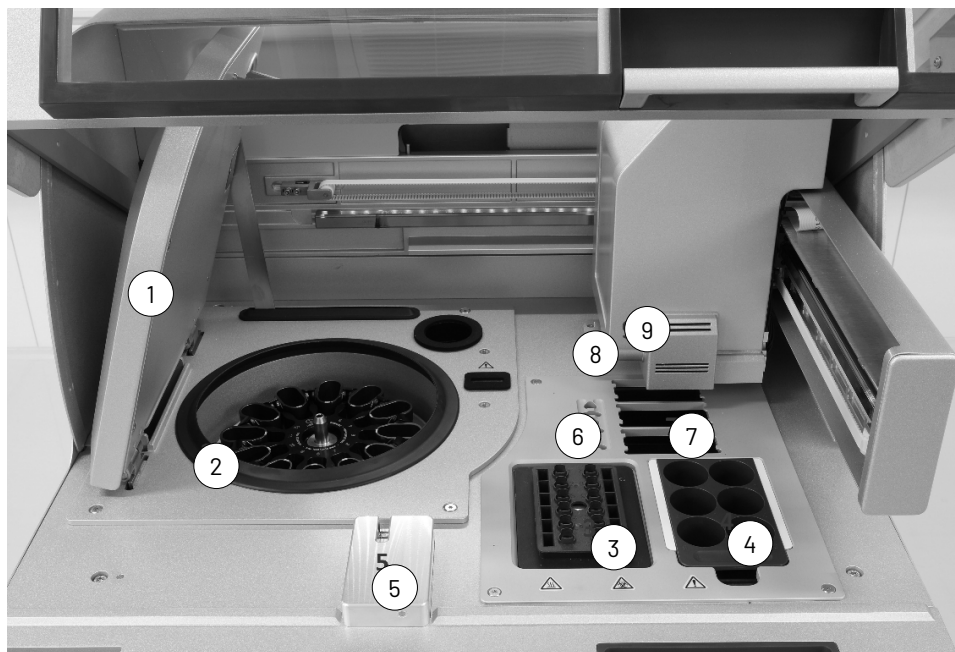
A



B



Obrazek 17: Vložení stojanu na reagenční lahvičky. [A] Schéma pozic a obsahu lahviček na stojanu pro reagenční lahvičky. [B] Vložení stojanu do přístroje QIAcube Connect MDx.



Obrázek 18: Náhled do vnitřního prostoru přístroje QIAcube Connect MDx.

- | | | | |
|---|--|---|---|
| ① | Viko odstředivky | ⑥ | Sloty mikrocentrifugačních zkumavek |
| ② | Centrifuga | ⑦ | 3 drážky pro stojany na špičky |
| ③ | Třepačka | ⑧ | Otvory pro likvidaci špiček a kolonek |
| ④ | Stojan na reagenční lahvičky | ⑨ | Robotické rameno (obsahuje 1kanálový pipetor, unašeč, ultrazvukový a optický senzor a UV LED) |
| ⑤ | Senzor pro kontrolu špiček a zámek krytu | | |

