

Luty 2023 r.

PAXgene[®] Blood RNA Kit (Instrukcja obsługi) Instrukcja użycia



Wersja 3 (wer. 3)

IVD

Do diagnostyki in vitro



REF

762174



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

Zestaw wyprodukowany przez QIAGEN[®] GmbH dla PreAnalytiX
GmbH

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NIEMCY

R2

MAT

1130774PL

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

PreAnalytiX GmbH, 8634 Hombrechtikon, CH.

© 2023 PreAnalytiX GmbH. PreAnalytiX, logo PreAnalytiX i wszelkie pozostałe znaki towarowe są własnością firmy PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH, o ile nie podano inaczej.

Umowa ograniczonej licencji dla zestawu PAXgene Blood RNA Kit

Korzystanie z tego produktu oznacza zgodę nabywcy lub użytkownika produktu na następujące warunki:

1. Ten produkt może być użytkowany wyłącznie zgodnie z protokołami dołączonymi do produktu oraz niniejszą instrukcją obsługi i wyłącznie ze składnikami znajdującymi się w tym zestawie. Firma PreAnalytiX® nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania niniejszego panelu ze składnikami nienależącymi do panelu z wyjątkiem przypadków opisanych w protokołach dołączonych do produktu, niniejszej instrukcji obsługi oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronach **www.qiagen.com** i **www.preanalytix.com**.
2. Z wyjątkiem wyraźnie określonych licencji, firma PreAnalytiX nie udziela gwarancji, że ten zestaw i/lub jego użytkowanie nie narusza praw stron trzecich.
3. Zestaw jest na mocy licencji przeznaczony wyłącznie do jednorazowego użytku i nie można go ponownie używać, regenerować ani odsprzedawać.
4. Firma PreAnalytiX podkreśla, że nie udziela żadnych innych licencji wyrażonych lub dorozumianych poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik zestawu zobowiązują się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej.
6. Firma PreAnalytiX może egzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu. Ma także prawo zażądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencyjne są dostępne na stronach **www.qiagen.com** i **www.preanalytix.com**.

HB-3009-002 BD-8945 1130774PL © 2023 PreAnalytiX GmbH, wszelkie prawa zastrzeżone.

Dystrybutorzy firmy PreAnalytiX

Produkty PreAnalytiX są wytwarzane i dystrybuowane przez firmę QIAGEN i firmę BD dla firmy PreAnalytiX.

Zawartość

Zawartość	3
Przeznaczenie	6
Docelowi użytkownicy	6
Opis i zasada procedury	7
Wstęp	7
Zasada działania i procedura	7
Pobieranie i stabilizacja próbek	8
Izolacja RNA	8
Ręczna izolacja RNA	9
Zautomatyzowana izolacja RNA	11
Dostarczone materiały	14
Zawartość zestawu	14
Składniki zestawu	15
Materiały wymagane, ale niedostarczane	16
Dla wszystkich protokołów	16
Dla protokołu ręcznego	17
Dla protokołu zautomatyzowanego	17
Ostrzeżenia i środki ostrożności	19
Informacje dotyczące bezpieczeństwa	19
Informacje dotyczące nagłych przypadków	20
Środki ostrożności	20
Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami	24

Stabilność w trakcie użytkowania	24
Pobieranie, przechowywanie i sposób postępowania z próbkami	25
Protokół: ręczna izolacja całkowitego RNA z ludzkiej krwi pełnej pobranej do probówek PAXgene Blood RNA Tubes	26
Protokół: zautomatyzowana izolacja całkowitego RNA z ludzkiej krwi pełnej pobranej do probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	35
Ograniczenia w zakresie stosowania produktu	43
Kontrola jakości	43
Parametry skuteczności	44
Pobieranie i stabilizacja próbek	44
Ręczna izolacja RNA	49
Zautomatyzowana izolacja RNA	58
Stabilność wyizolowanego RNA	61
Ważne uwagi	62
Obsługa aparatu QIAcube Connect MDx	62
Uruchamianie aparatu QIAcube Connect MDx	62
Instalowanie protokołów w aparacie QIAcube Connect MDx	64
Ładowanie aparatu QIAcube Connect MDx	65
Kolumny wirówkowe (PSC, PRC), próbki MCT i sprzęty z tworzywa sztucznego do aparatu QIAcube Connect MDx.....	68
Usuwanie	74
Literatura.....	75
Rozwiązywanie problemów	76
Symbole	78
Informacje kontaktowe	80

Załącznik A: Ogólne uwagi dotyczące postępowania z RNA	81
Załącznik B: Oznaczenie ilościowe i określenie jakości całkowitego RNA	83
Załącznik C: Postępowanie z probówkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	85
Informacje dotyczące zamawiania	87
Historia zmian dokumentu	89

Przeznaczenie

Do diagnostyki in vitro.

System PAXgene Blood RNA System składa się z probówki do pobierania krwi (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) oraz zestawu do oczyszczania kwasów nukleinowych (PAXgene Blood RNA Kit). Jego przewidzianym zastosowaniem jest pobieranie, przechowywanie i transportowanie krwi oraz stabilizacja RNA wewnątrzkomórkowego w zamkniętej probówce, a następnie izolacja i oczyszczanie RNA pacjenta z krwi pełnej na potrzeby molekularnych testów diagnostycznych RT-PCR.

Parametry skuteczności dla systemu PAXgene Blood RNA System ustalono wyłącznie za pomocą transkryptów genów FOS i IL1B. Użytkownik jest odpowiedzialny za ustalenie odpowiednich parametrów skuteczności systemu PAXgene Blood RNA System dla innych transkryptów docelowych.

Wskazania dotyczące stosowania

Zestaw PAXgene Blood RNA Kit jest przeznaczony do oczyszczania RNA wewnątrzkomórkowego z krwi pełnej pobranej do probówki PAXgene Blood RNA Tube (BRT). W przypadku używania tego zestawu w połączeniu z probówką PAXgene Blood RNA Tube (BRT) system umożliwia uzyskanie oczyszczonego RNA wewnątrzkomórkowego z krwi pełnej odpowiedniego do reakcji RT-PCR wykonywanej w molekularnych testach diagnostycznych.

Docelowi użytkownicy

Produkt jest przeznaczony do stosowania przez profesjonalnych użytkowników, takich jak technicy i lekarze przeszkoleni w zakresie procedur diagnostyki in vitro.

Ten zestaw jest przeznaczony do użytku profesjonalnego.

Opis i zasada procedury

Wstęp

Pobranie krwi pełnej to pierwszy etap wielu oznaczeń molekularnych wykonywanych w celu badania RNA komórkowego. Jednakże poważnym problemem występującym w takich eksperymentach jest niestabilność profilu RNA komórkowego w warunkach *in vitro*. W badaniach przeprowadzonych w firmie PreAnalytiX wykazano, że liczba kopii poszczególnych rodzajów mRNA w krwi pełnej może zmienić się ponad 1000-krotnie podczas przechowywania lub transportowania próbki w temperaturze pokojowej (Rainen i wsp., 2002). Jest to spowodowane szybkim rozkładem RNA oraz indukowaną ekspresją określonych genów po pobraniu krwi. Takie zmiany profilu ekspresji RNA uniemożliwiają prowadzenie wiarygodnych badań ekspresji genów. Z tego względu w celu dokładnej analizy ekspresji genów w ludzkiej krwi pełnej kluczowe jest zastosowanie metody, która umożliwi zachowanie profilu ekspresji RNA podczas i po pobraniu krwi.

Zasada działania i procedura

Firma PreAnalytiX opracowała system, który umożliwia pobranie, stabilizację, przechowywanie i transport próbek ludzkiej krwi pełnej, wraz z szybkim i wydajnym protokołem izolacji RNA wewnątrzkomórkowego. System wymaga użycia probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) do pobierania krwi i stabilizacji RNA, a następnie ręcznej lub zautomatyzowanej izolacji RNA za pomocą zestawu PAXgene Blood RNA Kit. Protokół ręczny i protokół zautomatyzowany zapewniają zasadniczo równoważną skuteczność pod względem jakości i uzysku RNA. W niniejszej instrukcji obsługi zawarto dane dotyczące skuteczności dla protokołu ręcznego (rozpoczynające się na stronie 49) i protokołu zautomatyzowanego (rozpoczynające się na stronie 58).

System PAXgene Blood RNA System umożliwia normalizację kroków procedury przedanalizy – od pobrania próbki krwi do izolacji RNA komórkowego – zgodnie z normą ISO 20186-1:2019, Diagnostyczne badania molekularne in vitro – Specyfikacja procesów przedlaboratoryjnych badania pełnej krwi żyłnej – Część 1: Izolowane RNA komórkowe.

Pobieranie i stabilizacja próbek

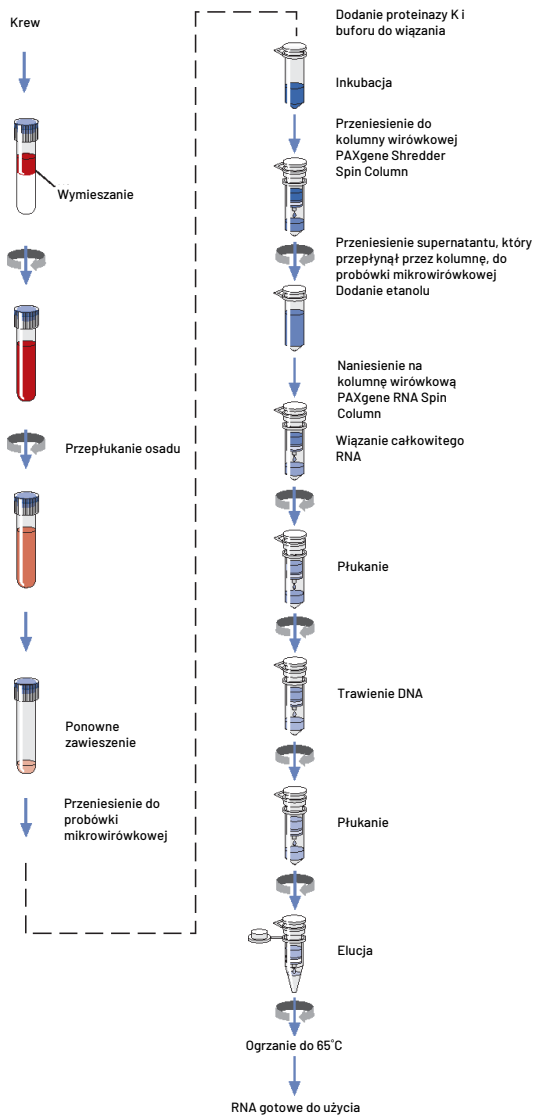
Probówki PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zawierają zastrzeżony odczynnik do stabilizacji RNA. Dodatek ten chroni cząsteczki RNA przed rozkładem przez RNazy i minimalizuje zmiany w ekspresji genów zachodzące pozaustrojowo. Parametry skuteczności systemu PAXgene Blood RNA System ustalono za pomocą transkryptów genów FOS i IL1B. Opis parametrów rozpoczyna się na stronie 44.

Izolacja RNA

Zestaw PAXgene Blood RNA Kit jest przeznaczony do izolacji całkowitego RNA z 2,5 ml ludzkiej krwi pełnej pobranej do probówki PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Procedura ta jest prosta i może być wykonywana w sposób ręczny lub zautomatyzowany (patrz Ryc. 1 na stronie 10 lub Ryc. 3 na stronie 12). W obu protokołach izolacja rozpoczyna się od etapu wirowania wykonywanego w celu osadzenia kwasów nukleinowych w probówce PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Osad jest przepłukiwany i zawieszany ponownie, a następnie wykonywana jest ręczna lub zautomatyzowana izolacja RNA. Co do zasady, oba protokoły obejmują te same etapy protokołu, w których stosowane są te same składniki zestawu.

Ręczna izolacja RNA

W ujęciu szczegółowym, zawieszony osad jest inkubowany w zoptymalizowanych buforach z proteinazą K (PK) w celu wytrawienia białek. W celu zhomogenizowania lizatu komórkowego i usunięcia pozostałości komórek wykonywany jest dodatkowy etap wirowania przez kolumnę wirówkową PAXgene Shredder (PSC), a supernatant frakcji, która przepłynęła przez kolumnę, jest przenoszony do świeżej próbki mikrowirówkowej (MCT). W celu dostosowania warunków wiązania dodawany jest etanol, a lizat jest наносzony na kolumnę wirówkową PAXgene RNA (PRC). Podczas krótkiego wirowania RNA selektywnie wiąże się do membrany krzemionkowej PAXgene, a zanieczyszczenia przepływają przez kolumnę. Pozostałe zanieczyszczenia są usuwane w kilku wydajnych etapach płukania. Między pierwszym a drugim etapem płukania membrana jest poddawana działaniu DNazy I (RNFD) w celu usunięcia śladowych ilości związanego DNA. Po etapach płukania RNA jest eluowany za pomocą buforu do elucji (BR5) i poddawany denaturacji cieplnej. Parametry skuteczności ręcznej izolacji RNA wykonywanej przy użyciu systemu PAXgene Blood RNA System można znaleźć na stronie 49.



Ryc. 1: Ręczna procedura PAXgene Blood RNA.

Zautomatyzowana izolacja RNA

Izolacja RNA z krwi odbywa się w sposób zautomatyzowany w aparacie QIAGEN QIAcube Connect MDx. Innowacyjny aparat wykorzystuje zaawansowaną technologię do przetwarzania kolumn wirówkowych QIAGEN, umożliwiając płynną integrację niskoprzepustowego, zautomatyzowanego przygotowywania próbek z pracą laboratoryjną. Przygotowanie próbek za pomocą aparatu QIAcube Connect MDx obejmuje te same etapy co procedura ręczna (tzn. liżę, wiązanie, płukanie i elucję). Do przygotowania próbek można użyć tego samego zestawu PAXgene Blood RNA Kit.

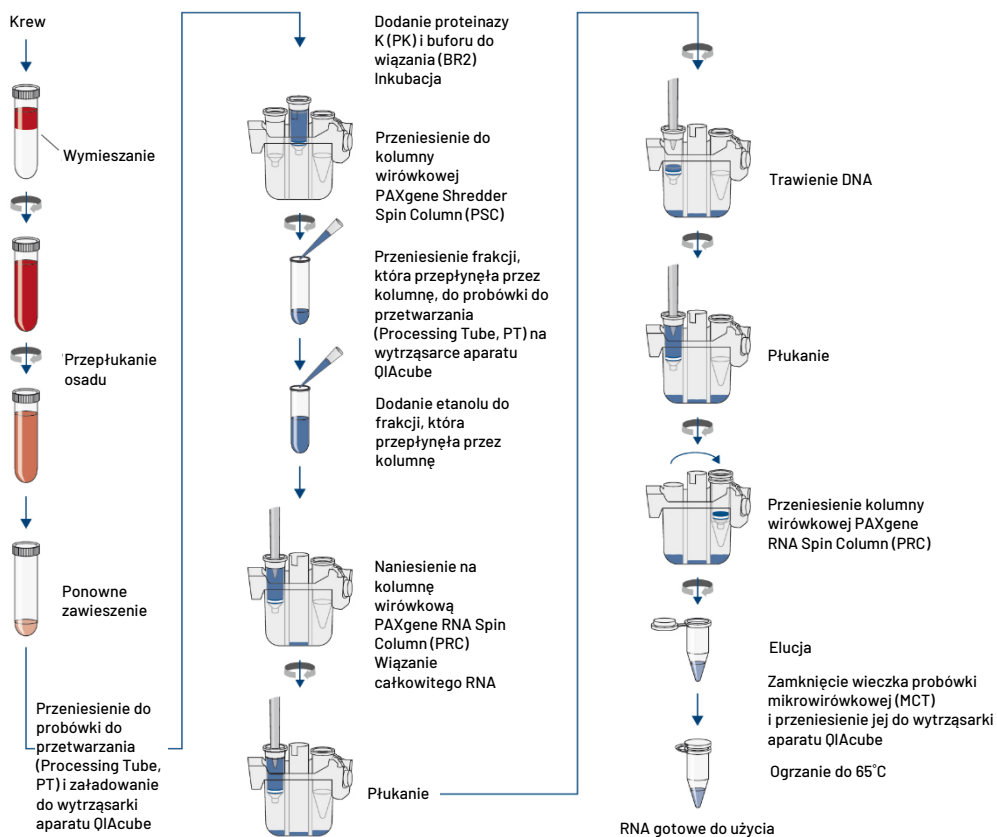


Ryc. 2: QIAcube Connect MDx.



Aparat QIAGEN QIAcube Connect MDx nie jest dostępny we wszystkich krajach. Aby uzyskać więcej informacji, należy skontaktować się z serwisem technicznym firmy QIAGEN.

Zautomatyzowany protokół izolacji RNA składa się z 2 części (lub protokołów), „PAXgene Blood RNA Part A” (PAXgene Blood RNA – część A) (protokół obejmujący kroki od pobrania próbki krwi do próbówki PAXgene Blood RNA Tube do elucji) i „PAXgene Blood RNA Part B” (PAXgene Blood RNA – część B) (protokół obejmujący kroki po elucji do uzyskania RNA gotowego do użycia), między którymi wymagane jest wykonanie krótkich czynności ręcznych (patrz Ryc. 3).




Ryc. 3: Zautomatyzowana procedura PAXgene Blood RNA.

Odwirowany, przepłukany i ponownie zawieszony osad kwasu nukleinowego (patrz „Izolacja RNA”, strona 8) jest przenoszony z probówki PAXgene Blood RNA Tube (BRT) do probówek do przetwarzania (PT), które są umieszczane w module wytrząsarki termicznej na stole roboczym aparatu QIAcube Connect MDx. Operator wybiera i uruchamia protokół „PAXgene Blood RNA Part A” (PAXgene Blood RNA – część A) z menu. Aparat QIAcube Connect MDx wykonuje etapy protokołu aż do etapu elucji RNA w buforze do elucji (BR5). Operator przenosi probówki MCT zawierające oczyszczony RNA do modułu wytrząsarki termicznej aparatu QIAcube Connect MDx. Operator wybiera i uruchamia protokół „PAXgene Blood RNA Part B” (PAXgene Blood RNA – część B) z menu, a aparat QIAcube Connect MDx wykonuje denaturację cieplną. Parametry skuteczności zautomatyzowanej izolacji RNA wykonywanej przy użyciu systemu PAXgene Blood RNA System w aparacie QIAcube Connect MDx można znaleźć na stronie 58.