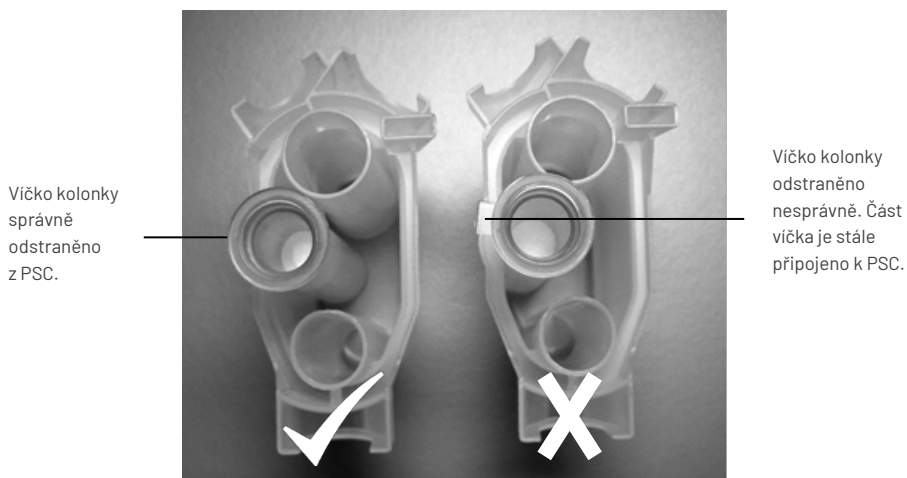
Odstředivací kolonky (PSC, PRC), mikrocentrifugační zkumavky a plastové předměty k přístroji QIAcube Connect MDx

Umístěte 2 stojany na špičky naplněné špičkami s filtry o objemu 1 000 µl do přístroje QIAcube Connect MDx (viz obrázek 18, strana 62). Je-li potřeba, stojany doplňte.

i Používejte pouze špičky s filtrem o objemu 1 000 µl určené pro použití s přístrojem QIAcube Connect MDx.

Popište permanentní fixou adaptéry do rotoru a mikrocentrifugační zkumavky pro každý vzorek. Otevřete PSC určené k použití a nůžkami zcela odstříhnete víčko (viz obrázek 19).

i Aby mohla robotická ruka přístroje QIAcube Connect MDx správně fungovat, zcela odstraňte (odstříhnete) víčka a umělohmotné části spojující víčko a PSC (viz obrázek 19). Jinak nemůže robotická ruka PSC správně uchopit.



Obrázek 19: Vložení PSC. PSC je vložena do střední pozice adaptéru do rotoru. Před vložení kolonky odstříhnete víčko PSC.

Vložte PSC (bez víčka, viz obrázek 19, strana 63), PRC a popsanou mikrocentrifugační zkumavku do náležitých pozic do každého popsaného adaptéru do rotoru, jak je uvedeno v tabulce 4 a na obrázku 20.

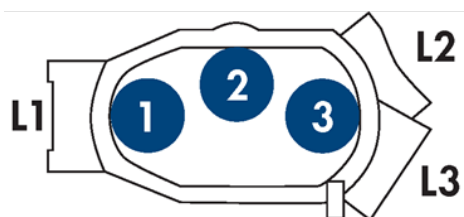


Ujistěte se, že jsou víčka odstředovacích kolonek (PAXgene RNA spin column, PRC) a mikrocentrifugačních zkumavek stlačena až na konec drážek na okraji adaptéru do rotoru, jinak se mohou víčka během centrifugace odlomit.

Tabulka 4: Plastové předměty v adaptéru do rotoru

Pozice	Reagencie	Pozice víčka
1	Odstředovací kolonka PAXgene RNA (červená, PRC)	L1
2	Odstředovací kolonka PAXgene Shredder (fialová, PSC) (před vložením do adaptéru rotoru odstříhnete víčko)	-
3	MCT*	L3

*Použijte mikrocentrifugační zkumavku MCT (1,5 ml), která je součástí sady PAXgene Blood RNA Kit.



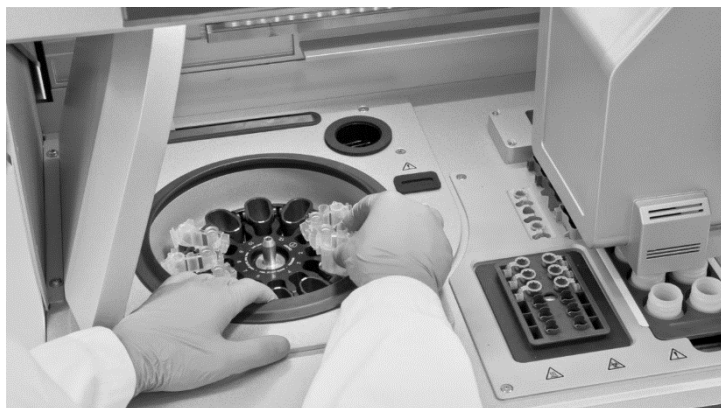
Obrázek 20: Pozice v adaptéru do rotoru. Adaptér do rotoru má 3 pozice pro zkumavky (1-3) a tři pozice pro víčka (L1-L3).