Dostarczone materiały

Zawartość zestawu

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Nr katalogowy			762174
Liczba wyrobów do pobierania próbek			50
Nazwa składnika	Opis	Symbol	Ilość
BR1	Resuspension Buffer (Bufor do przygotowywania zawiesiny)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Bufor do wiązania)*	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (Bufor płuczący 1)*	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate)(Bufor płuczący 2 (koncentrat)) [†]	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Bufor do elucji)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (bottle)(Woda wolna od RNaz (butelka))	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid)(Proteinaza K (zielone wieczko))	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red)(Kolumny wirówkowe PAXgene RNA (czerwone)) [‡]	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (2 mL)(Probówki do przetwarzania (2 ml)) [§]	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard™	Secondary BD Hemogard Closures (Dodatkowe zamknięcia BD Hemogard)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (1.5 mL)(Probówki mikrowirówkowe (1,5 ml)) [§]	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized)(DNaza I, wolna od RNaz (liofilizowana))	DNA REM	1500 jednostek Kunitza [¶]
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid)(Bufor do trawienia DNA (białe wieczko))	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (Bufor do przygotowywania zawiesiny DNazy (probówka, liliowe wieczko))	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (Kolumny wirówkowe PAXgene Shredder (liliowe)) [‡]	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Instrukcja obsługi	PAXgene Blood RNA Kit – Instrukcja obsługi (wersja 3)		1

- * Produkt nie jest zgodny z odczynnikami dezynfekującymi, które zawierają wybielacz. Zawiera sól guanidyny. Patrz strona 19 – Informacje dotyczące bezpieczeństwa.
- [†] Bufor płuczący 2 (BR4) jest dostarczany w postaci koncentratu. Przed pierwszym użyciem dodać 4 objętości etanolu (96-100% o/o, stopień czystości cz.d.a.), zgodnie z instrukcją na butelce, aby uzyskać roztwór roboczy.
- [‡] Każda kolumna jest dostarczana w opakowaniu blistrowym przeznaczonym wyłącznie do jednorazowego użytku. Instrukcje usuwania można znaleźć w części poświęconej informacjom dotyczącym bezpieczeństwa.
- [§] Probówki są dostarczane w torebkach z tworzywa sztucznego; każda probówka jest przeznaczona wyłącznie do jednorazowego użytku. Instrukcje usuwania można znaleźć w części poświęconej informacjom dotyczącym bezpieczeństwa.
- [¶] Jednostki Kunitza to jednostki powszechnie stosowane do pomiaru DNazy I, definiowane jako ilość DNazy I, która powoduje wzrost wartości absorbancji A_{260} o 0,001 na minutę na mililitr w temperaturze 25°C, pH 5,0, przy stosowaniu wysoko spolimeryzowanego DNA jako substratu (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* 33, 349 i 363).

Składniki zestawu

Nazwa składnika	Opis	Składnik aktywny	Stężenie
BR1	Resuspension Buffer (Bufor do przygotowywania zawiesiny)	Brak	-
BR2	Binding Buffer (Bufor do wiązania)	Tiocyanian guanidyny	od ≥30 do <50% w/w
BR3	Wash Buffer 1 (Bufor płuczący 1)	Tiocyanian guanidyny Etanol	od ≥10 do <20% w/w od ≥3 do <10% w/w
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) (Bufor płuczący 2 (koncentrat))	Brak	-
BR5	Elution Buffer (Bufor do elucji)	Brak	-
RNFW	RNase-Free Water (bottle)(Woda wolna od RNaz (butelka))	Brak	-
PK	Proteinase K (green lid) (Proteinaza K (zielone wieczko))	Proteinaza K	od ≥1 do <3% w/w
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNaza I, wolna od RNaz (liofilizowana))	DNaza	od ≥90 do ≤100% w/w
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (Bufor do trawienia DNA (białe wieczko))	Brak	-
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid)(Bufor do przygotowywania zawiesiny DNazy (probówka, liliowe wieczko))	Brak	-

Materiały wymagane, ale niedostarczane

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) dostępnymi u producentów poszczególnych produktów.

Dla wszystkich protokołów

- Probówki PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; nr kat. 762165)
- Etanol (96–100% o/o, stopień czystości cz.d.a.)
- Pipety* (10 µl – 4 ml)
- Jałowe końcówki do pipet z barierą aerozolową, wolne od RNaz[†]
- Cylinder miarowy[‡]
- Wirówka* umożliwiająca wirowanie przy 3000–5000 × g wyposażona w rotor z wychylnym koszem na probówki PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Wyrząsarka*
- Kruszony lód
- Marker permanentny do opisywania sprzętu

* Należy upewnić się, że wyroby i aparaty są regularnie sprawdzane, konserwowane i kalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.

[†] Należy upewnić się, że użytkownik zaznajomił się z wytycznymi dotyczącymi postępowania z RNA (Załącznik A, strona 75).

[‡] Potrzebny do dodania etanolu do koncentratu buforu BR4.

Dla protokołu ręcznego

- Mikrowirówka o zmiennej prędkości obrotowej* umożliwiająca wirowanie w zakresie co najmniej 1000–8000 × g, chociaż dopuszczalne są mniejsze i większe wartości siły odśrodkowej (g) (szczegóły zawierają etapy protokołu), wyposażona w rotor dla próbek MCT o pojemności 2 ml
- Wyrzaskarka-inkubator* umożliwiająca inkubację w temperaturze 55°C i 65°C oraz wyrzaskanie przy ≥400 obr./min, bez przekraczania 1400 obr./min (np. Eppendorf® Thermomixer Compact lub równoważne urządzenie)

Dla protokołu zautomatyzowanego

- Nożyczki
- QIAcube Connect MDx* (QIAGEN, nr kat. 9003070)

Materiały eksploatacyjne do aparatu QIAcube Connect MDx:

- Filter-Tips, 1000 µl (1024) (QIAGEN, nr kat. 990352)†
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, nr kat. 990393)†
- Rotor Adapters (10 × 24) (QIAGEN, nr kat. 990394)†

Aksesoria do aparatu QIAcube Connect MDx:

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

* Należy upewnić się, że wyroby i aparat są regularnie sprawdzane, konserwowane i kalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.

† Zawarte również w pakiecie Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, nr kat. 990395).

Pakiety serwisowe do aparatu QIAcube Connect MDx:

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

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Klienci na terenie Unii Europejskiej muszą pamiętać, że wymagane jest zgłaszanie wszelkich poważnych incydentów, które wystąpiły w związku z wyrobem, producentowi oraz właściwemu organowi państwa członkowskiego, którego rezydentem jest użytkownik i/lub pacjent.

Klienci na terenie Unii Europejskiej muszą pamiętać, że może być wymagane zapoznanie się z lokalnymi przepisami dotyczącymi zgłaszania poważnych incydentów, które wystąpiły w związku z wyrobem, producentowi i/lub jego upoważnionemu przedstawicielowi oraz właściwemu organowi państwa, którego rezydentem jest użytkownik i/lub pacjent.

Informacje dotyczące bezpieczeństwa

Podczas pracy ze środkami chemicznymi i materiałami stwarzającymi zagrożenie biologiczne należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe i okulary ochronne. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS). Są one dostępne online w wygodnym i kompaktowym formacie PDF pod adresem **www.qiagen.com/safety**. Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN.

- Wszystkie środki chemiczne i materiały biologiczne są potencjalnie niebezpieczne. Krew i inne próbki są potencjalnie zakaźne i należy je traktować jako materiały stwarzające zagrożenie biologiczne.
- Odpady stwarzające zagrożenie biologiczne i odpady powstałe po użyciu zestawu należy usuwać zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Informacje dotyczące nagłych przypadków

CHEMTREC

Poza Stanami Zjednoczonymi i Kanadą: +1 703-527-3887

Środki ostrożności

Podczas pracy z krwią należy przestrzegać uniwersalnych środków ostrożności w celu uniknięcia ryzyka potencjalnej ekspozycji na patogeny krwiopochodne (np. wirus HIV, wirus zapalenia wątroby typu B i inne wirusy krwiopochodne). W ramach ochrony przed ekspozycją na krew należy nosić rękawiczki, fartuch laboratoryjny, okulary ochronne i inne środki ochrony osobistej, a także wdrożyć techniczne środki kontroli. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS). Są one dostępne online w wygodnym, kompaktowym formacie PDF na stronie www.preanalytix.com, na której można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla tego zestawu.

PRZESTROGA



NIE dolewać wybielacza lub roztworów kwasowych bezpośrednio do odpadów powstałych po przygotowaniu próbek.

Bufor do wiązania (BR2) i bufor płuczący 1 (BR3) zawierają chlorowodorek guanidyny, który może tworzyć wysoce reaktywne związki w połączeniu z wybielaczem. W przypadku rozlania buforu do wiązania (BR2) lub buforu płuczącego 1 (BR3) należy usunąć go za pomocą odpowiedniego detergentu laboratoryjnego i wody. W przypadku rozlania płynu zawierającego czynniki potencjalnie zakaźne należy

wyczyścić zalany obszar najpierw detergentem laboratoryjnym i wodą, a następnie 1-procentowym (o/o) podchlorynem sodu (wybielaczem).

Mieszkankę roztworu do stabilizacji RNA i krwi z probówki PAXgene Blood RNA Tube (BRT) można zdezynfekować, używając 1 objętości dostępnego w handlu roztworu wybielacza (5-procentowy podchloryn sodu) na 9 objętości mieszanki roztworu do stabilizacji RNA i krwi.

Odpady powstałe po przygotowaniu próbek, takie jak supernatanty z etapów wirowania wykonywanych w procedurze izolacji RNA, należy uznawać za materiały potencjalnie zakaźne. Do usuwania materiałów biologicznych należy używać pojemników na odpady stwarzające zagrożenie biologiczne. Materiały należy usuwać zgodnie z lokalnymi przepisami i procedurami obowiązującymi w placówce.

Określone składniki zestawu PAXgene Blood RNA Kit są przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku. Informacje na temat poszczególnych składników można znaleźć w części Zawartość zestawu na stronie 14.

Do składników zestawu PAXgene Blood RNA Kit mają zastosowanie następujące zwroty wskazujące na zagrożenia i określające środki ostrożności. Informacje dotyczące bezpieczeństwa probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zawiera dokument *PAXgene Blood RNA Tube – Instrukcja obsługi*.

Buffer BR2



Zawiera: tiocyjanian guanidyny. Niebezpieczeństwo! Działa szkodliwie po połyknięciu. Może działać szkodliwie w kontakcie ze skórą lub w przypadku wdychania. Powoduje poważne uszkodzenie oczu. Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy. Unikać uwalniania do środowiska. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są założone i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. W PRZYPADKU narażenia lub problemów: Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub lekarzem. Zawartość/pojemnik należy utylizować w zatwierdzonym zakładzie przetwarzania odpadów.

Buffer BR3



Zawiera: etanol; tiocyjanian guanidyny. Niebezpieczeństwo! Łatwopalna ciecz i opary. Powoduje poważne uszkodzenie oczu. W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy. Trzymać z dala od źródeł ciepła/iskier/otwartego ognia/gorących powierzchni. Nie palić papierosów. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są założone i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub lekarzem.

DNase I



Zawiera: DNazę. Niebezpieczeństwo! Może powodować reakcję alergiczną skóry. Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania. Unikać wdychania pyłu. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. Stosować indywidualne środki ochrony dróg oddechowych. W PRZYPADKU narażenia lub problemów: Skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub z lekarzem. Wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania. Wyprać zanieczyszczoną odzież przed ponownym użyciem.

Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami

Kolumny wirówkowe PAXgene RNA (PRC), kolumny wirówkowe PAXgene Shredder (PSC), proteinazę K (PK) i bufor (BR1, BR2, BR3, BR4 i BR5) należy przechowywać w suchym miejscu w temperaturze określonej na etykiecie zestawu.

Zestaw RNase-Free DNase Set, który zawiera DNazę I (RNFD), bufor do trawienia DNA (RDD) i bufor do przygotowania zawiesiny DNazy (DRB), jest transportowany w temperaturze otoczenia. Niezwłocznie po otrzymaniu zestawu DNazy wolnej od RNaz należy go umieścić w temperaturze określonej na etykiecie. Zestaw zachowuje stabilność do daty ważności określonej na opakowaniu zestawu, jeśli jest przechowywany w odpowiednich warunkach.

Należy zwrócić uwagę na daty ważności oraz informacje o warunkach przechowywania wydrukowane na opakowaniu i etykietach wszystkich składników. Nie należy używać składników z przekroczonym terminem ważności ani niewłaściwie przechowywanych.

Stabilność w trakcie użytkowania

Po pierwszym użyciu zestawu odczynniki zachowują stabilność do daty ważności podanej na etykiecie dostępnej na opakowaniu zestawu, o ile są przechowywane we wskazanych temperaturach i w oryginalnych butelkach.

Odczynniki, którymi napełniono butelki na odczynniki aparatu QIAcube Connect MDx, zachowują stabilność przez 3 miesiące w przypadku przechowywania ich w temperaturze pokojowej (15–25°C).

Zrekonstruowana DNaza I (RNFD) zachowuje stabilność przez 6 tygodni pod warunkiem przechowywania jej w temperaturze 2–8°C w oryginalnej szklanej fiolce (roztwór podstawowy).

Przeznaczone do jednorazowego użytku porcje roztworu podstawowego w probówkach MCT o pojemności 1,5 ml (dostarczanych z zestawem) zachowują stabilność przez 9 miesięcy, o ile są przechowywane w temperaturze -20°C. Po rozmrożeniu porcje przeznaczone do jednorazowego użytku zachowują stabilność przez 6 tygodni, o ile są przechowywane w temperaturze 2–8°C.

Pobieranie, przechowywanie i sposób postępowania z próbkami

Zestaw PAXgene Blood RNA Kit jest przeznaczony do użytku z próbkami krwi pobranymi do probówek PAXgene Blood RNA Tubes. Krew należy pobrać do probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zgodnie z instrukcjami zawartymi w dokumencie PAXgene Blood RNA Tube – Instrukcja obsługi. W razie potrzeby można zapoznać się z zaleceniami dotyczącymi postępowania z probówkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) przedstawionymi w Załączniku C (strona 85). Wszystkie próbki należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny. Parametry skuteczności systemu PAXgene Blood RNA System ustalono wyłącznie za pomocą transkryptów genów FOS i IL1B. Parametry opisano na stronach 45–48.

Protokół: ręczna izolacja całkowitego RNA z ludzkiej krwi pełnej pobranej do probówek PAXgene Blood RNA Tubes

Ważne informacje przed rozpoczęciem procedury

- Upewnić się, że opakowanie zestawu jest nienaruszone i nieuszkodzone, a żaden z buforów nie wyciekł. Nie używać zestawu, który jest uszkodzony.
- Podczas używania pipety należy upewnić się, że nastawiono ją na odpowiednią objętość, a aspiracja i dozowanie płynu są wykonywane ostrożnie – cała objętość płynu jest pobierana do pipety i wypuszczana z niej.
- Aby uniknąć przenoszenia próbek do nieprawidłowych probówek lub kolumn wirówkowych, należy upewnić się, że wszystkie probówki i kolumny wirówkowe zostały prawidłowo opisane markerem permanentnym. Opisać wieczko i boczną część każdej probówki (PT, MCT). W przypadku kolumny wirówkowej opisać boczną część powiązanej z nią probówki PT. Po przeniesieniu płynu do probówki lub kolumny wirówkowej należy ją zamknąć.
- Rozlanie próbek i buforów podczas procedury może spowodować obniżenie uzysku i jakości RNA.
- Wszystkie etapy tego protokołu, w tym etapy wirowania, należy wykonywać w temperaturze pokojowej (15–25°C), o ile nie określono inaczej.

Z powodu czułości technologii amplifikacji kwasu nukleinowego podczas postępowania z próbkami konieczne jest podjęcie następujących środków ostrożności w celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego:

- Ostrożnie nanosić próbkę na kolumnę wirówkową (PSC, PRC) za pomocą pipety, bez zamaczania brzegu kolumny.
- Należy zawsze zmieniać końcówki do pipet pomiędzy przenoszeniami płynów. Używać końcówek do pipet z barierą aerozolową.

- Unikać dotykania membrany kolumny wirówkowej (PSC, PRC) końcówką do pipety.
- Po wytrząsaniu lub ogrzewaniu próbki MCT krótko odwirować kolumnę, aby usunąć krople z wnętrza wieczka.
- Przez cały czas przeprowadzania procedury nosić rękawiczki. W przypadku styczności rękawiczek z próbką natychmiast zmienić rękawiczki.
- Przed umieszczeniem kolumny wirówkowej (PSC, PRC) w mikrowirówce należy ją zamknąć. Odwirować w sposób opisany w procedurze.
- Otwierać tylko jedną kolumnę wirówkową (PSC, PRC) naraz i zachować ostrożność, aby uniknąć wytwarzania aerozoli.
- W celu wydajnego równoległego przetwarzania wielu próbek należy napełnić statyw próbkami PT, do których będzie można przenieść kolumny wirówkowe (PSC, PRC) po wirowaniu. Wyrzucić zużyte próbki PT zawierające płyn, który przepłynął przez kolumnę, a następnie umieścić kolumny wirówkowe (PRC, PSC) w nowych próbkach PT przed przeniesieniem ich z powrotem do mikrowirówki.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem procedury

- Krew należy pobrać do próbek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zgodnie z instrukcjami zawartymi w dokumencie *PAXgene Blood RNA Tube – Instrukcja obsługi*. W razie potrzeby można zapoznać się z zaleceniami dotyczącymi postępowania z próbkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) przedstawionymi w Załączniku C (strona 85).

- Aby zapewnić całkowitą lizę krwinek i precipitację RNA, należy upewnić się, że po pobraniu krwi próbówki PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) są inkubowane przez co najmniej 2 godziny w temperaturze pokojowej. Inkubacja próbówki PAXgene Blood RNA Tube (BRT) przez noc może spowodować zwiększenie uzysku. Jeśli przed przeniesieniem próbówki do miejsca przechowywania w temperaturze 2–8°C, –20°C lub –70°C krew nie była poddana inkubacji wstępnej przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, przed rozpoczęciem procedury należy doprowadzić próbówkę PAXgene Blood RNA Tube (BRT) do temperatury pokojowej, a następnie inkubować ją w tej temperaturze przez 2 godziny.
- Przeczytać informacje dotyczące bezpieczeństwa na stronie 19.
- Przeczytać wytyczne dotyczące postępowania z RNA (Załącznik A, strona 81).
- Upewnić się, że wyroby i aparaty, takie jak pipety i wytrząsarka-inkubator, były regularnie sprawdzane i kalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.
- Wytrząsarki-inkubatora używa się na etapach 5 i 20. Nastawić temperaturę wytrząsarki-inkubatora na 55°C.
- Podczas przechowywania buforu do wiązania (BR2) może wytrącić się precipitat. W razie potrzeby ogrzać bufor do temperatury 37°C, aby rozpuścić osad.
- Bufor płuczający 2 (BR4) jest dostarczany w postaci koncentratu. Przed pierwszym użyciem dodać 4 objętości etanolu (96–100% o/o, stopień czystości cz.d.a.), zgodnie z instrukcją na butelce, aby uzyskać roztwór roboczy.

- W przypadku używania zestawu RNase-Free DNase Set po raz pierwszy należy przygotować roztwór podstawowy DNazy I. Rozpuścić DNazę I w postaci stałej (RNFD; 1500 jednostek Kunitza)* w 550 µl buforu do przygotowywania zawiesiny DNazy (DRB) dostarczonego z zestawem. Uważać, aby nie rozsypać DNazy I (RNFD) podczas otwierania fiolki. Nie wytrząsać zrekonstruowanej DNazy I (RNFD). DNaza I jest szczególnie wrażliwa na denaturację fizyczną. Mieszanie należy wykonywać jedynie poprzez delikatne odwracanie fiolki.
- Zrekonstruowaną DNazę I (RNFD) można przechowywać w temperaturze 2–8°C w oryginalnej szklanej fiolce (roztwór podstawowy) lub w temperaturze –20°C po podzieleniu roztworu podstawowego ze szklanej fiolki na porcje przeznaczone do jednorazowego użytku (w tym celu należy użyć dostarczanych z zestawem probówek MCT o pojemności 1,5 ml; dostarczana liczba probówek umożliwia wykonanie 5 porcji). Rozmrożone porcje można przechowywać w temperaturze 2–8°C. Rozmrożonych porcji nie należy zamrażać ponownie.
- Należy upewnić się, że podczas rekonstrukcji i rozdzielania na porcje roztworu DNazy I (RNFD) przestrzegane są wytyczne dotyczące postępowania z RNA (Załącznik A, strona 81).

Procedura

1. Wirować probówkę PAXgene Blood RNA Tube (BRT) przez 10 min przy 3000–5000 × g, używając rotora z wychylnym koszem.



Aby zapewnić całkowitą lizę krwinek i precypitację RNA, należy upewnić się, że próbka krwi była inkubowana w probówce PAXgene Blood RNA Tube (BRT) przez co najmniej 2 godziny w temperaturze pokojowej (15–25°C).

* Jednostki Kunitza to jednostki powszechnie stosowane do pomiaru DNazy I, definiowane jako ilość DNazy I, która powoduje wzrost wartości absorbancji A_{260} o 0,001 na minutę na mililitr w temperaturze 25°C, pH 5,0, przy stosowaniu wysoko spolimeryzowanego DNA jako substratu (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 i 363).



W rotorze muszą znajdować się adaptery do probówek o okrągłym dnie. W przypadku użycia innych typów adapterów do probówek może dojść do pęknięcia probówek podczas wirowania.

2. Usunąć supernatant poprzez dekantację lub za pomocą pipety. Dodać 4 ml wody wolnej od RNaz (RNFW) do osadu, a następnie zamknąć probówkę, używając nowego dodatkowego zamknięcia BD Hemogard (dostarczone z zestawem).

W przypadku dekantacji supernatantu należy uważać, aby nie naruszyć osadu, i należy osuszyć brzeg probówki czystym ręcznikiem papierowym.

3. Wytrząsać do momentu, gdy widoczne będzie rozpuszczenie osadu, a następnie wirować przez 10 min przy $3000\text{--}5000 \times g$, używając rotora z wychylnym koszem. Usunąć i wyrzucić cały supernatant.

Niewielka ilość nierozpuszczonego osadu w supernatancie obecna po worteksowaniu, ale przed wirowaniem, nie zakłóci procedury.



Niecałkowite usunięcie supernatantu doprowadzi do inhibicji lizy i rozcieńczenia lizatu, co spowoduje zakłócenie warunków wiązania RNA do membrany PAXgene.

4. Dodać 350 μl buforu do przygotowywania zawiesiny (BR1) i wytrząsać do momentu, gdy widoczne będzie rozpuszczenie osadu.
5. Za pomocą pipety przenieść próbkę do probówki MCT o pojemności 1,5 ml. Dodać 300 μl buforu do wiązania (BR2) i 40 μl proteiny K (PK). Wymieszać, wytrząsając przez 5 s, a następnie inkubować przez 10 min w temperaturze 55°C przy 400–1400 obr./min, używając wytrząsarki-inkubatora. Po inkubacji nastawić temperaturę wytrząsarki-inkubatora na 65°C (do etapu 20).



Nie mieszać buforu do wiązania (BR2) i proteiny K (PK) przed dodaniem ich do próbki.

6. Za pomocą pipety nanieść lizat bezpośrednio na kolumnę PSC (kolor liliowy) umieszczoną w probówce PT o pojemności 2 ml, a następnie wirować przez 3 min przy maksymalnej prędkości (ale nie przekraczając siły odśrodkowej $20\,000 \times g$).



Ostrożnie nanieść lizat na kolumnę wirówkową (PSC) za pomocą pipety, a następnie wzrokowo sprawdzić, czy cały lizat został przeniesiony na kolumnę wirówkową (PSC).

Aby uniknąć uszkodzenia kolumn (PSC) i próbek (PT), nie należy przekraczać siły odśrodkowej $20\ 000 \times g$.



Niektóre próbki mogą przepłynąć przez kolumnę PSC bez wirowania. Jest to spowodowane niską lepkością próbek i nie należy tego uznawać za oznakę nieprawidłowego działania produktu.

7. Ostrożnie przenieść cały supernatant frakcji, która przepłynęła przez kolumnę, do nowej próbki MCT o pojemności 1,5 ml, nie naruszając osadu w próbce PT.
8. Dodać 350 μ l etanolu (96–100% o/o, stopień czystości cz.d.a.). Wymieszać, wytrząsając, a następnie krótko odwirować (1–2 s przy $500\text{--}1000 \times g$), aby usunąć krople z wnętrza wieczka.



Wirowanie nie może trwać dłużej niż 1–2 s, gdyż wirowanie przez dłuższy czas mogłoby doprowadzić do osadzenia kwasów nukleinowych i zmniejszenia uzysku całkowitego RNA.

9. Za pomocą pipety nanieść 700 μ l próbki na kolumnę PRC (kolor czerwony) umieszczoną w próbce PT o pojemności 2 ml, a następnie wirować przez 1 min przy $8000\text{--}20\ 000 \times g$. Umieścić kolumnę wirówkową (PRC) w nowej próbce PT o pojemności 2 ml i wyrzucić starą próbkę PT zawierającą frakcję, która przepłynęła przez kolumnę.
10. Za pomocą pipety nanieść pozostałą objętość próbki na kolumnę PRC, a następnie wirować przez 1 min przy $8000\text{--}20\ 000 \times g$. Umieścić kolumnę wirówkową (PRC) w nowej próbce PT o pojemności 2 ml i wyrzucić starą próbkę PT zawierającą frakcję, która przepłynęła przez kolumnę.



Ostrożnie nanieść próbkę na kolumnę wirówkową (PRC) za pomocą pipety, a następnie wzrokowo sprawdzić, czy cała próbka została przeniesiona na kolumnę wirówkową (PRC).

11. Za pomocą pipety nanieść 350 µl buforu płuczającego 1 (BR3) na kolumnę PRC. Wirować przez 1 min przy 8000–20 000 × g. Umieścić kolumnę wirówkową (PRC) w nowej probówce PT o pojemności 2 ml i wyrzucić starą probówkę PT zawierającą frakcję, która przepłynęła przez kolumnę.
12. Dodać 10 µl roztworu podstawowego DNazy I (RNFD) do 70 µl buforu do trawienia DNA (RDD) w probówce MCT o pojemności 1,5 ml. Wymieszać, delikatnie ostukując probówkę, a następnie krótko odwirować, aby zebrać pozostałości płynu ze ścianek próbówki.

W przypadku przetwarzania na przykład 10 próbek dodać 100 µl roztworu podstawowego DNazy I (RNFD) do 700 µl buforu do trawienia DNA (RDD). Używać probówek MCT o pojemności 1,5 ml dostarczonych z tym zestawem.



DNaza I jest szczególnie wrażliwa na denaturację fizyczną. Mieszanie należy wykonywać jedynie poprzez delikatne ostukiwanie próbówki. Nie wytrząsać.

13. Za pomocą pipety nanieść mieszaninę inkubacyjną DNazy I (RNFD) (80 µl) bezpośrednio na membranę kolumny PRC i pozostawić na stole roboczym (20–30°C) na 15 min.



Upewnić się, że mieszanina inkubacyjna DNazy I (RNFD) została naniesiona bezpośrednio na membranę. Trawienie DNaz będzie niecałkowite, jeśli część mieszaniny zostanie naniesiona na ścianki lub pierścień O-ring kolumny wirówkowej (PRC) i pozostanie na nim.

14. Za pomocą pipety nanieść 350 µl buforu płuczającego 1 (BR3) na kolumnę PRC, a następnie wirować przez 1 min przy 8000–20 000 × g. Umieścić kolumnę wirówkową (PRC) w nowej probówce PT o pojemności 2 ml i wyrzucić starą probówkę PT zawierającą frakcję, która przepłynęła przez kolumnę.
15. Za pomocą pipety nanieść 500 µl buforu płuczającego 2 (BR4) na kolumnę PRC, a następnie wirować przez 1 min przy 8000–20 000 × g. Umieścić kolumnę wirówkową (PRC) w nowej probówce PT o pojemności 2 ml i wyrzucić starą probówkę PT zawierającą frakcję, która przepłynęła przez kolumnę.



Bufor płuczący 2 (BR4) jest dostarczany w postaci koncentratu. Przed użyciem upewnić się, że do buforu płuczącego 2 (BR4) dodano etanol (patrz „Czynności do wykonania przed rozpoczęciem procedury”, strona 27).

16. Nanieść kolejne 500 µl buforu płuczącego 2 (BR4) na kolumnę PRC. Wirować przez 3 min przy $8000\text{--}20\,000 \times g$.
17. Wyrzucić próbkę PT zawierającą frakcję, która przepłynęła przez kolumnę, i umieścić kolumnę PRC w nowej próbce PT o pojemności 2 ml. Wirować przez 1 min przy $8000\text{--}20\,000 \times g$.
18. Wyrzucić próbkę PT zawierającą frakcję, która przepłynęła przez kolumnę. Umieścić kolumnę PRC w próbce MCT o pojemności 1,5 ml, a następnie za pomocą pipety nanieść 40 µl buforu do elucji (BR5) bezpośrednio na membranę kolumny PRC. Wirować przez 1 min przy $8000\text{--}20\,000 \times g$ w celu elucji RNA. W celu osiągnięcia maksymalnej wydajności elucji istotne jest, aby zwilżyć całą membranę buforem do elucji (BR5).
19. Powtórzyć etap elucji (etap 18) w opisany sposób, używając 40 µl buforu do elucji (BR5) i tej samej próbki MCT.
20. Inkubować eluat przez 5 min w temperaturze 65°C w wytrząsarce-inkubatorze (z etapu 5) bez wytrząsania. Po inkubacji niezwłocznie schłodzić na lodzie.



Ta inkubacja próbek w temperaturze 65°C powoduje denaturację RNA do dalszych zastosowań. Etapu tego nie należy pomijać nawet jeśli w dalszych zastosowaniach uwzględniony jest etap denaturacji cieplnej. Dostateczny stopień denaturacji RNA na tym etapie ma kluczowe znaczenie dla uzyskania maksymalnej wydajności w dalszych zastosowaniach.

Nie przekraczać czasu lub temperatury inkubacji.

21. Jeśli próbki RNA nie będą od razu wykorzystywane, należy przechowywać je w temperaturze -20°C lub -70°C .

Ze względu na to, że po cyklach zamrażania i rozmrażania RNA pozostaje w postaci zdenaturowanej, nie jest konieczne powtarzanie inkubacji w temperaturze 65°C . W przypadku używania próbek RNA w oznaczeniu diagnostycznym należy postępować zgodnie z instrukcjami dostarczonymi przez producenta.

W celu dokładnego oznaczenia ilościowego RNA poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm zalecamy rozcieńczenie próbek buforem Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5.* Rozcieńczenie próbki w wodzie wolnej od RNaz może spowodować otrzymanie nieprawidłowo niskich wartości.

Wyzerować spektrofotometr za pomocą próby ślepej zawierającej bufor do elucji (BR5) i bufor Tris-HCl w takim samym stosunku jak w mierzonych próbkach. Bufor do elucji (BR5) charakteryzuje się wysoką absorbancją przy długości fali 220 nm, co, w przypadku nieprawidłowego wyzerowania spektrofotometru, może spowodować otrzymanie wysokiego poziomu absorbancji tła.



W celu oznaczenia ilościowego w buforze Tris-HCl należy skorzystać z zależności $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Patrz Załącznik B, strona 83.

22. Zamknąć wszystkie butelki zawierające bufor i wodę wolną od RNaz, fiołki i próbki zawierające enzymy i bufor dla enzymów oraz torebki zawierające materiały z tworzywa sztucznego z zestawu używanego do wykonania protokołu. Przechowywać pozostałe składniki zestawu zgodnie z informacjami podanymi w częściach „Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami” (strona 24) i „Stabilność w trakcie użytkowania” (strona 24) do momentu, gdy będą potrzebne.

* Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) dostępnymi u producentów poszczególnych produktów.

Protokół: zautomatyzowana izolacja całkowitego RNA z ludzkiej krwi pełnej pobranej do probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Ważne informacje przed rozpoczęciem procedury

- Upewnić się, że opakowanie zestawu jest nienaruszone i nieuszkodzone, a żaden z buforów nie wyciekł. Nie używać zestawu, który jest uszkodzony.
- Podczas używania pipety należy upewnić się, że nastawiono ją na odpowiednią objętość, a aspiracja i dozowanie płynu są wykonywane ostrożnie – cała objętość płynu jest pobierana do pipety i wypuszczana z niej.
- Aby uniknąć przenoszenia próbek do nieprawidłowych probówek i sprzętu wykonanego z tworzywa sztucznego, należy upewnić się, że wszystkie probówki PT, probówki MCT i adaptery rotora zostały prawidłowo opisane markerem permanentnym. Opisać wieczko i boczną część każdej probówki MCT, boczną część każdej probówki PT i zewnętrzną ściankę każdego adaptera rotora.
- Rozlanie próbek i buforów podczas procedury może spowodować obniżenie uzysku i jakości RNA.
- Wszystkie etapy tego protokołu, w tym etapy wirowania, należy wykonywać w temperaturze pokojowej (15–25°C), o ile nie określono inaczej.

Z powodu czułości technologii amplifikacji kwasu nukleinowego podczas postępowania z próbkami konieczne jest podjęcie następujących środków ostrożności w celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego:

- Za pomocą pipety ostrożnie przenieść próbkę na dno probówki PT, bez zamaczania brzegu probówki.
- Należy zawsze zmieniać końcówki do pipet pomiędzy przenoszeniami płynów. Używać końcówek do pipet z barierą aerozolową.

- Unikać dotykania membrany kolumny wirówkowej (PSC, PRC) końcówką do pipety.
- Po wytrząsaniu lub ogrzewaniu próbki MCT krótko odwirować kolumnę, aby usunąć krople z wnętrza wieczka.
- Przez cały czas przeprowadzania procedury nosić rękawiczki. W przypadku styczności rękawiczek z próbką natychmiast zmienić rękawiczki.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem procedury

- Krew należy pobrać do próbek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zgodnie z instrukcjami zawartymi w dokumencie *PAXgene Blood RNA Tube – Instrukcja obsługi*. W razie potrzeby można zapoznać się z zaleceniami dotyczącymi postępowania z próbkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) przedstawionymi w Załączniku C (strona 85).
- Aby zapewnić całkowitą lizę krwinek i precypitację RNA, należy upewnić się, że po pobraniu krwi próbki PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) są inkubowane przez co najmniej 2 godziny w temperaturze pokojowej. Inkubacja próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT) przez noc może spowodować zwiększenie uzysku. Jeśli po pobraniu krwi próbka PAXgene Blood RNA Tube (BRT) była przechowywana w temperaturze 2–8°C, –20°C lub –70°C, przed rozpoczęciem procedury należy doprowadzić ją do temperatury pokojowej, a następnie przechowywać ją w temperaturze pokojowej przez 2 godziny.
- Przeczytać informacje dotyczące bezpieczeństwa na stronie 19.
- Należy zapoznać się z zawartością części „Ważne uwagi” na stronie 62.
- Przeczytać wytyczne dotyczące postępowania z RNA (Załącznik A, strona 81).
- Przeczytać podręcznik użytkownika aparatu QIAcube Connect MDx i wszelkie dodatkowe informacje dostarczone z aparatem, zwracając szczególną uwagę na informacje dotyczące bezpieczeństwa.

- Należy dopilnować, aby wyroby i aparaty, takie jak pipety oraz aparat QIAcube Connect MDx, były regularnie sprawdzane i kalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.
- Podczas przechowywania buforu do wiązania (BR2) może wytrącić się precypitat. W razie potrzeby ogrzać bufor do temperatury 37°C, aby rozpuścić osad.
- Bufor płuczający 2 (BR4) jest dostarczany w postaci koncentratu. Przed pierwszym użyciem dodać odpowiednią objętość etanolu (96–100% o/o, stopień czystości cz.d.a.), zgodnie z instrukcją na butelce, aby uzyskać roztwór roboczy.
- W przypadku używania zestawu RNase-Free DNase Set po raz pierwszy należy przygotować roztwór podstawowy DNazy I. Rozpuścić DNazę I w postaci stałej (RNFD; 1500 jednostek Kunitza)* w 550 µl buforu do przygotowywania zawiesiny DNazy (DRB) dostarczonego z zestawem. Uważać, aby nie rozsypać DNazy I (RNFD) podczas otwierania fiolki. Nie wytrząsać zrekonstruowanej DNazy I (RNFD). DNaza I jest szczególnie wrażliwa na denaturację fizyczną. Mieszanie należy wykonywać jedynie poprzez delikatne odwracanie fiolki.
- Zrekonstruowaną DNazę I (RNFD) można przechowywać w temperaturze 2–8°C w oryginalnej szklanej fiolce (roztwór podstawowy) lub w temperaturze -20°C po podzieleniu roztworu podstawowego ze szklanej fiolki na porcje przeznaczone do jednorazowego użytku (w tym celu należy użyć dostarczanych z zestawem probówek MCT o pojemności 1,5 ml; dostarczana liczba probówek umożliwia wykonanie 5 porcji). Rozmrożone porcje można przechowywać w temperaturze 2–8°C. Rozmrożonych porcji nie należy zamrażać ponownie.
- Należy upewnić się, że podczas rekonstrukcji i rozdzielania na porcje roztworu DNazy I (RNFD) przestrzegane są wytyczne dotyczące postępowania z RNA (Załącznik A, strona 81).