Plnění centrifugy

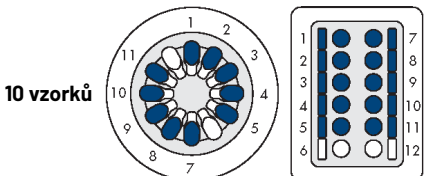
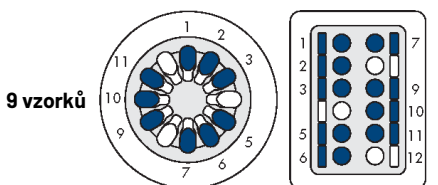
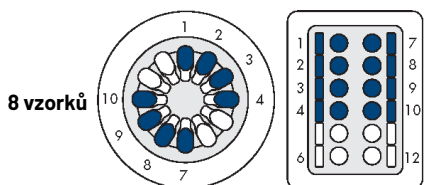
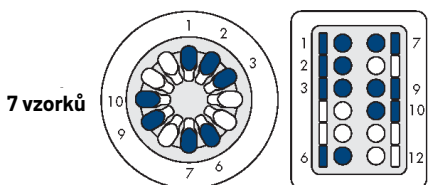
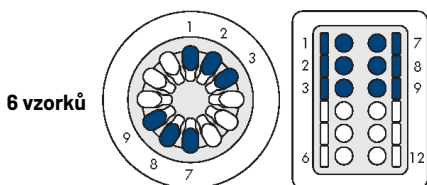
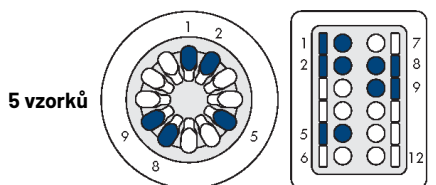
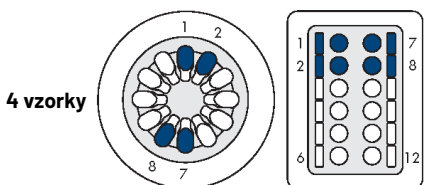
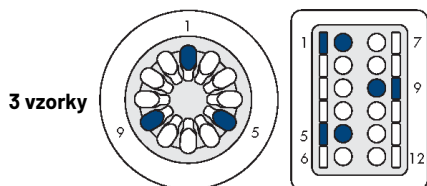
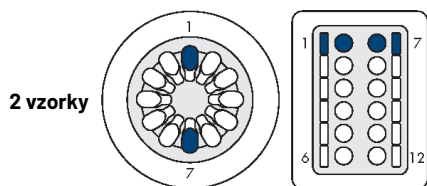
Vložte sestavené adaptéry do rotoru do jamek centrifugy přístroje QIAcube Connect MDx, jak je znázorněno na obrázku 21 níže.



Při zpracování méně než 12 vzorků musí být rotor centrifugy naplněn paprskovitě (viz obrázek 22, strana 66), aby zůstal vyvážen. Před začátkem běhu protokolu musí být nasazeny všechny jamky centrifugy, a to i v případě, že je zpracováváno méně než 12 vzorků. Jediný vzorek nebo 11 vzorků nelze zpracovat.



Obrázek 21: Vkládání centrifugy do přístroje QIAcube Connect MDx. Vložte sestavené adaptéry do rotoru do jamek centrifugy.



Obrázek 22: Plnění centrifugy a třepačky. Pozice centrifugy a třepačky jsou zobrazeny pro zpracování dvou (2) až deseti (10) vzorků. Jeden (1) nebo 11 vzorků nelze zpracovat. Při zpracování 12 vzorků jsou zaplněny všechny pozice centrifugy a třepačky (bez obrázku).

Zkumavky na zpracování

Vyjměte z drážek pro mikrocentrifugační zkumavky všechny zkumavky, které zbyly z předchozích běhů (viz obrázek 18, strana 62). Naplňte 3 mikrocentrifugační zkumavky množstvím reagensů uvedeným v tabulce 5 podle počtu vzorků v daném běhu.

Pro inkubační směs z DNázy I přeneste pipetou uvedený objem pufru k digesci DNA (RDD) do zkumavky na zpracování vzorku a přidejte uvedený objem zásobního roztoku DNázy I (RNase-Free DNase, RNFD). Směs jemně promíchejte náběrem a následným vypuštěním pipety (opakujte třikrát za užití pipetovací špičky o objemu 1 000 µl).



Používejte 2ml zkumavky na zpracování vzorku dodávané se sadou PAXgene Blood RNA Kit. Jasně popište zkumavky názvy reagensů a umístěte je do odpovídajících pozic v drážkách pro mikrocentrifugační zkumavky, jak je uvedeno v tabulce 6 (strana 68).



DNáza I (RNase-Free DNase, RNFD) je velmi náchylná k fyzikální denaturaci. Míchejte pouze pomocí pipety a používejte pipetovací špičky s širokým průměrem, abyste omezili smykové tření. Nevortexujte.

Ujistěte se, že pipetujete správný objem uvedený v tabulce 5 níže.

Tabulka 5: Požadovaný objem reagentů ve zkumavkách na zpracování vzorku do drážek pro mikrocentrifugační zkumavky

Počet vzorků	Objem reagentů pro uvedený počet vzorků (µl)		
	Proteináza K (PK)	Inkubační směs DNázy I	Eluční pufr (BR5)
2	126	187 (23 DNázy I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNázy I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNázy I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNázy I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNázy I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNázy I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNázy I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNázy I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNázy I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNázy I + 806 Buffer RDD)	1177

Tabulka 6: Sloty mikrocentrifugačních zkumavek

	Pozice		
	A	B	C
Obsah	Proteinase K	Inkubační směs DNázy I	Eluční pufr (BR5)
Nádobka	Zkumavka na zpracování*	Zkumavka na zpracování*	Zkumavka na zpracování*

*Použijte 2ml zkumavky na zpracování vzorku dodávané se sadou PAXgene Blood RNA Kit.

Likvidace

Pro bezpečnou likvidaci po odběru vzorku a manuální izolaci RNA si přečtěte informace o bezpečnosti a opatření na stranách 18 a 19.

U automatizované izolace RNA pomocí přístroje QIAcube Connect MDx se podívejte na obrázek 21 a obrázek 22, strany 65 a 66. Jsou na nich znázorněny vyhrazené sloty použitých špiček a kolonek k likvidaci.

Literatura

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.

Návod na řešení potíží

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Další informace můžete najít mezi častými dotazy (Frequently Asked Questions, FAQ) na stránkách našeho centra technické podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vědci z technické podpory společnosti QIAGEN vždy rádi zodpoví vaše otázky ohledně údajů a protokolů v této příručce i obecně k technologiím pro přípravu vzorků a jejich analýzám (možnosti navázání kontaktu viz poslední strana nebo navštivte www.qiagen.com).