* Jednostki Kunitza to jednostki powszechnie stosowane do pomiaru DNazy I, definiowane jako ilość DNazy I, która powoduje wzrost wartości absorbancji A_{260} o 0,001 na minutę na mililitr w temperaturze 25°C, pH 5,0, przy stosowaniu wysoko spolimeryzowanego DNA jako substratu (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 i 363).

- Zamontować odpowiedni adapter wytrząsarki (dostarczany z aparatem QIAcube Connect MDx; używać adaptera dla próbek z zabezpieczeniem typu safe-lock o pojemności 2 ml; oznaczony cyfrą „2”), a następnie umieścić statyw wytrząsarki na adapterze.
- Sprawdzić szufladę Waste (Odpady) i w razie potrzeby opróżnić ją.
- Zainstalować wszelkie powiązane protokoły, jeśli nie wykonano tego wcześniej przy okazji poprzednich cykli roboczych. Aparat QIAcube Connect MDx wymaga pobrania wszystkich protokołów zapisanych w powiązanim pliku zip. Patrz „Instalowanie protokołów w aparacie QIAcube Connect MDx”, strona 64.

Procedura

1. Zamknąć pokrywę aparatu QIAcube Connect MDx, a następnie włączyć aparat, używając przełącznika zasilania (patrz Ryc. 15, strona 63).

Zostanie wyemitowany sygnał dźwiękowy i pojawi się ekran początkowy. Aparat automatycznie wykonuje testy w ramach inicjalizacji.

2. Otworzyć pokrywę aparatu QIAcube Connect MDx, a następnie załadować wymagane odczynniki i sprzęt wykonany z tworzywa sztucznego do aparatu. Patrz „Ładowanie aparatu QIAcube Connect MDx”, strona 65.

W celu zaoszczędzenia czasu ładowanie można wykonywać podczas jednego lub obu 10-minutowych etapów wirowania (etapy 3 i 5) opisanych poniżej.

3. Wirować próbkę PAXgene Blood RNA Tube (BRT) przez 10 min przy 3000–5000 × g, używając rotora z wychylnym koszem.



Aby zapewnić całkowitą lizę krwinek i precypitację RNA, należy upewnić się, że próbka krwi była inkubowana w próbce PAXgene Blood RNA Tube (BRT) przez co najmniej 2 godziny w temperaturze pokojowej (15–25°C).



W rotorze muszą znajdować się adaptory do próbek o okrągłym dnie. W przypadku użycia innych typów adapterów do próbek może dojść do pęknięcia próbek podczas wirowania.

4. Usunąć supernatant poprzez dekantację lub za pomocą pipety. W przypadku dekantacji supernatantu należy uważać, aby nie naruszyć osadu, i należy osuszyć brzeg probówki czystym ręcznikiem papierowym. Dodać 4 ml wody wolnej od RNaz (RNFV) do osadu, a następnie zamknąć probówkę, używając nowego dodatkowego zamknięcia BD Hemogard (dostarczone z zestawem).
5. Wytrząsać do momentu, gdy widoczne będzie rozpuszczenie osadu, a następnie wirować przez 10 min przy $3000\text{--}5000 \times g$, używając rotora z wychylnym koszem. Usunąć i wyrzucić cały supernatant.

Niewielka ilość nierozpuszczonego osadu w supernatancie obecna po worteksowaniu, ale przed wirowaniem, nie zakłóci procedury.



Niecałkowite usunięcie supernatantu doprowadzi do inhibicji lizy i rozcieńczenia lizatu, co spowoduje zakłócenie warunków wiązania RNA do membrany PAXgene.

6. Dodać 350 μl buforu do przygotowywania zawiesiny (BR1) i wytrząsać do momentu, gdy widoczne będzie rozpuszczenie osadu.
7. Za pomocą pipety przenieść próbkę do probówki PT o pojemności 2 ml.



Używać probówek PT o pojemności 2 ml dołączonych do zestawu PAXgene Blood RNA Kit.

8. Załadować otwarte probówki PT zawierające próbki do wytrząsarki aparatu QIAcube Connect MDx (patrz Ryc. 18, strona 67). W celu ułatwienia ładowania ponumerowano pozycje próbek. Włożyć złącza statywu wytrząsarki (dostarczane z aparatem QIAcube Connect MDx) do gniazd znajdujących się przy krawędzi wytrząsarki, obok każdej probówki PT. Umożliwia to detekcję próbek podczas kontroli załadowanych materiałów.



Należy upewnić się, że zamontowano odpowiedni adapter wytrząsarki (adapter wytrząsarki, dla probówek z zabezpieczeniem typu safe-lock o pojemności 2 ml, oznaczony cyfrą „2”, dostarczany z aparatem QIAcube Connect MDx).



W przypadku przetwarzania mniej niż 12 próbek należy upewnić się, że statyw wytrząsarki załadowano w sposób przedstawiony na Ryc. 22, strona 71. Nie można przetwarzać jednej (1) próbki ani 11 próbek. Numery pozycji w statywie wytrząsarki odpowiadają numerom pozycji w wirówce.

9. Zamknąć pokrywę aparatu QIAcube Connect MDx (patrz Ryc. 15, strona 63).

10. Wybrać protokół „PAXgene Blood RNA Part A” (PAXgene Blood RNA – część A) i uruchomić go.

Postępować zgodnie z instrukcjami wyświetlanymi na ekranie dotykowym aparatu QIAcube Connect MDx.



Upewnić się, że w aparacie QIAcube Connect MDx zainstalowano obie części programu (część A i część B) (patrz „Instalowanie protokołów w aparacie QIAcube Connect MDx”, strona 64).



Aparat wykona kontrole załadowanych materiałów dla próbek, końcówek do pipety, adapterów rotora i butelek na odczynniki.

11. Po ukończeniu protokołu „PAXgene Blood RNA Part A” (PAXgene Blood RNA – część A) należy otworzyć pokrywę aparatu QIAcube Connect MDx (patrz Ryc. 15, strona 63). Wyciągnąć kolumny PRC z adapterów rotora i puste próbówki PT z wytrząsarki i wyrzucić je.



Podczas wykonywania programu aparat przenosi kolumny wirówkowe z pozycji 1 adaptera rotora (pozycja L1 wiezka) na pozycję 3 adaptera rotora (pozycja L2 wiezka) (patrz Ryc. 20, strona 69).

12. Zamknąć wiezka wszystkich próbek MCT o pojemności 1,5 ml zawierających oczyszczony RNA w adapterach rotora (pozycja 3, pozycja L3 wiezka, patrz Ryc. 20, strona 69). Przenieść próbki MCT o pojemności 1,5 ml do adaptera wytrząsarki aparatu QIAcube Connect MDx (patrz Ryc. 18, strona 67).

13. Zamknąć pokrywę aparatu QIAcube Connect MDx (patrz Ryc. 15, strona 63).

14. Wybrać protokół „PAXgene Blood RNA Part B” (PAXgene Blood RNA – część B) i uruchomić go.

Postępować zgodnie z instrukcjami wyświetlanymi na ekranie dotykowym aparatu QIAcube Connect MDx.



W trakcie tego programu wykonywana jest inkubacja próbek w temperaturze 65°C, która powoduje denaturację RNA do dalszych zastosowań. Etapu tego nie należy pomijać nawet jeśli w dalszych zastosowaniach uwzględniony jest etap denaturacji cieplnej. Dostateczny stopień denaturacji RNA na tym etapie ma kluczowe znaczenie dla uzyskania maksymalnej wydajności w dalszych zastosowaniach.

15. Po ukończeniu programu „PAXgene Blood RNA Part B” (PAXgene Blood RNA – część B) należy otworzyć pokrywę aparatu QIAcube Connect MDx (patrz Ryc. 15, strona 63). Niezwłocznie umieścić zawierające oczyszczony RNA próbki MCT na lodzie.



OSTRZEŻENIE: Gorąca powierzchnia. Wytrząsarka może osiągnąć temperaturę do 70°C. Unikać kontaktu z gorącą powierzchnią.



Nie pozostawiać oczyszczonego RNA w aparacie QIAcube Connect MDx. Oczyszczony RNA może ulec rozkładowi, gdyż próbki nie są schłodzone. Z tego względu nie jest zalecane przeprowadzanie cykli przygotowań próbek przez noc, bez nadzoru.

16. Jeśli próbki RNA nie będą od razu wykorzystywane, należy przechowywać je w temperaturze –20°C lub –70°C.

Ze względu na to, że po cyklach zamrażania i rozmrażania RNA pozostaje w postaci zdenaturowanej, nie jest konieczne powtarzanie protokołu inkubacji cieplnej („PAXgene Blood RNA Part B”) (PAXgene Blood RNA – część B). W przypadku używania próbek RNA w oznaczeniu diagnostycznym należy postępować zgodnie z instrukcjami dostarczonymi przez producenta.

W celu dokładnego oznaczenia ilościowego RNA poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm zalecamy rozcieńczenie próbek buforem Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5. * Rozcieńczenie próbki w wodzie wolnej od RNaz może spowodować otrzymanie nieprawidłowo niskich wartości.

Wyzerować spektrofotometr za pomocą próby ślepej zawierającej bufor do elucji (BR5) i bufor Tris-HCl w takim samym stosunku jak w mierzonych próbkach. Bufor do elucji (BR5) charakteryzuje się wysoką absorbancją przy długości fali 220 nm, co, w przypadku nieprawidłowego wyzerowania spektrofotometru, może spowodować otrzymanie wysokiego poziomu absorbancji tła.



W celu oznaczenia ilościowego w buforze Tris-HCl należy skorzystać z następującej zależności

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Patrz Załącznik B, strona 83.

17. Wyciągnąć statyw na butelki na odczynniki ze stołu roboczego aparatu QIAcube Connect MDx (patrz Ryc. 18, strona 67), a następnie zamknąć wszystkie butelki na odczynniki odpowiednio oznaczonymi wieczkami. Zamknąć wszystkie butelki zawierające bufor i wodę wolną od RNaz, fiolki i próbówki zawierające enzymy i bufor dla enzymów oraz torebki zawierające materiały z tworzywa sztucznego z zestawu używanego do wykonania protokołu. Przechowywać pozostałe składniki zestawu i butelki na odczynniki zgodnie z informacjami podanymi w częściach „Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikiami” (strona 24) i „Stabilność w trakcie użytkowania” (strona 24) do momentu, gdy będą potrzebne.

Usunąć i wyrzucić pozostałe odczynniki znajdujące się w próbkach PT w gniazdach na próbówki MCT aparatu QIAcube Connect MDx. Wyciągnąć adaptory rotora z wirówki i wyrzucić je. Opróżnić szufladę na odpady aparatu QIAcube Connect MDx (patrz Ryc. 15, strona 63). Zamknąć pokrywę aparatu, a następnie wyłączyć aparat, używając przełącznika zasilania.

* Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) dostępnymi u producentów poszczególnych produktów.

Ograniczenia w zakresie stosowania produktu

Zestaw PAXgene Blood RNA Kit jest przeznaczony do izolacji RNA wewnątrzkomórkowego z ludzkiej krwi pełnej ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocytów/ml) do zastosowań diagnostyki in vitro. Nie jest on przeznaczony do izolacji DNA genomowego lub wirusowych kwasów nukleinowych z ludzkiej krwi pełnej. Ze względu na ograniczoną liczbę transkryptów zwalidowanych pod kątem specyfikacji stabilizacji (transkrypty genów FOS i IL1B) nie określono parametrów skuteczności dla wszystkich transkryptów. W celu określenia, czy konieczne jest przeprowadzenie walidacji dla innych transkryptów, użytkownik powinien dokonać przeglądu danych producenta oraz własnych danych. Składniki tego zestawu są przeznaczone do użycia wyłącznie w ramach protokołu ręcznego i protokołu zautomatyzowanego opisanych w tej instrukcji użycia.

Informacje na temat użycia probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zawiera dokument *PAXgene Blood RNA Tube – Instrukcja obsługi* (PAXgene Blood RNA Tube Handbook).

Kontrola jakości

Zgodnie z poświadczonym certyfikatem ISO systemem zarządzania jakością firmy QIAGEN każda seria zestawu PAXgene Blood RNA Kit jest testowana pod kątem wstępnie ustalonych specyfikacji w celu zapewnienia spójnej jakości produktu.

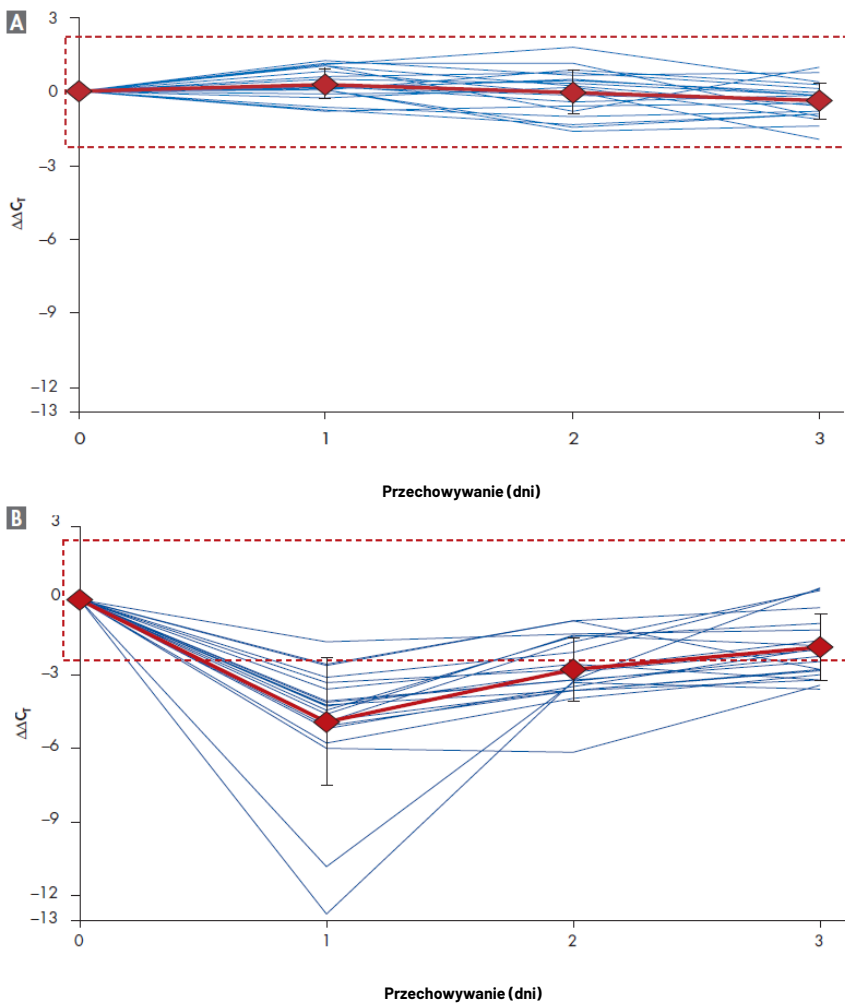
Parametry skuteczności

Pobieranie i stabilizacja próbek

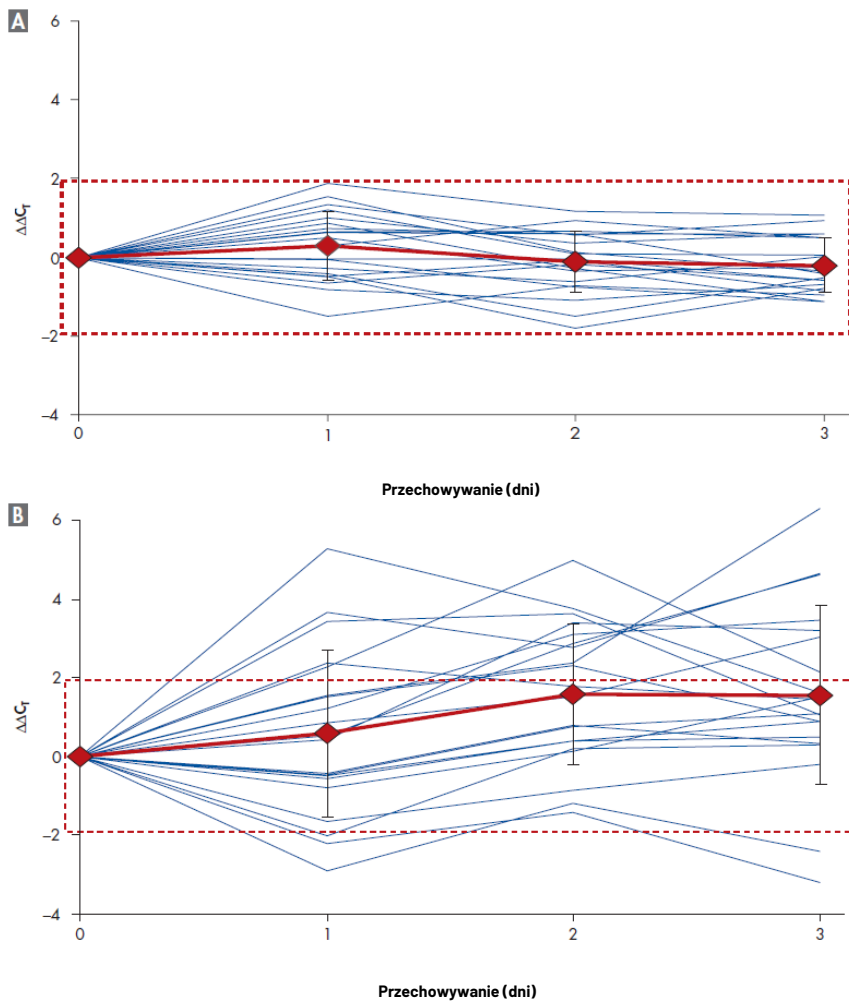
Probówki PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zawierają zastrzeżony odczynnik do stabilizacji RNA. Dodatek ten chroni cząsteczki RNA przed rozkładem przez RNazy i minimalizuje zmiany w ekspresji genów zachodzące pozaustrojowo. Probówki PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) są przeznaczone do pobierania ludzkiej krwi pełnej i stabilizacji RNA komórkowego przez maksymalnie 3 dni w temperaturze 18–25°C (Ryc. 4 i Ryc. 5, strony 45 i 46) lub przez maksymalnie 5 dni w temperaturze 2–8°C (Ryc. 6 i Ryc. 7, strony 47 i 48). Stabilizowaną krew można również przechowywać w postaci zamrożonej. Aktualnie dostępne dane wskazują, że możliwa jest stabilizacja komórkowego RNA przez co najmniej 11 lat w temperaturze -20°C lub -70°C*. Aby uzyskać więcej danych z trwających badań dotyczących oceny stabilności próbek w dłuższej perspektywie czasowej, należy odwiedzić stronę **www.preanalytix.com** lub skontaktować się z działem serwisu technicznego firmy QIAGEN.