Komentáře a návrhy	
Degradace RNA	
a) Kontaminace RNázou	 Zajistěte, aby nebyly do reagensií během postupu nebo následné manipulaci vneseny žádné stopy RNázy (viz příloha A, strana 76).
Nizký výtěžek RNA	
b) Odebráno méně než 2,5 ml krve do zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT)	 Ujistěte se, že bylo při odběru odebráno do zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 2,5 ml krve (viz příručka PAXgene Blood RNA Tube).
c) Koncentrace RNA byla měřena ve vodě	 Pro co nejpřesnější kvantifikaci musí být RNA naředěna v 10mM Tris-HCl, pH 7,5* (viz příloha B, strana 77).
d) Do kolonek PRC byly během kroků 9 a 10 manuálního protokolu přeneseny buněčné zbytky.	 Když pipetujete supernatant v kroku 7 manuálního protokolu, snažte se nepřenasět velké částice (přenos malých úlomků přípravu nenarušuje).
e) Supernatant nebyl v kroku 3 úplně odstraněn	 Ujistěte se, že byl odstraněn veškerý supernatant. Pokud supernatant dekantujete, odstraňte kapky úplně na okraji zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pomocí papírového ubrousku. Vykonejte náležitá bezpečnostní opatření, aby se zabránilo křížovým kontaminacím.
f) Po odběru do zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) se krev inkubuje méně než 2 hodiny	 Po odběru inkubujte krev ve zkumavce PAXgene Blood RNA Tube (BRT) nejméně 2 hodiny.




* Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (BL), které obdržíte od dodavatele výrobku.








Komentáře a návrhy	
Nizká hodnota A_{260}/A_{280}	
g) Při měření A_{260}/A_{280} byla RNA naředěna vodou	 <p>K ředění RNA před měřením čistoty použijte 10mM Tris-HCl, pH 7,5* (viz příloha B, strana 77).</p>
h) Spektrofotometr nebyl správně vynulován	 <p>Pro vynulování spektrálního fotometru použijte slepý vzorek (blank), jehož poměr elučního pufru (BR5) a ředícího pufru 10mM Tris-HCl, pH 7,5, odpovídá měřeným vzorkům. Eluční pufr (BR5) má při 220 nm vysokou absorbanci, což může vést k vysokým hodnotám absorbance pozadí, pokud nebyl nulový bod spektrálního fotometru nastaven správně.</p>
Porucha přístroje	
i) Přístroj QIAcube Connect MDx nefungoval správně	Přečtěte si <i>uživatelskou příručku k přístroji QIAcube Connect MDx</i> . Věnujte pozornost části o řešení potíží. Ujistěte se, že je přístroj správně udržován, jak je popsáno v uživatelské příručce.

* 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.

Symboly

V návodu k použití anebo na obalu a značení se mohou objevit následující symboly: Další symboly jsou vysvětleny v části Obsah soupravy (strana 6).

Symbol	Definice symbolu
V<N1>	Verze <N1> produktu
 <N2>	Obsahuje dostatek reagensů pro <N2> testů
	Prostudujte si návod k použití
	Použijte do
IVD	Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro
REF	Katalogové číslo
LOT	Číslo šarže
MAT	Číslo materiálu
COMP	Komponenty
NUM	Číslo
KU	Jednotky Kunitz
ADD	Přidání
CONT	Obsahuje
RCNS	Rekonstituováno

DNase	Deoxyribonukleáza I
EtOH	Ethanol
GITC	Guanidin isothiokyanát
RNase-Free DNase Set	Sada RNase-Free DNase Set
GTIN	Globální číslo obchodní položky
	Teplotní omezení
	Horní teplotní limit
	Výrobce
EC REP	Evropský zplnomocněný zástupce podle nařízení (EU) 2017/746
	Důležitá poznámka
	Doplnění ethanolu
CE	Označení CE Tento výrobek splňuje požadavky nařízení (EU) 2017/746 pro diagnostické zdravotnické prostředky in vitro.
UDI	Jedinečný identifikátor zařízení
	Upozornění
	VAROVÁNÍ: Horký povrch

Kontaktní údaje

Ve společnosti QIAGEN jsme hrdi na kvalitu a dostupnost naší technické podpory. V našich odděleních technické podpory pracují zkušení vědci s rozsáhlými praktickými a teoretickými zkušenostmi v oblasti molekulární biologie a využívání produktů PreAnalytiX. Pokud máte otázky ohledně sady PAXgene Blood RNA Kit, neváhejte a kontaktujte nás.

Pro technickou podporu a více informací navštivte naše centrum technické podpory na internetové adrese **www.qiagen.com/Support**, volejte na telefonní číslo 00800-22-44-6000, kontaktujte jedno z technických servisních oddělení společnosti QIAGEN anebo naše místní distributory (viz zadní strana obalu nebo navštivte webové stránky **www.qiagen.com**).

Příloha A: Obecné pokyny pro manipulaci s RNA

Manipulace s RNA



Ribonukleázy (RNázy) jsou velmi stabilní a aktivní enzymy, které obecně nevyžadují ke své funkci přítomnost kofaktorů. Vzhledem k tomu, že RNázy je těžké inaktivovat a k degradaci RNA stačí již velmi malé množství, neměli byste proto používat žádné laboratorní pomůcky z umělé hmoty nebo ze skla, které nebyly předtím zbaveny kontaminací RNázou. Během izolace a po ní dbejte důsledně na to, aby se nedopatřením do vzorku RNA nedostaly RNázy. Abyste vytvořili a udrželi prostředí bez obsahu RNázy, musíte při přípravě a používání roztoků a nádobek k jednorázovému či opakovanému použití při práci s RNA dodržovat příslušná bezpečnostní opatření.

Obecné pokyny k manipulaci



Práce s RNA by měla vždy probíhat podle zásad řádné mikrobiologické a aseptické pracovní techniky. Ruce a prachové částice přenášejí bakterie a plísňe a jsou tedy nejčastější zdroj kontaminace RNázou. Při manipulaci s reagensy a vzorky RNA vždy noste latexové nebo vinylové rukavice, abyste zabránili kontaminaci RNázou z povrchu kůže nebo ze zaprášeného laboratorního vybavení. Jednorázové rukavice často vyměňujte a uzavírejte všechny zkumavky ihned po použití. Pokud chcete purifikovanou RNA pro následující aplikace rozpipetovat, ponechte ji na ledu.

Protokoly k odstranění kontaminací RNázou ze skleněných materiálů a roztoků naleznete ve všeobecných metodických publikacích molekulární biologie, jako např. Sambrook, J. a Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3. vydání, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Příloha B: Kvantifikace a stanovení kvality celkové RNA

Kvantifikace RNA

Koncentrace RNA by měla být určena měřením absorbance při 260 nm (A_{260}) ve spektrálním fotometru. Aby bylo dosaženo co nejpřesnějšího měření, měl by záznam ležet v lineární oblasti spektrálního fotometru. Absorbance 1 jednotky při vlnové délce 260 nm odpovídá koncentraci 44 μg RNA na ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$). Tento vztah platí jen pro měření v 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Proto by měl být vzorek RNA v případě potřeby naředěn 10 mM Tris-HCl. Jak je popsáno níže (viz kapitola „Čistota RNA“ na straně 78), poměr hodnot absorbancí při 260 nm a 280 nm je přibližným měřítkem čistoty RNA. Ujistěte se, že jsou kyvety použité pro měření vzorků RNA prosté RNázy. Pro vynulování spektrálního fotometru použijte slepý vzorek (blank), jehož poměr elučního pufru (BR5) a ředícího pufru Tris-HCl odpovídá měřeným vzorkům. Eluční pufr (BR5) má při 220 nm vysokou absorbanci, což může vést k vysokým hodnotám absorbance pozadí, pokud nebyl nulový bod spektrálního fotometru nastaven správně. Níže je uveden příklad výpočtu kvantifikace RNA.