Rzeczywisty okres stabilizacji RNA może różnić się w zależności od rodzaju RNA komórkowego i jego dalszego zastosowania. Ze względu na ograniczoną liczbę transkryptów zwalidowanych pod kątem specyfikacji stabilizacji (transkrypty genów FOS i IL1B) nie określono parametrów skuteczności dla wszystkich transkryptów. W celu określenia, czy konieczne jest przeprowadzenie walidacji dla innych transkryptów, użytkownik powinien dokonać przeglądu danych producenta oraz własnych danych.

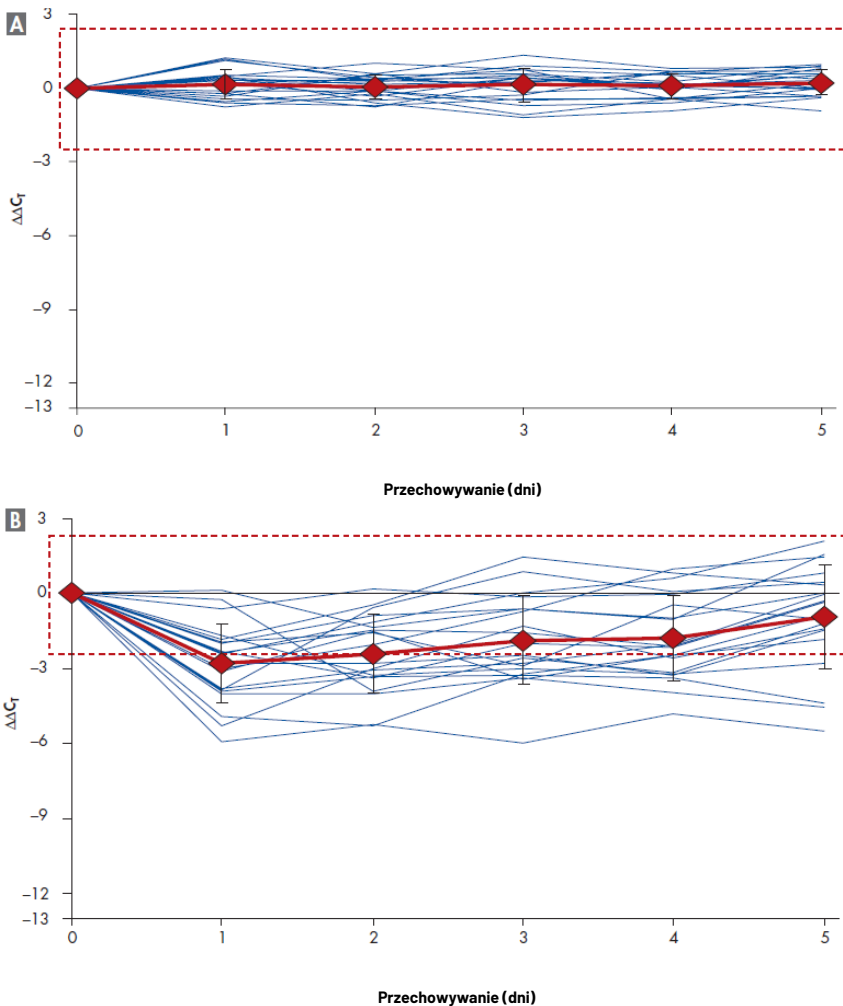
* Obecnie trwa długoterminowe badanie przechowywania krwi w probówkach PAXgene Blood RNA Tubes.



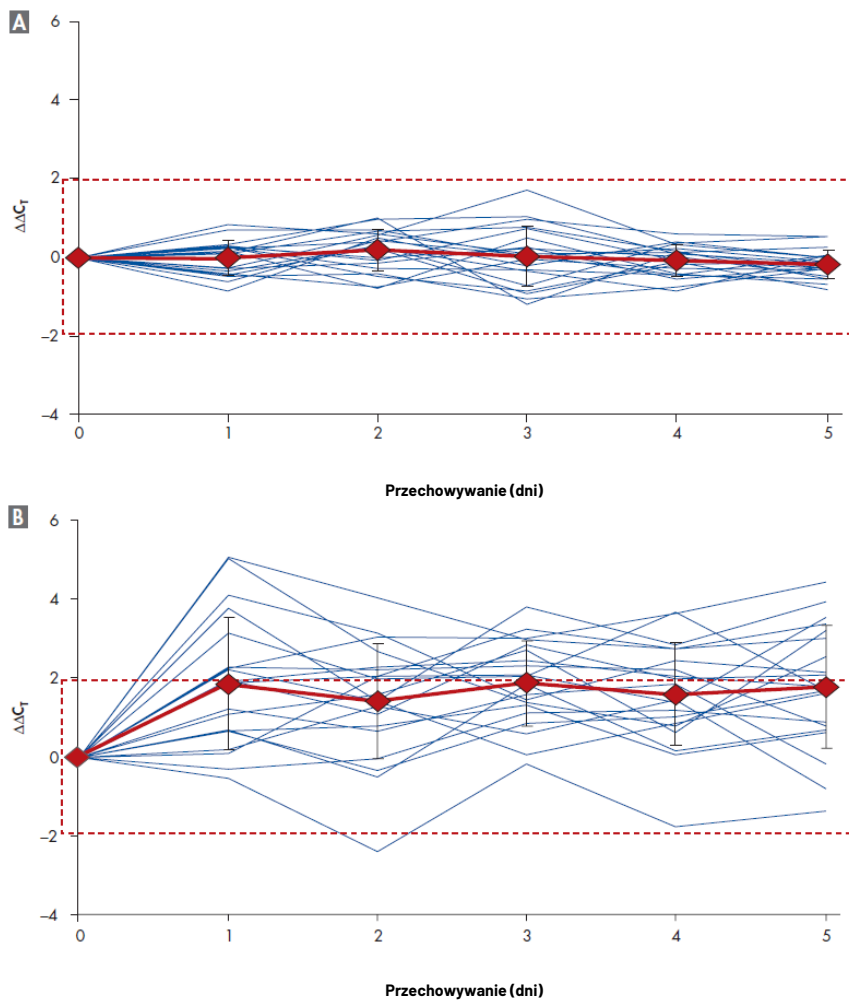
Ryc. 4: Stabilność RNA w próbkach krwi w temperaturze 18–25°C: FOS. Pobrano krew od 10 dawców bez objawów chorobowych i otrzymane próbki przechowywano (w dwóch powtórzeniach) w temperaturze 18–25°C przez wskazaną liczbę dni, po której wykonywano izolację całkowitego RNA. **[A]** Krew pobrano i przechowywano w probówkach PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), a następnie oczyszczono całkowity RNA za pomocą zestawu PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Krew pobrano i przechowywano w standardowych probówkach do pobierania krwi z EDTA jako antykoagulantem, a następnie oczyszczono całkowity RNA, stosując standardową metodę izolacji związków organicznych z oczyszczeniem RNA na membranie krzemionkowej. Względne poziomy transkryptów FOS określono, przeprowadzając reakcję dupleks real-time RT-PCR przy użyciu 18S rRNA jako wzorca wewnętrznego. Wartości dla wszystkich próbek naniesiono na wykres wraz ze średnimi i odchyleniami standardowymi wszystkich próbek. Linie przerywane wskazują $\pm 3 \times$ całkowitą precyzję oznaczenia ($2,34 C_T$).



Ryc. 5: Stabilność RNA w próbkach krwi w temperaturze 18–25°C: IL1B. Pobrano krew i oczyszczono całkowitą RNA po przechowywaniu próbek w temperaturze 18–25°C, zgodnie z opisem na Ryc. 4. Względne poziomy transkryptów IL1B określono, przeprowadzając reakcję dupleks real-time RT-PCR przy użyciu 18S rRNA jako wzorca wewnętrznego. Wartości dla wszystkich próbek naniesiono na wykres wraz ze średnimi i odchyleniami standardowymi wszystkich próbek. Linie przerywane wskazują $\pm 3\times$ całkowitą precyzję oznaczenia (1,93 Ct).



Ryc. 6: Stabilność RNA w próbkach krwi w temperaturze 2–8°C: FOS. Pobrano krew od 10 dawców i otrzymane próbki przechowywano (w dwóch powtórzeniach) w temperaturze 2–8°C przez wskazaną liczbę dni, po której wykonywano izolację całkowitego RNA. **[A]** Krew pobrano i przechowywano w próbkach PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), a następnie oczyszczono całkowity RNA za pomocą zestawu PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Krew pobrano i przechowywano w standardowych próbkach do pobierania krwi z EDTA jako antykoagulantem, a następnie oczyszczono całkowity RNA, stosując standardową metodę izolacji związków organicznych z oczyszczeniem RNA na membranie krzemionkowej. Względne poziomy transkryptów FOS określono, przeprowadzając reakcję dupleks real-time RT-PCR przy użyciu 18S rRNA jako wzorca wewnętrznego. Wartości dla wszystkich próbek naniesiono na wykres wraz ze średnimi i odchyleniami standardowymi wszystkich próbek. Linie przerywane wskazują $\pm 3\times$ całkowitą precyzję oznaczenia (2,34 Ct).



Ryc. 7: Stabilność RNA w próbkach krwi w temperaturze 2–8°C: IL1B. Pobrano krew i oczyszczono całkowitą RNA po przechowywaniu próbek w temperaturze 2–8°C, zgodnie z opisem na Ryc. 6. Względne poziomy transkryptów IL1B określono, przeprowadzając reakcję dupleks real-time RT-PCR przy użyciu 18S rRNA jako wzorca wewnętrznego. Wartości dla wszystkich próbek naniesiono na wykres wraz ze średnimi i odchyleniami standardowymi wszystkich próbek. Linie przerywane wskazują $\pm 3 \times$ całkowitą precyzję oznaczenia (1,93 C_T).

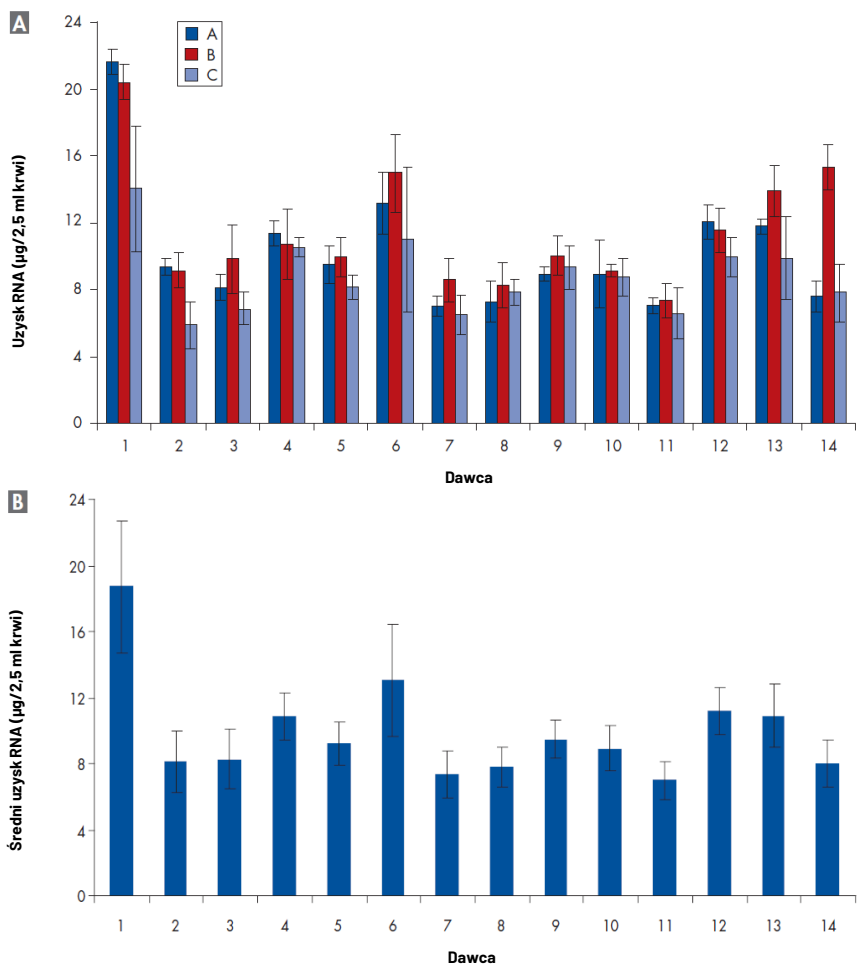
Ręczna izolacja RNA

Całkowity RNA wyizolowany za pomocą systemu PAXgene Blood RNA System jest czysty. W przypadku stosowania protokołu ręcznego wartości A_{260}/A_{280} mieszczą się w zakresie od 1,8 do 2,2, a DNA genomowy jest obecny w stężeniu $\leq 1\%$ (stężenie procentowe wagowe) w $\geq 95\%$ spośród wszystkich próbek, co zmierzono, wykonując ilościową reakcję real-time PCR dla sekwencji genu beta-aktyny. W co najmniej 95% spośród próbek nie zaobserwowano inhibicji reakcji RT-PCR, gdy eluat stanowił do 30% objętości reakcji RT-PCR.

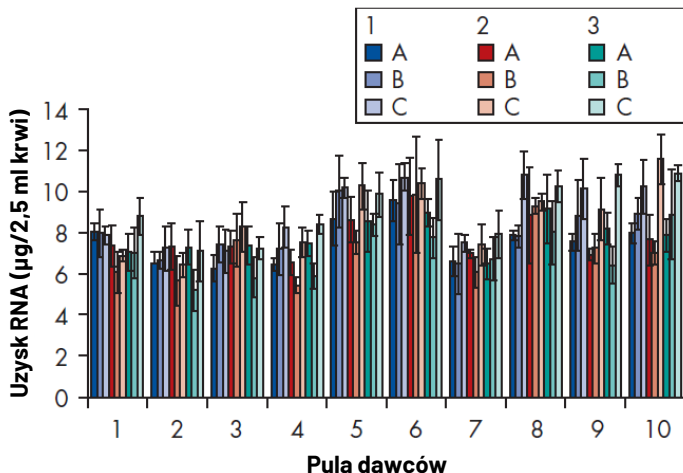
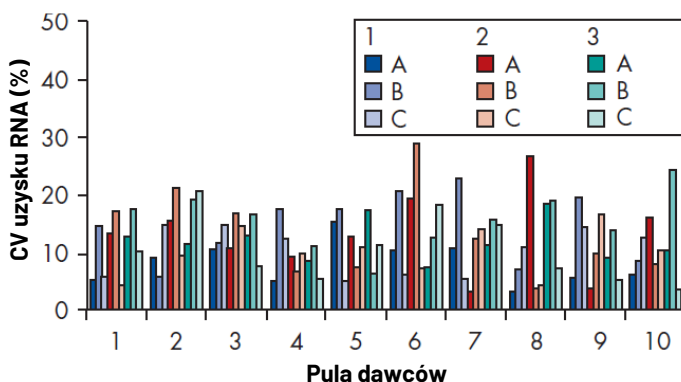
W przypadku stosowania protokołu ręcznego średni czas przygotowania próbki (na podstawie danych uzyskanych z 12 cykli przygotowań próbek) wynosi około 90 min*, przy czym czas pracy ręcznej wynosi jedynie 40 min. Uzyski RNA z 2,5 ml ludzkiej krwi pełnej pobranej od osoby zdrowej są $\geq 3 \mu\text{g}$ dla $\geq 95\%$ spośród przetworzonych próbek. Ze względu na to, że uzyski zależą w znacznym stopniu od dawcy, poszczególne uzyski mogą się różnić między sobą. System PAXgene Blood RNA System zapewnia wysoką odtwarzalność i powtarzalność uzysków (Ryc. 8 i Ryc. 9, strony 50 i 51) oraz odtwarzalność i powtarzalność reakcji RT-PCR (Ryc. 10 i Ryc. 11, strony 56 i 57) dla poszczególnych dawców, co sprawia, że jest wysoce skuteczny w przypadku klinicznych testów diagnostycznych.

Ryc. 8 (strona 50) wskazuje ogólną powtarzalność i odtwarzalność systemu PAXgene Blood RNA System. Wykonano dodatkowe badania w celu wykazania wpływu różnych serii zestawu PAXgene Blood RNA Kit oraz różnych operatorów na odtwarzalność uzysku RNA i wydajność reakcji real-time RT-PCR. Ze względu na to, że do badań tych używano zbiorczych próbek krwi, a nie pojedynczych probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), wyniki nie odzwierciedlają powtarzalności systemu, w tym zmienności między poszczególnymi pobraniami krwi, ale jedynie powtarzalność przygotowania próbek (patrz Ryc. 9, strona 51).

* Całkowity czas trwania protokołu, w tym początkowe etapy postępowania z probówkami PAXgene Blood RNA Tubes (wirowania, przepłukiwanie osadu i ponowne zawieszanie osadu).



Ryc. 8: Odtwarzalna i powtarzalna izolacja RNA. Każdy z 3 techników (A, B, C) przetworzył ręcznie po cztery próbki krwi od każdego z 14 dawców. Używano trzech zestawów wyposażenia, a wszystkie próbki przygotowane przez danego technika były przetwarzane za pomocą tego samego wyposażenia. [A] Przedstawiono średnie i odchylenia standardowe uzysku RNA dla powtórzeń próbek pobranych od tych samych dawców, przetwarzanych przez różnych techników. [B] 3 różnych techników przetworzyło po dwanaście powtórzeń próbek krwi od każdego z 14 dawców. Przedstawiono średnie i odchylenia standardowe uzysku RNA dla próbek pobranych od tych samych dawców, przetwarzanych przez wszystkich techników. Dla wszystkich próbek RNA wartości stosunku A_{280}/A_{260} mieściły się w zakresie od 1,8 do 2,2.

A**B**

Ryc. 9: Powtarzalność i odtwarzalność uzysku RNA dla różnych operatorów i serii zestawu PAXgene Blood RNA Kit przy użyciu zbiorczych próbek krwi. Próbki krwi pobrane od 30 różnych dawców zebrano do probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 probówek na dawcę, łącznie 360 probówek). Zawartość probówek zawierających próbki od 3 dawców połączono w jedną próbkę, a następnie ponownie rozdzielono na 36 próbek. 3 różnych operatorów przetworzyło ręcznie te 36 próbek otrzymanych z puli 3 dawców. Każdy operator używał 3 różnych serii zestawu PAXgene Blood RNA Kit do izolacji RNA i przetwarzania czterech powtórzeń próbek z każdej z 10 pul dawców. [A] Uzysk RNA i odchylenie standardowe dla każdej kombinacji operator-seria. 3 różnych operatorów (A, B, C) przetworzyło po cztery powtórzenia próbek krwi z 10 pul dawców, używając każdej z 3 serii zestawu (1, 2, 3). Przedstawiono średnie uzyski (kolumny) i odchylenia standardowe (słupki błędów) otrzymane na podstawie czterech powtórzeń próbki z tej samej puli dawców dla różnych operatorów i różnych serii zestawu. [B] Wartość CV uzysku RNA na pulę dawców dla wszystkich kombinacji operator-seria (A, B, C; 1, 2, 3) obliczona na podstawie wartości średniego uzysku i odchylenia standardowego uzysku przedstawionych na Ryc. 9A.

Tabela 1A: Odtwarzalność w obrębie każdej serii i dla każdego użytkownika dla wybranych pul dawców (1, 6, 9, 10)

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

Tabela 1B: Odtwarzalność dla każdego użytkownika i między wszystkimi seriami dla wybranych pul dawców (1, 6, 9, 10)

Kombinacja danych	Pula dawców 1 ($5,1 \times 10^6$ komórek/ml)			Pula dawców 6 ($6,5 \times 10^6$ komórek/ml)		
	Średni uzysk (μg)	SD (μg)	CV (%)	Średni uzysk (μg)	SD (μg)	CV (%)
Użytkownik A, wszystkie serie	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Użytkownik B, wszystkie serie	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Użytkownik C, wszystkie serie	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
	Pula dawców 9 ($8,4 \times 10^6$ komórek/ml)			Pula dawców 10 ($10,2 \times 10^6$ komórek/ml)		
	Średni uzysk (μg)	SD (μg)	CV (%)	Średni uzysk (μg)	SD (μg)	CV (%)
Użytkownik A, wszystkie serie	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Użytkownik B, wszystkie serie	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Użytkownik C, wszystkie serie	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

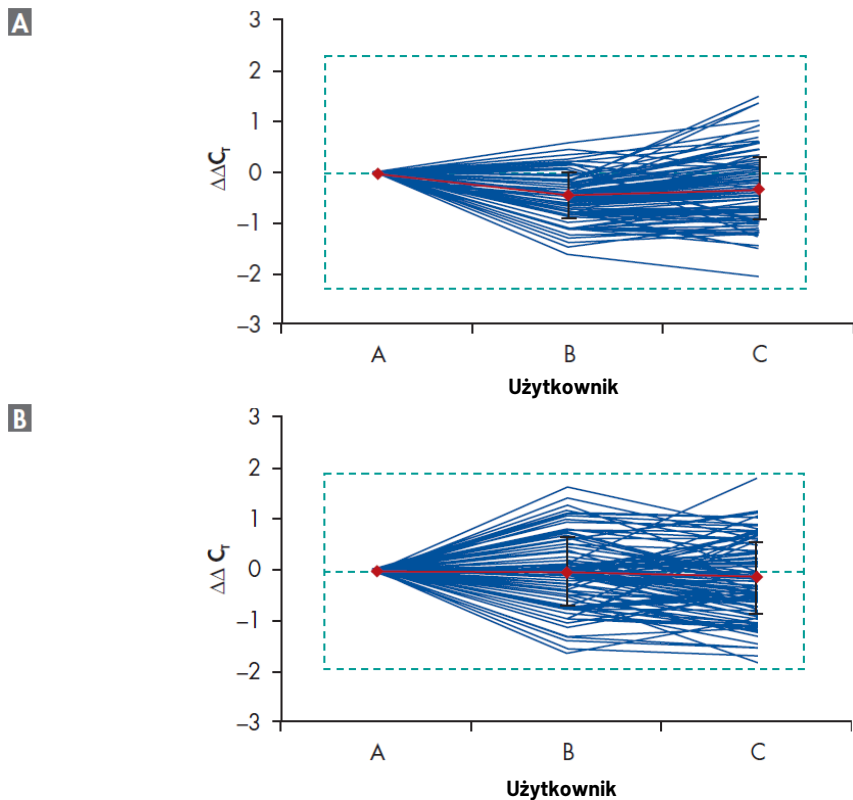
Tabela 1C: Odtwarzalność w obrębie każdej serii i między wszystkimi użytkownikami dla wybranych pul dawców (1, 6, 9, 10)

Kombinacja danych	Pula dawców 1 ($5,1 \times 10^6$ komórek/ml)			Pula dawców 6 ($6,5 \times 10^6$ komórek/ml)		
	Średni uzysk (μg)	SD (μg)	CV (%)	Średni uzysk (μg)	SD (μg)	CV (%)
Seria 1, wszyscy użytkownicy	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Seria 2, wszyscy użytkownicy	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Seria 3, wszyscy użytkownicy	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Kombinacja danych	Pula dawców 9 ($8,4 \times 10^6$ komórek/ml)			Pula dawców 10 ($10,2 \times 10^6$ komórek/ml)		
	Średni uzysk (μg)	SD (μg)	CV (%)	Średni uzysk (μg)	SD (μg)	CV (%)
Seria 1, wszyscy użytkownicy	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Seria 2, wszyscy użytkownicy	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Seria 3, wszyscy użytkownicy	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

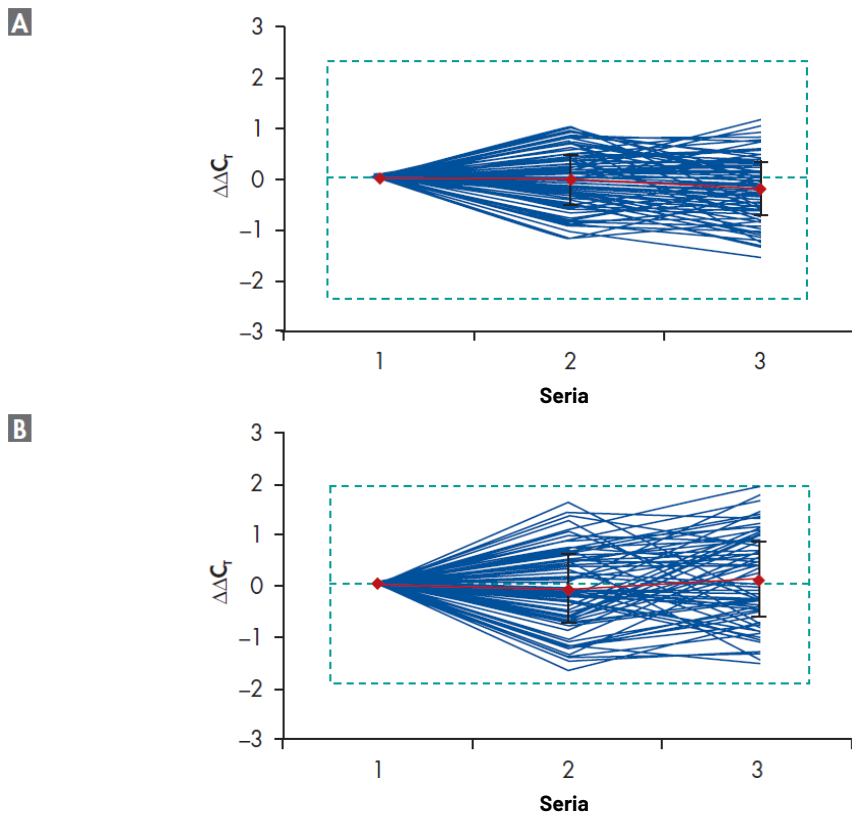
Tabela 1D: Odtwarzalność między wszystkimi seriami i wszystkimi użytkownikami dla wybranych pul dawców (1, 6, 9, 10)

Kombinacja danych	Pula dawców 1 ($5,1 \times 10^6$ komórek/ml)			Pula dawców 6 ($6,5 \times 10^6$ komórek/ml)		
	Średni uzysk (μg)	SD (μg)	CV (%)	Średni uzysk (μg)	SD (μg)	CV (%)
Seria 1, wszyscy użytkownicy	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
	Pula dawców 9 ($8,4 \times 10^6$ komórek/ml)			Pula dawców 10 ($10,2 \times 10^6$ komórek/ml)		
	Średni uzysk (μg)	SD (μg)	CV (%)	Średni uzysk (μg)	SD (μg)	CV (%)
Seria 1, wszyscy użytkownicy	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Szczegółowa analiza 4 reprezentatywnych pul dawców. Pule te wybrano na podstawie liczby białych krwinek w taki sposób, aby odzwierciedlały górną, średnią i dolną wartość zakresu prawidłowego liczby białych krwinek ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocytów/ml). Liczba białych krwinek reprezentuje średnią wartość obliczoną na podstawie 3 wyników liczby białych krwinek otrzymanych dla próbek 3 różnych dawców na pulę dawców.



Ryc. 10: Odtwarzalność reakcji RT-PCR – między użytkownikami. Do reakcji real-time RT-PCR wykorzystano RNA oczyszczony w eksperymencie opisanym na Ryc. 9. Względne poziomy transkryptów [A] FOS i [B] IL1B określono, przeprowadzając reakcję dupleks real-time RT-PCR przy użyciu 18S rRNA jako wzorca wewnętrznego. Wartości dla wszystkich próbek naniesiono na wykres w odniesieniu do wartości dla użytkownika A (10 pul dawców × 3 serie zestawu × 4 powtórzenia = 120 zestawów danych dla każdego genu), ze średnimi (czerwone linie) i odchyleniami standardowymi (czarne słupki) dla wszystkich przedstawionych próbek. Linie przerywane wskazują $\pm 3\sigma$ całkowitą precyzję oznaczeń (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).



Ryc. 11: Odtwarzalność reakcji RT-PCR – między seriami zestawu. Do reakcji real-time RT-PCR wykorzystano RNA oczyszczony w eksperymencie opisanym na Ryc. 9. Względne poziomy transkryptów **[A]** FOS i **[B]** IL1B określono, przeprowadzając reakcję dupleks real-time RT-PCR przy użyciu 18S rRNA jako wzorca wewnętrznego. Wartości dla wszystkich próbek naniesiono na wykres w odniesieniu do wartości dla serii 1 zestawu (10 pul dawców \times 3 użytkowników \times 4 powtórzenia = 120 zestawów danych dla każdego genu), ze średnimi (czerwone linie) i odchyleniami standardowymi (czarne słupki) dla wszystkich przedstawionych próbek. Linie przerywane wskazują $\pm 3x$ całkowitą precyzję oznaczeń (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).

Tabela 2: Podsumowanie danych dla reakcji RT-PCR z Ryc. 10 i Ryc. 11

System testowy	Oznaczenie FOS/18S rRNA		Oznaczenie IL1B/18S rRNA	
Porównanie danych	Średnia ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Średnia ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Odtwarzalność dla każdego użytkownika i między wszystkimi seriami				
Wszyscy użytkownicy, seria 1-seria 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Wszyscy użytkownicy, seria 1-seria 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Wszyscy użytkownicy, seria 1-seria 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Odtwarzalność dla każdego użytkownika i między wszystkimi seriami				
Wszystkie serie, użytkownik A-użytkownik A	0,00	0,00	0,00	0,00
Wszystkie serie, użytkownik A-użytkownik B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Wszystkie serie, użytkownik A-użytkownik C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Użytkownik: technik, osoba przeprowadzająca badanie.

Seria: numer serii zestawu używanego podczas badania.

SD: odchylenie standardowe.

Przedstawiono średnie wartości $\Delta\Delta C_T$ (N = 120) i odchylenia standardowe dla danych przedstawionych na Ryc. 10 i Ryc. 11.

Zautomatyzowana izolacja RNA

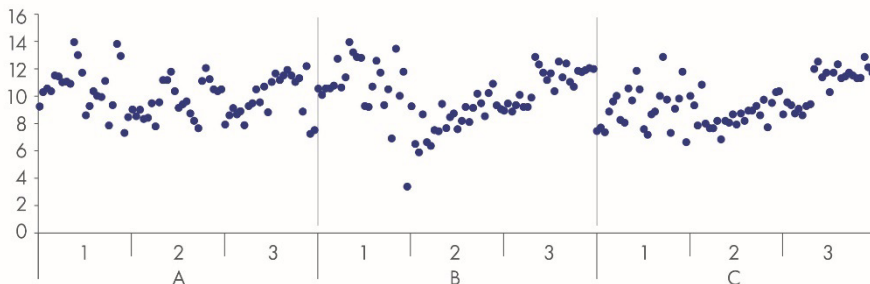
Uzyski RNA z 2,5 ml ludzkiej krwi pełnej pobranej od osoby zdrowej są ≥ 3 μg dla $\geq 95\%$ spośród przetworzonych próbek. Ryc. 12 (strona 59) wskazuje uzyski RNA z łącznie 216 próbek przygotowanych za pomocą protokołu zautomatyzowanego przy użyciu 3 serii zestawu przez 3 operatorów. Ze względu na to, że do tych badań używano zbiorczych próbek krwi, a nie pojedynczych probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), wyniki nie odzwierciedlają uzysku RNA oczekiwanego dla pojedynczych próbek pobranych podczas pojedynczego pobrania krwi. Ze względu na to, że uzyski zależą w znacznym stopniu od dawcy, poszczególne uzyski mogą się różnić między sobą (Ryc. 12, strona 59).

W co najmniej 95% spośród próbek nie zaobserwowano inhibicji reakcji RT-PCR, gdy eluat stanowił do 30% objętości reakcji RT-PCR. W przypadku stosowania protokołu zautomatyzowanego zanieczyszczenie krzyżowe między próbkami jest

niewykrywalne, co zmierzono, wykonując ilościową reakcję real-time RT-PCR dla sekwencji transkryptów ABL1 i FOS w próbkach negatywnych pod względem RNA (woda) sparowanych z próbkami pozytywnymi względem RNA (ludzka krew pełna) podczas tego samego cyklu pracy.

RNA wyizolowane za pomocą systemu PAXgene Blood RNA System i zautomatyzowanego protokołu jest czyste, na co wskazuje brak inhibicji reakcji RT-PCR oraz wartości A_{260}/A_{280} mieszczące się w zakresie od 1,8 do 2,2. DNA genomowy jest obecny w stężeniu $\leq 1\%$ (stężenie procentowe wagowe) w $\geq 95\%$ spośród wszystkich próbek, co zmierzono, wykonując ilościową reakcję real-time PCR dla sekwencji genu beta-aktyny. Na Ryc. 13 i Ryc. 14 (strona 60) przedstawiono wartości A_{260}/A_{280} i względny DNA genomowy dla łącznie 216 próbek przygotowanych za pomocą protokołu zautomatyzowanego przy użyciu 3 serii zestawu przez 3 operatorów.

Uzysk RNA ($\mu\text{g}/2,5$ ml krwi): QIAcube Connect MDx



Ryc. 12: Uzysk RNA – przetwarzanie zautomatyzowane przy użyciu aparatu QIAcube Connect MDx. próbki od poszczególnych dawców pobrano do próbek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Zawartość próbek połączono w 6 pul dawców, a następnie ponownie rozdzielono na porcje. 3 różnych operatorów (A, B, C) przetworzyło łącznie 216 próbek (po 36 na pulę). Każdy operator używał 3 różnych serii (1, 2, 3) zestawu PAXgene Blood RNA Kit do zautomatyzowanej izolacji przy użyciu aparatu QIAcube Connect MDx i przetworzył po cztery powtórzenia próbek z każdej z 6 pul dawców. Przedstawiono uzyski RNA dla wszystkich poszczególnych próbek dla każdej kombinacji operator-seria.

Stabilność wyizolowanego RNA

Próbki RNA wyizolowanego przy użyciu zestawu PAXgene Blood RNA Kit z krwi pełnej pobranej do probówek PAXgene Blood RNA Tubes zachowują stabilność przez 5 lat w przypadku przechowywania w temperaturze -20°C i przez 7 lat w przypadku przechowywania w temperaturze -70°C (punkt końcowy badań).

Ważne uwagi

Obsługa aparatu QIAcube Connect MDx

Należy upewnić się, że użytkownik potrafi obsługiwać aparat QIAcube Connect MDx. Przed uruchomieniem zautomatyzowanego protokołu PAXgene Blood RNA należy przeczytać podręcznik użytkownika aparatu i wszelkie dodatkowe informacje dostarczone z aparatem, przykładając szczególną uwagę do informacji dotyczących bezpieczeństwa.

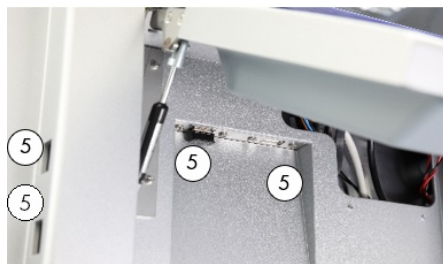
Uruchamianie aparatu QIAcube Connect MDx

Zamknąć pokrywę aparatu QIAcube Connect MDx, a następnie włączyć aparat, używając przełącznika zasilania (patrz Ryc. 15, strona 63).

Zostanie wyemitowany sygnał dźwiękowy i pojawi się ekran początkowy. Aparat automatycznie wykonuje testy w ramach inicjalizacji.



Widok aparatu QiAcube Connect MDx z przodu



Wyciągnięty ekran dotykowy



Widok aparatu QiAcube Connect MDx z tyłu (lewa strona)



Widok aparatu QiAcube Connect MDx z tyłu (prawa strona)

Ryc. 15: Elementy zewnętrzne aparatu QiAcube Connect MDx.

- | | |
|--|--|
| <p>1 Ekran dotykowy</p> <p>2 Pokrywa</p> <p>3 Szufłada Waste (Odpady)</p> <p>4 Przełącznik zasilania</p> | <p>5 2 porty USB po lewej stronie ekranu dotykowego; 2 porty USB za ekranem dotykowym (do 1 portu USB jest podłączony moduł Wi-Fi)</p> <p>6 Port RJ-45 sieci Ethernet</p> <p>7 Gniazdo dla przewodu zasilania</p> <p>8 Wylot powietrza chłodzącego</p> |
|--|--|

Ekran dotykowy

Aparat QIAcube Connect MDx jest sterowany za pomocą ekranu dotykowego. Ekran dotykowy umożliwia użytkownikowi obsługę aparatu i prowadzi użytkownika przez konfigurację stołu roboczego. Podczas przetwarzania próbek na ekranie dotykowym wyświetlany jest status protokołu i czas pozostały do końca.




Ryc. 16: Wyciągnięty ekran dotykowy aparatu QIAcube Connect MDx.


Instalowanie protokołów w aparacie QIAcube Connect MDx

Zanim możliwe będzie wykonanie pierwszego cyklu przygotowań RNA w aparacie QIAcube Connect MDx może być konieczna wstępna instalacja protokołów. Zainstalować oba protokoły „PAXgene Blood RNA Part A” (PAXgene Blood RNA – część A) i „PAXgene Blood RNA Part B” (PAXgene Blood RNA – część B).

Protokoły dla aparatu QIAcube Connect MDx są dostępne na stronie **www.qiagen.com** i należy je pobrać na nośnik pamięci USB dostarczony z aparatem. Te protokoły zostaną przesłane do aparatu przez port USB.