Objem vzorku RNA	=	80 μl
Ředění (1/15)	=	10 μl vzorku RNA + 140 μl 10mM Tris-HCl, pH 7,5
Měření absorbance naředěného vzorku v kyvetách prostých RNázy.		
A_{260}	=	0,3
Koncentrace vzorku	=	$44 \times A_{260} \times \text{faktor ředění}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 $\mu\text{g/ml}$
Celkový výtěžek	=	koncentrace \times objem vzorku v mililitrech
	=	198 $\mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml}$
	=	15,8 μg RNA

* Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (BL), které obdržíte od dodavatele výrobku.

Čistota RNA

Poměr hodnot při 260 nm a 280 nm (A_{260}/A_{280}) je přibližným měřítkem čistoty RNA s ohledem na kontaminanty, které se absorbují v UV, jako např. proteiny. Poměr A_{260}/A_{280} je značně závislý na hodnotě pH. Nižší hodnoty pH mají za následek nižší poměr A_{260}/A_{280} a redukovanou senzitivitu vůči kontaminacím proteiny.* Pro získání přesných dat doporučujeme určit absorbanci v 10 mM Tris-HCl (pH 7,5). Čistá RNA vykazuje v 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) poměr A_{260}/A_{280} mezi 1,8 a 2,2. Pro vynulování spektrálního fotometru použijte slepý vzorek (blank), jehož poměr elučního pufru (BR5) a ředícího pufru Tris-HCl odpovídá měřeným vzorkům. Eluční pufr (BR5) má při 220 nm vysokou absorbanci, což může vést k vysokým hodnotám absorbance pozadí, pokud nebyl nulový bod spektrálního fotometru nastaven správně.

* 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.

Příloha C: Manipulace se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Následující doporučení od společnosti BD pro vás mohou být užitečná při manipulaci se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Další informace k použití zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) naleznete v příručce *PAXgene Blood RNA Tube Handbook*.

Instrukce k odstranění bezpečnostního uzávěru BD Hemogard

1. Uchopte zkumavku PAXgene Blood RNA Tube (BRT) jednou rukou, palec přitom umístěte přímo pod bezpečnostní uzávěr BD Hemogard. (Větší stabilitu získáte, opřete-li ruku o pevnou plochu.) Druhou rukou otáčejte uzávěrem BD Hemogard a zároveň jej tlačte palcem nahoru dokud se zátka zkumavky neuvolní.
2. Palec před sejmutím uzávěru oddalte. Neodsunujte uzávěr od zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) palcem. Upozornění: Krev obsažená ve zkumavkách PAXgene Blood RNA Tube (BRT) představuje potenciální nebezpečí infekce. Abyste se vyvarovali zranění během sejmutí uzávěru, je důležité od zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) oddálit palec, kterým tlačíte uzávěr nahoru, ihned jak se uzávěr BD Hemogard uvolní.
3. Zdvihněte uzávěr ze zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Ve velmi nepravděpodobném případě, kdyby se umělohmotný kryt oddělil od gumové zátky, uzávěr znovu nesestavujte. Ze zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) opatrně sejměte gumovou zátku.

Instrukce k opětovnému uzavření sekundárním bezpečnostním uzávěrem BD Hemogard

1. Na zkumavku PAXgene Blood RNA Tube (BRT) znovu nasadte uzávěr.
2. Gumovou zátkou otáčejte za současného tlaku na zkumavku. Zátka musí být úplně zasunuta, aby se uzávěr při manipulaci se zkumavkou PAXgene Blood RNA Tube (BRT) neuvolnil.