Port USB (umieszczony z boku ekranu dotykowego; patrz Ryc. 15, strona 63), umożliwia podłączenie nośnika pamięci USB dostarczonego z aparatem do aparatu QIAcube Connect MDx. Za pośrednictwem portu USB można również przysłać pliki danych, takie jak pliki dziennika lub pliki raportów, z aparatu do nośnika pamięci USB.

 Port USB jest przeznaczony do użytku wyłącznie z nośnikiem pamięci USB dostarczonym przez firmę QIAGEN. Nie należy podłączać innych urządzeń do tego portu.

 Nie należy wyciągać nośnika pamięci USB podczas pobierania protokołów, przesyłania plików danych lub w trakcie wykonywania protokołu.


Więcej informacji o procesie przekazywania protokołów do aparatu QIAcube Connect MDx można znaleźć w podręczniku użytkownika aparatu.

Ładowanie aparatu QIAcube Connect MDx

W celu zaoszczędzenia czasu ładowanie można wykonywać podczas jednego lub obu 10 minutowych etapów wirowania (etapy 3 i 5) w części „Protokół: zautomatyzowana izolacja całkowitego RNA z ludzkiej krwi pełnej pobranej do probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)”, strona 35.

Butelki na odczynniki

Przed każdym cyklem pracy w aparacie QIAcube Connect MDx należy ostrożnie napełnić 4 butelki na odczynniki odczynniki wymienionymi w Tabeli 3 (strona 66) do wskaźnika poziomu maksymalnego lub, jeśli nie jest to możliwe, do poziomu, na który pozwalają objętości buforów dostarczonych w zestawie PAXgene Blood RNA Kit. Wyraźnie oznaczyć butelki i wieczka nazwami buforów i włożyć napełnione butelki z odczynniki na odpowiednie miejsca w statywie na butelki na odczynniki. Załadować statyw na stół roboczy aparatu w przedstawiony sposób (Ryc. 17 i Ryc. 18, strony 66 i 67).

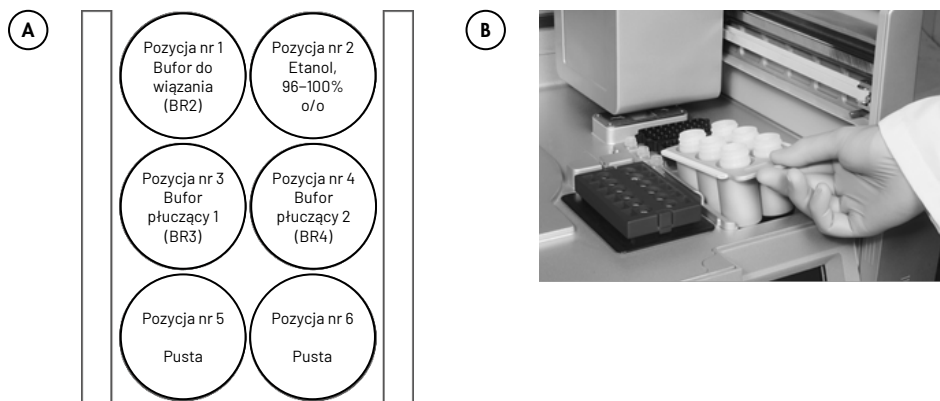
 Dostarczona objętość buforu BR2 nie wypełni butelki na odczynnik do poziomu wskaźnika. Bufory BR3 i BR4 mogą nie wypełnić butelki do poziomu wskaźnika po przetworzeniu wielu próbek w poprzednich cyklach pracy.

- i** Przed umieszczeniem butelek na stole roboczym należy upewnić się, że zdjęto z nich wieczka.
- i** Objętości buforów dostarczone w zestawie PAXgene Blood RNA Kit (50) wystarczają na maksymalnie 7 cykli przygotowań RNA w aparacie QIAcube Connect MDx przy liczbie próbek od 2 do 12 na cykl pracy. Ogólnie rzecz biorąc, należy unikać wykonywania cykli z małą liczbą próbek na cykl, aby przetworzyć łącznie 50 próbek na zestaw. W przypadku wykonania więcej niż 7 cykli przygotowań RNA może zabraknąć buforów do przetworzenia ostatnich próbek.

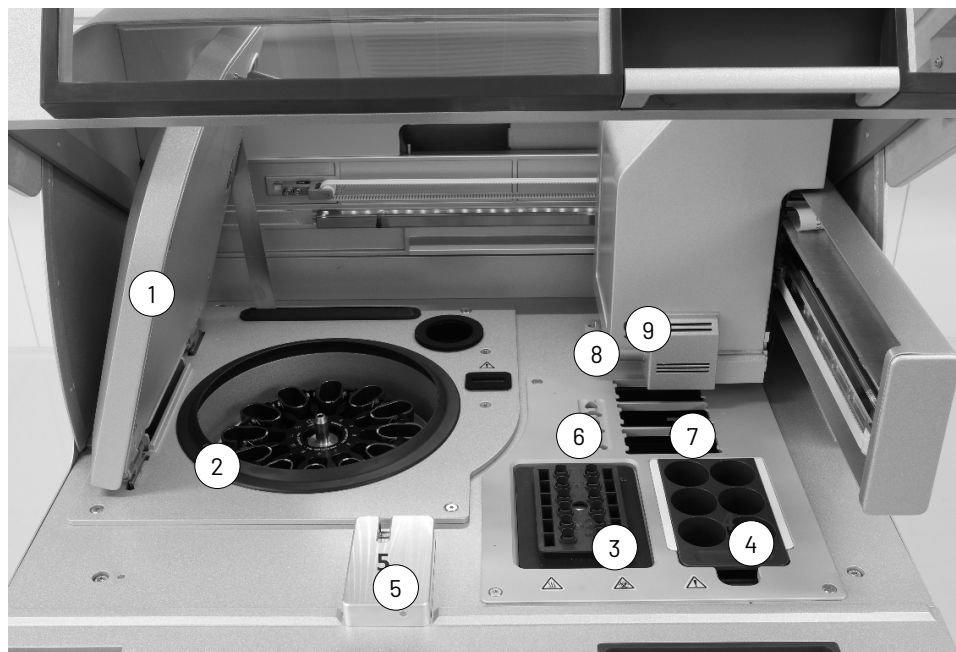
Tabela 3: Pozycje w statywie na butelki na odczynniki

Pozycja	Odczynnik
1	Bufor do wiązania (BR2)
2	Etanol (96–100% o/o)
3	Bufor płuczący 1 (BR3)
4	Bufor płuczący 2 (BR4)*
5	– (pozostawić pustą)
6	– (pozostawić pustą)

* Bufor płuczący 2 (BR4) jest dostarczany w postaci koncentratu. Przed pierwszym użyciem dodać 4 objętości etanolu (96–100% o/o, stopień czystości cz.d.a.), zgodnie z instrukcją na butelce, aby uzyskać roztwór roboczy.



Ryc. 17: Ładowanie statywu na butelki na odczynniki. [A] Schemat pozycji i zawartości butelek w statywie na butelki na odczynniki. [B] Ładowanie statywu do aparatu QIAcube Connect MDx.



Ryc. 18: Widok wnętrza aparatu QIAcube Connect MDx.

- | | | | |
|---|----------------------------------|---|---|
| ① | Pokrywa wirówki | ⑥ | Gniazda na próbówki MCT |
| ② | Wirówka | ⑦ | 3 gniazda na statywy na końcówki |
| ③ | Wytrząsarka | ⑧ | Gniazda do utylizacji końcówek i kolumn |
| ④ | Statyw na butelki na odczynniki | ⑨ | Ramię robota (wyposażone w pipetor 1-kanałowy, chwytak, czujnik ultradźwiękowy i optyczny oraz diodę LED emitującą promieniowanie ultrafioletowe) |
| ⑤ | Czujnik końcówek i zamek pokrywy | | |

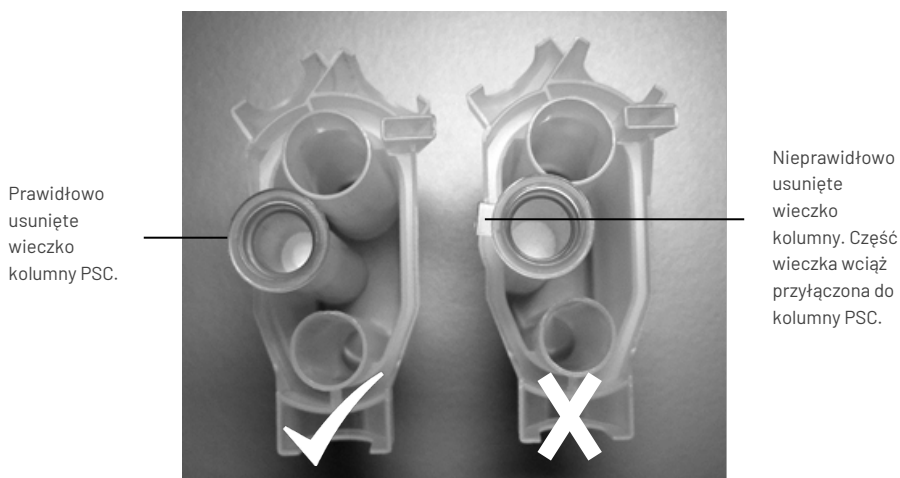
Kolumny wirówkowe (PSC, PRC), probówki MCT i sprzęty z tworzywa sztucznego do aparatu QIAcube Connect MDx

Umieścić 2 statywy na końcówki wypełnione końcówkami z filtrem, 1000 µl, w aparacie QIAcube Connect MDx (patrz Ryc. 18, strona 67). W razie potrzeby uzupełnić statywy końcówkami.

i Używać wyłącznie końcówek z filtrem, 1000 µl, przeznaczonych do użytku z aparatem QIAcube Connect MDx.

Oznaczyć adaptory rotora i probówki MCT dla każdej próbki, używając markera permanentnego. Otworzyć kolumny PSC, które będą używane, a następnie całkowicie odciąć wieczka, używając nożyczek (patrz Ryc. 19).

i Dla prawidłowej pracy zmechanizowanego chwytaka aparatu QIAcube Connect MDx należy zupełnie usunąć (odciąć) wieczka i wszystkie elementy z tworzywa sztucznego łączące wieczko z kolumnami PSC (patrz Ryc. 19). W przeciwnym razie zmechanizowany chwytak nie będzie mógł prawidłowo chwycić kolumn PSC.



Ryc. 19: Ładowanie kolumny PSC. Kolumna PSC jest ładowana na środkową pozycję adaptera rotora. Przed załadowaniem kolumny PSC należy odciąć jej wieczko.

Załadować kolumnę PSC (bez wieczka, patrz Ryc. 19, strona 68), kolumnę PRC i opisaną probówkę MCT na odpowiednie pozycje w każdym oznaczonym adapterze rotora w sposób przedstawiony w Tabeli 4 i na Ryc. 20.

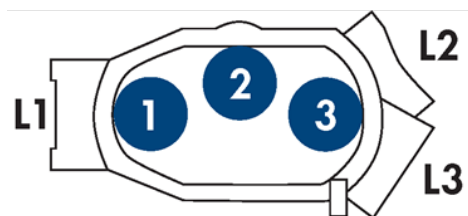


Upewnić się, że wieczka kolumny wirówkowej (PRC) i próbki MCT są dopchnięte aż do dna gniazd przy krawędzi adaptera rotora. W przeciwnym razie wieczka zostaną odłamane podczas wirowania.

Tabela 4: Sprzęt wykonany z tworzywa sztucznego umieszczony w adapterze rotora

Pozycja	Odczynnik	Pozycja wieczka
1	Kolumna wirówkowa PAXgene RNA (czerwona, PRC)	L1
2	Kolumna wirówkowa PAXgene Shredder (liliowa, PSC)(przed umieszczeniem w adapterze rotora odciąć wieczko)	–
3	MCT*	L3

* Używać probówek MCT (1,5 ml) dołączonych do zestawu PAXgene Blood RNA Kit.



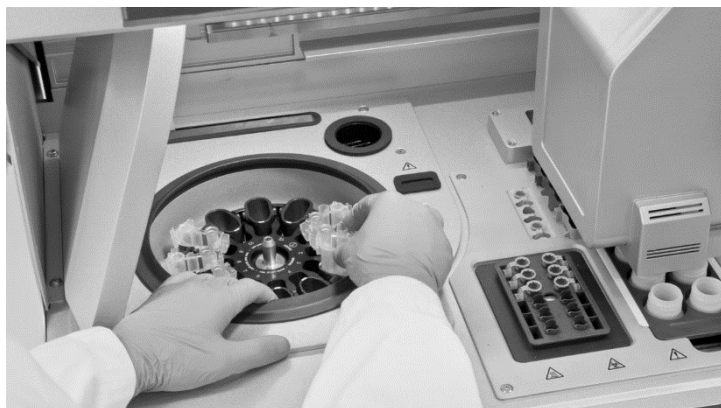
Ryc. 20: Pozycje w adapterze rotora. W adapterze rotora znajdują się 3 pozycje probówek (1–3) i trzy pozycje wieczek (L1–L3).

Ładowanie wirówki

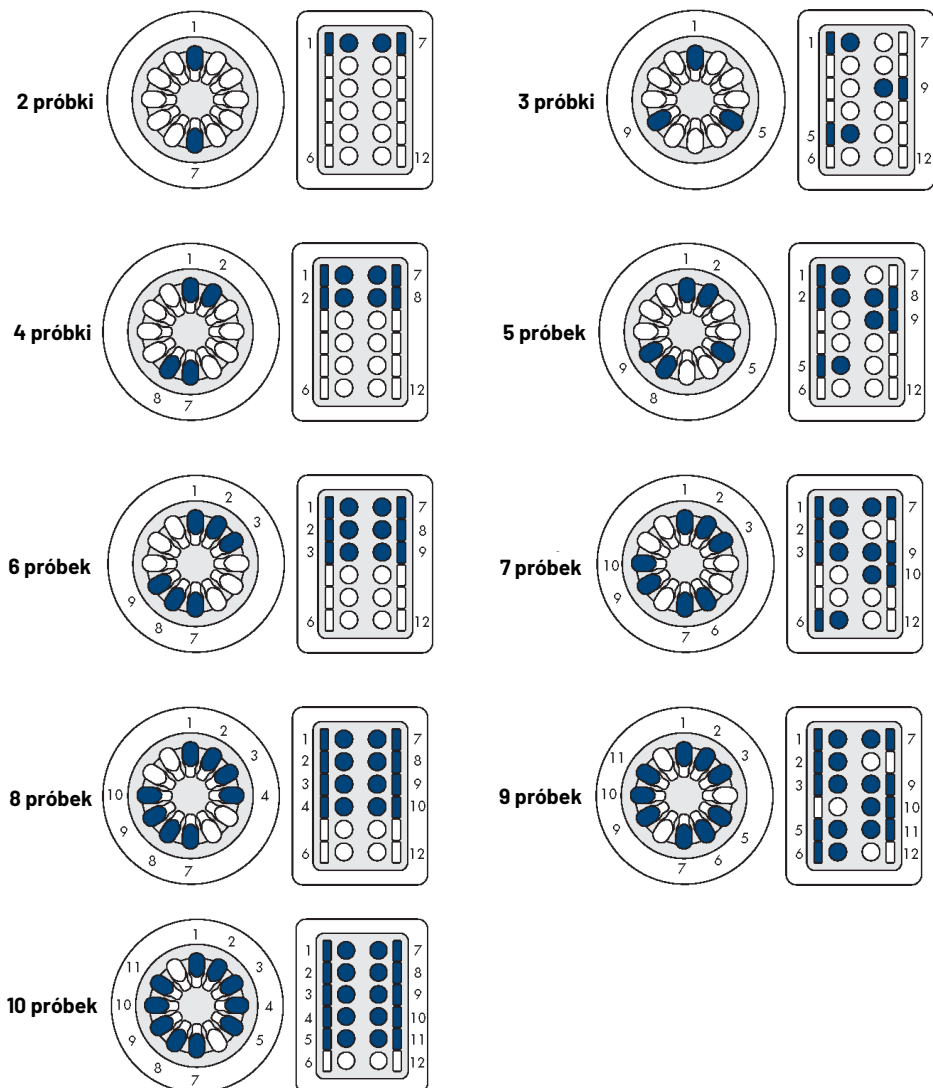
Załadować zmontowane adaptory rotora do koszy wirówki aparatu QIAcube Connect MDx w sposób przedstawiony na Ryc. 21 poniżej.



W przypadku przetwarzania mniej niż 12 próbek należy upewnić się, że rotor wirówki załadowano w taki sposób, aby był wyważony promieniowo (patrz Ryc. 22, strona 71). Wszystkie kosze wirówki muszą być zamontowane przed rozpoczęciem protokołu, nawet jeśli przetwarzanych jest mniej niż 12 próbek. Nie można przetwarzać pojedynczej (jednej) próbki lub 11 próbek.



Ryc. 21: Ładowanie wirówki w aparacie QIAcube Connect MDx. Załadować zmontowane adaptory rotora do koszy wirówki.



Ryc. 22: Ładowanie wirówki i wytrząsarki. Przedstawiono pozycje wirówki i wytrząsarki używane w celu przetworzenia od dwóch (2) do dziesięciu (10) próbek. Nie można przetwarzać jednej (1) próbki ani 11 próbek. W przypadku przetwarzania 12 próbek zajęte są wszystkie pozycje wirówki i wytrząsarki (brak ilustracji).

Probówki do przetwarzania

Wyciągnąć wszystkie probówki PT, które pozostały w gniazdach na probówki MCT po poprzednich cyklach pracy (patrz Ryc. 18, strona 67). Napełnić 3 probówki PT ilością odczynników podaną w Tabeli 5 odpowiednio do liczby próbek przetwarzanych w cyklu pracy.

W celu przygotowania mieszaniny inkubacyjnej DNazy I należy za pomocą pipety przenieść wskazaną objętość buforu do trawienia DNA (RDD) do probówki PT, a następnie dodać wskazaną objętość roztworu podstawowego DNazy I (RNFD). Wymieszać, delikatnie pipetując całą objętość mieszaniny w górę i w dół 3 razy, używając końcówki do pipety 1000 µl.



Używać probówek PT o pojemności 2 ml dołączonych do zestawu PAXgene Blood RNA Kit. Wyraźnie opisać probówki nazwami odczynników i umieścić je na odpowiednich pozycjach w gniazdach na probówki MCT, w sposób przedstawiony w Tabeli 6 (strona 73).



DNaza I (RNFD) jest szczególnie wrażliwa na denaturację fizyczną. Mieszać wyłącznie poprzez pipetowanie, używając końcówek do pipety o dużym otworze wylotowym, aby zminimalizować tarcie. Nie wytrząsać.

Należy upewnić się, że za pomocą pipety dodawane są wymagane objętości określone w Tabeli 5 poniżej.

Tabela 5: Wymagane objętości odczynników, które należy dodać do próbek PT umieszczonych w gniazdach na próbki MCT

Liczba próbek	Objętość odczynnika dla wskazanej liczby próbek (µl)		
	Proteinaza K (PK)	Mieszanina inkubacyjna DNazy I	Bufor do elucji (BR5)
2	126	187 (23 DNazy I + 164 buforu Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNazy I + 228 buforu Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNazy I + 292 buforu Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNazy I + 356 buforu Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNazy I + 421 buforu Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNazy I + 485 buforu Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNazy I + 549 buforu Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNazy I + 613 buforu Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNazy I + 678 buforu Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNazy I + 806 buforu Buffer RDD)	1177

Tabela 6: Gniazda na próbki MCT

	Pozycja		
	A	B	C
Zawartość	Proteinaza K	Mieszanina inkubacyjna DNazy I	Bufor do elucji (BR5)
Naczynie	Probówka do przetwarzania*	Probówka do przetwarzania*	Probówka do przetwarzania*

* Używać próbek PT o pojemności 2 ml dołączonych do zestawu PAXgene Blood RNA Kit.

Usuwanie

Informacje na temat bezpiecznego usuwania materiałów po pobraniu próbek i ręcznej izolacji RNA można znaleźć w części poświęconej informacjom dotyczącym bezpieczeństwa na stronie 19 i części poświęconej środkom ostrożności na stronie 20.

W przypadku zautomatyzowanej izolacji RNA wykonywanej przy użyciu aparatu QIAcube Connect MDx należy zapoznać się z Ryc. 21 na stronie 70 i Ryc. 22 na stronie 71; na rycinach tych wskazano gniazda przeznaczone na zużyte końcówki i kolumny.

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.

Rozwiązywanie problemów

Ta część instrukcji może być przydatna w przypadku wystąpienia ewentualnych problemów. Aby uzyskać więcej informacji, należy również zapoznać się ze stroną poświęconą często zadawanym pytaniom (Frequently Asked Questions, FAQ) w witrynie naszego centrum pomocy technicznej pod adresem: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Naukowcy z działu serwisu technicznego firmy QIAGEN chętnie odpowiedzą na wszelkie pytania dotyczące informacji i protokołów opisanych w niniejszej instrukcji obsługi, a także technologii próbek i oznaczeń (informacje kontaktowe znajdują się na ostatniej stronie lub pod adresem www.qiagen.com).

Komentarze i wskazówki	
RNA uległ rozkładowi	
a) Zanieczyszczenie RNazami	 Należy zachować ostrożność, aby podczas procedury lub dalszego postępowania nie wprowadzić RNaz do odczynników (patrz Załącznik A, strona 81).
Niski uzysk RNA	
b) Do próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pobrano mniej niż 2,5 ml krwi	 Należy upewnić się, że do próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT; patrz <i>PAXgene Blood RNA Tube – Instrukcja obsługi</i>) pobrano 2,5 ml krwi.
c) Stężenie RNA zmierzono w wodzie	 W celu dokładnego oznaczenia ilościowego RNA należy rozcieńczyć w buforze Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5* (patrz Załącznik B, strona 83).
d) Na etapie 9 i 10 protokołu ręcznego przeniesiono pozostałości komórek do kolumny PRC	 Należy unikać przenoszenia dużych cząstek podczas przenoszenia supernatantu za pomocą pipety na etapie 7 protokołu ręcznego (przeniesienie niewielkiej ilości osadu nie zakłóci procedury).
e) Supernatant nie został całkowicie usunięty na etapie 3	 Należy upewnić się, że usunięto cały supernatant. W przypadku dekantacji supernatantu należy usunąć krople z brzoju próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT), osuszając ją ręcznikiem papierowym. Należy podjąć odpowiednie środki ostrożności, aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego.
f) Po pobraniu krwi do próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT) krew była inkubowana przez mniej niż 2 godziny	 Po pobraniu krwi należy ją inkubować w próbce PAXgene Blood RNA Tube (BRT) przez co najmniej 2 godziny.




* Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) dostępnymi u producentów poszczególnych produktów.

Komentarze i wskazówki	
Niska wartość A_{260}/A_{280}	
g) Do rozcieńczenia RNA w celu pomiaru stosunku A_{260}/A_{280} użyto wody	 W celu rozcieńczenia RNA przed pomiarem czystości należy użyć buforu Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5* (patrz Załącznik B, strona 83).
h) Nieprawidłowe wyzerowanie spektrofotometru	 Wyzerować spektrofotometr za pomocą próby ślepej zawierającej bufor do elucji (BR5) i bufor Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5, w takim samym stosunku jak w mierzonych próbkach. Bufor do elucji (BR5) charakteryzuje się wysoką absorpcją przy długości fali 220 nm, co, w przypadku nieprawidłowego wyzerowania spektrofotometru, może spowodować otrzymanie wysokiego poziomu absorpcji tła.
Awaria aparatu	
i) Aparat QIAcube Connect MDx nie działa prawidłowo	Przeczytać dokument <i>QIAcube Connect MDx – Podręcznik użytkownika</i> , przykładając szczególną uwagę do sekcji „Rozwiązywanie problemów”. Upewnić się, że aparat jest prawidłowo konserwowany, zgodnie z opisem w podręczniku użytkownika.

* 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.

Symbole

Poniższe symbole mogą znajdować się w instrukcji użycia lub na opakowaniu i etykietach. Dodatkowe symbole objaśniono w części Zawartość zestawu (strona 6).

Symbol	Definicja symbolu
Wer. <N1>	Wersja <N1> produktu
 <N2>	Zawiera odczynniki wystarczające do przeprowadzenia <N2> testów
	Zapoznać się z instrukcją użycia
	Data ważności
IVD	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
REF	Numer katalogowy
LOT	Numer serii
MAT	Numer materiału
COMP	Składniki
NUM	Numer
KU	Jednostki Kunitza
ADD	Dodawanie
CONT	Zawiera

RCNS

Zrekonstruowany

DNase

Deoksyrybonukleaza I

EtOH

Etanol

GITC

Izotiocyanian guanidyny

RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

GTIN

Globalny numer jednostki handlowej



Zakres temperatury



Górny limit temperatury



Producent

EC REP

Upoważniony przedstawiciel na terytorium Europy zgodnie z Rozporządzeniem (UE) 2017/746



Ważna uwaga



Dodatek etanolu



Znak CE. Ten produkt spełnia wymogi Rozporządzenia (UE) 2017/746 w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro.

UDI

Niepowtarzalny kod identyfikacyjny wyrobu



Przeostroga



OSTRZEŻENIE: Gorąca powierzchnia

Informacje kontaktowe

W firmie QIAGEN szcycimy się jakością i dostępnością naszej pomocy technicznej. W naszych działach serwisu technicznego pracują doświadczeni naukowcy mający rozległą wiedzę praktyczną i teoretyczną w dziedzinie biologii molekularnej oraz stosowania produktów firmy PreAnalytiX. W razie jakichkolwiek pytań dotyczących zestawu PAXgene Blood RNA Kit prosimy o kontakt.

W celu uzyskania pomocy technicznej lub szczegółowych informacji należy odwiedzić witrynę naszego centrum pomocy technicznej dostępną pod adresem **www.qiagen.com/Support**, zadzwonić pod numer 00800-22-44-6000 lub skontaktować się z jednym z działów serwisu technicznego firmy QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem (patrz tylna okładka lub strona **www.qiagen.com**).

Załącznik A: Ogólne uwagi dotyczące postępowania z RNA

Postępowanie z RNA



Rybonukleazy (RNazy) są bardzo stabilnymi i aktywnymi enzymami, które na ogół nie wymagają kofaktorów do działania. Ponieważ RNazy trudno inaktywować i nawet bardzo małe ich ilości wystarczają do rozkładu RNA, nie wolno używać jakichkolwiek sprzętów wykonanych ze szkła lub z tworzywa sztucznego bez wcześniejszego wyeliminowania możliwego zanieczyszczenia RNazami. Należy zachować szczególną ostrożność, aby uniknąć przypadkowego wprowadzenia RNaz do próbki z RNA w trakcie trwania lub po zakończeniu procedury izolacji. Aby wytworzyć i zachować środowisko niezawierające RNaz, należy wdrożyć środki ostrożności na etapach obróbki wstępnej oraz stosowania jednorazowych i wielorazowych naczyń i roztworów podczas pracy z RNA.

Ogólne postępowanie



Podczas pracy z RNA należy zawsze stosować prawidłową mikrobiologiczną technikę aseptyczną. Dłonie i cząsteczki kurzu przenoszą bakterie i pleśń i są najczęstszymi źródłami zanieczyszczeń RNazami. Podczas postępowania z odczynnikami i próbkami RNA należy zawsze nosić lateksowe lub winylowe rękawiczki, aby uniknąć zanieczyszczenia RNazami z powierzchni skóry lub zakurzonych urządzeń laboratoryjnych. Rękawiczki należy często zmieniać, a próbówki trzymać zamknięte, gdy tylko to możliwe. Podczas rozdzielania porcji do dalszych zastosowań za pomocą pipety należy trzymać oczyszczony RNA na lodzie.

Protokoły usuwania zanieczyszczeń RNazami ze sprzętów wykonanych ze szkła oraz roztworów można znaleźć w ogólnych wytycznych dotyczących metod biologii molekularnej, takich jak publikacja Sambrook, J. i Russella, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Załącznik B: Oznaczenie ilościowe i określenie jakości całkowitego RNA

Oznaczenie ilościowe RNA

Stężenie RNA należy określić poprzez pomiar absorpcji przy długości fali 260 nm (A_{260}) w spektrofotometrze. Aby zagwarantować istotność wyniku, odczyty powinny mieścić się w zakresie liniowym spektrofotometru. Absorbancja równa 1 jednostce przy długości fali 260 nm odpowiada 44 μg RNA na ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$). Ta zależność jest ważna tylko w przypadku pomiarów w buforze Tris-HCl o stężeniu 10 mM pH 7,5*. Z tego względu jeśli konieczne jest rozcieńczenie próbki RNA, należy ją rozcieńczyć w buforze Tris-HCl o stężeniu 10 mM. Zgodnie z poniższym omówieniem (patrz „Czystość RNA”, strona 84), proporcja wartości absorpcji przy 260 i 280 nm zapewnia szacunkową ocenę czystości RNA. Podczas pomiaru próbek RNA należy być pewnym, że kuwety są wolne od RNaz. Wyzerować spektrofotometr za pomocą próby ślepej zawierającej bufor do elucji (BR5) i bufor Tris-HCl w takim samym stosunku jak w mierzonych próbkach. Bufor do elucji (BR5) charakteryzuje się wysoką absorpcją przy długości fali 220 nm, co, w przypadku nieprawidłowego wyzerowania spektrofotometru, może spowodować otrzymanie wysokiego poziomu absorpcji tła. Poniżej przedstawiono przykład obliczenia wykonywanego podczas oznaczenia ilościowego RNA.

* Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) dostępnymi u producentów poszczególnych produktów.

Objętość próbki RNA	=	80 μ l
Rozcieńczenie (1/15)	=	10 μ l próbki RNA + 140 μ l buforu Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5
Zmierzyć absorbancję rozcieńczonej próbki w kuwecie (wolnej od RNaz).		
A_{260}	=	0,3
Stężenie próbki	=	$44 \times A_{260} \times \text{współczynnik rozcieńczenia}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 μ g/ml
Całkowity uzysk	=	stężenie \times objętość próbki w mililitrach
	=	$198 \mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml}$
	=	15,8 μ g RNA

Czystość RNA

Stosunek odczytów przy długości fali 260 nm i 280 nm (A_{260}/A_{280}) udostępnia szacunkową wartość czystości RNA w odniesieniu do zanieczyszczeń, które charakteryzują się absorbancją światła ultrafioletowego (UV), takich jak białka. Jednakże, pH ma znaczący wpływ na stosunek A_{260}/A_{280} . Niższe pH prowadzi do uzyskania niższego stosunku A_{260}/A_{280} i zmniejszonej czułości na zanieczyszczenia białkowe.* W celu uzyskania dokładnych wartości zalecamy wykonywanie pomiaru absorbancji w buforze Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5. Stosunek A_{260}/A_{280} czystego RNA w buforze Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5, mieści się w zakresie 1,8-2,2. Wyzerować spektrofotometr za pomocą próby ślepej zawierającej bufor do elucji (BR5) i bufor Tris-HCl w takim samym stosunku jak w mierzonych próbkach. Bufor do elucji (BR5) charakteryzuje się wysoką absorbancją przy długości fali 220 nm, co, w przypadku nieprawidłowego wyzerowania spektrofotometru, może spowodować otrzymanie wysokiego poziomu absorbancji tła.

* 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.

Załącznik C: Postępowanie z probówkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Poniższe zalecenia firmy BD mogą ułatwić postępowanie z probówkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Więcej informacji na temat probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zawiera dokument *PAXgene Blood RNA Tube – Instrukcja obsługi*.

Instrukcja zdejmowania zamknięcia BD Hemogard

1. Chwycić probówkę PAXgene Blood RNA Tube (BRT) jedną ręką, kładąc kciuk pod zamknięciem BD Hemogard. (W celu zwiększenia stabilności położyć ramię na twardej powierzchni). Przekręcić zamknięcie BD Hemogard drugą ręką, jednocześnie naciskając kciukiem drugiej ręki w górę do momentu poluzowania korka próbki.
2. Przed uniesieniem zamknięcia należy odsunąć kciuk. Nie należy używać kciuka do zepchnięcia zamknięcia z próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
Przeostroga: Jeśli próbka PAXgene Blood RNA Tube (BRT) zawiera krew, istnieje ryzyko narażenia na czynniki zakaźne. Aby uniknąć obrażeń podczas zdejmowania zamknięcia, istotne jest, aby odsunąć kciuk, który jest używany do naciskania zamknięcia w górę, od próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT) od razu po poluzowaniu zamknięcia BD Hemogard.
3. Zdjąć zamknięcie z próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT). W mało prawdopodobnym przypadku oddzielenia osłony wykonanej z tworzywa sztucznego od gumowego korka nie należy ponownie montować zamknięcia. Ostrożnie zdjąć gumowy korek z próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Instrukcje dotyczące wkładania dodatkowego zamknięcia BD Hemogard

1. Wymienić zamknięcie probówki PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Przekręcić i mocno wciskać do momentu całkowitego osadzenia korka. Całkowite ponowne wprowadzenie korka jest kluczowe, aby zamknięcie pozostawało na swoim miejscu podczas postępowania z probówką PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Informacje dotyczące zamawiania

Produkt	Zawartość	Nr kat.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 kolumn wirówkowych PAXgene Spin Column, 50 kolumn wirówkowych Shredder Spin Column, probówki do przetwarzania, DNaza I wolna od RNaz, odczynniki i bufony wolne od RNaz. Do użytku w połączeniu z probówkami PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 probówek do pobierania krwi	762165
Powiązane produkty, które można zamówić w firmie QIAGEN na potrzeby zautomatyzowanej izolacji RNA w aparacie QIAcube		
Starter Pack, QIAcube	Pakiet zawiera: statywy na butelki na odczynniki (3); paski do oznaczania statywów (8); końcówki z filtrem, 200 µl (1024); końcówki z filtrem, 1000 µl (1024); końcówki z filtrem, 1000 µl, duży otwór wylotowy (1024); butelki na odczynniki o pojemności 30 ml (18); adaptory rotora (240); uchwyt do adaptera rotora	990395
Filter-Tips, 1000 µL (1024)	Jałowe, jednorazowe końcówki z filtrem, na statywie	990352
Reagent Bottles, 30 mL (6)	Butelki na odczynniki (30 ml) z wieczkami; pakiet po 6; do użytku ze statywem na butelki na odczynniki QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 × 24)	Na 240 preparacji: 240 jednorazowych adapterów rotora; do użytku z aparatem QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Statyw mieszczący 6 butelek na odczynniki o pojemności 30 ml na stole roboczym aparatu QIAcube	9026197
Rotor Adapter Holder	Uchwyt na 12 jednorazowych adapterów rotora; do użytku z aparatem QIAcube	990392

Produkt	Zawartość	Nr kat.
Powiązane produkty, które można zamówić w firmie BD na potrzeby pobierania krwi z użyciem próbek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)*		
BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set	Igła 21 G, 0,75 cala (0,8 x 19 mm), 12-calowy (305 mm) wężyk z adapterem typu luer; 50 na pudełko, 200 na opakowanie zbiorcze	367286/ 367281
BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set	Igła 21 G, 3/4 cala (0,8 x 19 mm), 12-calowy (305 mm) wężyk z adapterem typu luer; 50/pudełko, 200/opakowanie zbiorcze	367344
BD Vacutainer One-Use Holder	Opakowanie zbiorcze tylko dla średnicy 13 mm i 16 mm; 1000/opakowanie zbiorcze	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	Probówka do pobierania próbek 13 x 75 mm, pojemność 4,0 ml, z czerwonym zamknięciem BD Hemogard i papierową etykietą; 100/pudełko, 1000/opakowanie zbiorcze	368975/ 367812
BD Vacutainer EST Tube	Probówka do pobierania próbek 13 x 75 mm, pojemność 3,0 ml, z przezroczystym zamknięciem BD Hemogard i przezroczystą etykietą; 100/pudełko, 1000/opakowanie zbiorcze	362725
BD Vacutainer No Additive (Z) Tube	Probówka do pobierania próbek 13 x 75 mm, pojemność 3,0 ml, z przezroczystym zamknięciem BD Hemogard i papierową etykietą; 100/pudełko, 1000/opakowanie zbiorcze	366703

* Te akcesoria do pobierania krwi reprezentują typowe produkty, których można używać z probówkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Więcej informacji na temat tych akcesoriów, w tym sposobu ich zamawiania, przedstawiono na stronie www.preanalytix.com.

Historia zmian dokumentu

Data	Zmiany
[R1] kwiecień 2022 r.	Pierwsze wydanie zgodne z rozporządzeniem IVDR
[R2] luty 2023 r.	Zmieniono nazwę ulicy w adresie firmy PreAnalytiX GmbH z „Feldbachstrasse” na „Garstligweg 8”. W części „Informacje dotyczące zamawiania” dodano produkty firmy BD. Zaktualizowano informacje dotyczące bezpieczeństwa.

Uwagi



Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu firmy PreAnalytiX lub QIAGEN. Instrukcje obsługi i podręczniki użytkownika zestawów PreAnalytiX i QIAGEN są dostępne w witrynach www.preanalytix.com i www.qiagen.com. Można je także zamówić w serwisie technicznym lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

**Better samples
More to explore**

 **PreAnalytiX**
A QIAGEN / BD Company

Więcej informacji: www.preanalytix.com

HB-3009-002 02/2023