Informace pro objednání

Produkt	Obsah	Kat. č.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 odstředovacích kolonek PAXgene Spin Columns, 50 odstředovacích kolonek Shredder Spin Columns, zkumavky na zpracování vzorku, DNáza I bez obsahu RNázy, reagentie a pufrы bez obsahu RNázy. K použití ve spojení se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 zkumavek na odběr krve	762165
Související produkty, které lze objednat u společnosti QIAGEN pro izolaci RNA automatizovanou na QIAcube		
Starter Pack, QIAcube	Balíček zahrnuje: stojany na reagenční lahvičky (3); proužky pro popis stojanu (8); 200µl špičky s filtrem (1024); 1000µl špičky s filtrem (1024); 1000µl špičky s filtrem a širokým otvorem (1024); 30ml reagenční lahvičky (18); adaptéry do rotoru (240); držák na adaptéry do rotoru	990395
Filter-Tips, 1000 µL (1024)	Sterilní jednorázové špičky s filtrem, ve stojáncích	990352
Reagent Bottles, 30 mL (6)	Reagenční lahvičky (30 ml) s víčky; balíček po 6 kusech; pro použití se stojanem na reagenční lahvičky Reagent Bottle Rack QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 × 24)	Pro přípravu 240 vzorků: 240 jednorázových adaptérů do rotoru; pro použití s přístrojem QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Stojan pro 6 × 30ml reagenční lahvička na pracovní ploše přístroje QIAcube	9026197
Rotor Adapter Holder	Držák na 12 jednorázových adaptérů do rotoru; pro použití s přístrojem QIAcube	990392

Produkt	Obsah	Kat. č.
Související produkty, které lze objednat u společnosti BD pro odběr krve pomocí zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)*		
BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set	21G, 0,75palcová (0,8 × 19 mm) kanyla, 12palcová (305 mm) hadička s adaptérem luer; 50 kusů v krabičce, 200 kusů v kartonu	367286 / 367281
BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set	21G kanyla, 0,8 × 19 mm, 305mm hadička s adaptérem luer. 50 ks/krabička, 200 ks/karton	367344
BD Vacutainer One-Use Holder	Jednorázový držák pouze na průměry 13 a 16 mm; 1000/karton	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 × 75 mm, 4,0ml odběrové zkumavky s červeným bezpečnostním uzávěrem BD Hemogard a papírovým štítkem; 100 ks/krabička, 1000 ks/karton	368975 / 367812
BD Vacutainer EST Tube	13 × 75 mm, 3,0ml odběrové zkumavky s průhledným bezpečnostním uzávěrem BD Hemogard a průhledným štítkem; 100 ks/krabička, 1000 ks/karton	362725
BD Vacutainer No Additive (Z) Tube	13 × 75 mm, 3,0ml odběrové zkumavky s průhledným bezpečnostním uzávěrem BD Hemogard a papírovým štítkem; 100 ks/krabička, 1000 ks/karton	366703

* Zde uvedené produkty představují typické doplňky pro odběr krve, které mohou být použity se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Další informace (včetně informací o objednání) k těmto doplňkům naleznete na webových stránkách www.preanalytix.com.

Historie revizí dokumentu

Datum	Změny
[R1] duben 2022	První vydání IVDR
[R2] únor 2023	Adresa společnosti PreAnalytiX GmbH změněna z ulice „Feldbachstrasse“ na „Garstligweg 8“. Do oddílu Informace pro objednání byly přidány produkty BD. Aktualizace oddílu Informace o bezpečnosti.

Poznámky



Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příslušné příručce pro sadu PreAnalytiX či QIAGEN nebo v uživatelské příručce. Příručky a uživatelské návody sady PreAnalytiX a QIAGEN jsou k dispozici na webových stránkách www.preanalytix.com a www.qiagen.com nebo si je lze vyžádat od oddělení technických služeb společnosti QIAGEN, případně u místního distributora.

**Better samples
More to explore**

 **PreAnalytiX**
A QIAGEN / BD Company

Více informací naleznete na webových stránkách: www.preanalytix.com

HB-3009-002 02/2023

Objednávky www.qiagen.com/shop | Technická podpora www.support.qiagen.com | Webová stránka www.qiagen.com nebo www.preanalytix.com