

Φεβρουάριος 2023

# PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA Kit (Εγχειρίδιο) Οδηγίες χρήσης



Έκδοση 3 (V3)

IVD

Για In Vitro διαγνωστική χρήση

CE

REF

762174

PreAnalytiX<sup>®</sup> GmbH  
Garstligweg 8, 8634 Hombrechtikon, Ελβετία

Κατασκευάζεται από την QIAGEN<sup>®</sup> GmbH για την PreAnalytiX  
GmbH

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
GERMANIA

R2

MAT

1130774EL

Εμπορικά σήματα: PAXgene®, PreAnalytiX® (PreAnalytiX GmbH)  
QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube® (Όμιλος QIAGEN)  
BD™, BD Vacutainer®, BD Hemogard™, Safety-Lok™ (Becton Dickinson και Company).  
Eppendorf® (Eppendorf AG)

PreAnalytiX GmbH, 8634 Hombrechtikon, CH.

© 2023 PreAnalytiX GmbH. Εκτός εάν οριστεί διαφορετικά, η επωνυμία PreAnalytiX, το λογότυπο PreAnalytiX και όλα τα υπόλοιπα εμπορικά σήματα είναι ιδιοκτησία της PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH.

### Συμφωνία περιορισμένης άδειας χρήσης για το PAXgene Blood RNA Kit

Η χρήση αυτού του προϊόντος συνεπάγεται την αποδοχή εκ μέρους του αγοραστή ή του χρήστη του προϊόντος των παρακάτω όρων:

1. Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά και μόνο όπως ορίζεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν και όπως ορίζεται στο εγχειρίδιο αυτό και μόνο με τα συστατικά που περιλαμβάνονται στο σετ. Η PreAnalytiX® δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του σετ σε οποιαδήποτε στοιχεία που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το σετ, παρά μόνον όπως περιγράφεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν, στο παρόν εγχειρίδιο και στα συμπληρωματικά πρωτόκολλα που διατίθενται στον ιστότοπο [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) και [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).
2. Εκτός από τις άδειες που αναφέρονται ρητά, η PreAnalytiX δεν εγγυάται ότι αυτό το κιτ ή/και η(οι) χρήση(εις) του δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το κιτ παρέχεται με άδεια χρήσης για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση, η εκ νέου επεξεργασία ή η μεταπώλησή τους.
4. Η PreAnalytiX αποποιείται ειδικά κάθε άλλης άδειας χρήσης, ρητής ή σιωπηρής, εκτός από εκείνες που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής και ο χρήστης του κιτ συμφωνούν να μην προβούν και να μην επιτρέψουν σε άλλο πρόσωπο να προβεί σε ενέργειες οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ή να διευκολύνουν τις ενέργειες που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα.
6. Η PreAnalytiX διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλει τις απαγορεύσεις της παρούσας σύμβασης περιορισμένης άδειας χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και πρέπει να αποζημιωθεί για όλες τις ερευνητικές και δικαστικές δαπάνες της, συμπεριλαμβανομένων των δικηγορικών αμοιβών, στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή της παρούσας σύμβασης περιορισμένης άδειας χρήσης ή οποιοσδήποτε εκ των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας της σχετικά με το κιτ ή/και τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, ανατρέξτε στον ιστότοπο [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) και [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

HB-3009-002 BD-8945 1130774EL © 2023 PreAnalytiX GmbH, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

## Διανομείς PreAnalytiX

Τα προϊόντα της PreAnalytiX κατασκευάζονται και διανέμονται από την QIAGEN και την BD για την PreAnalytiX.

# Περιεχόμενα

|   |    |
|---|----|
| Περιεχόμενα .....                               | 3  |
| Προβλεπόμενη χρήση .....                        | 6  |
| Προβλεπόμενοι χρήστες.....                      | 6  |
| Περιγραφή και αρχή λειτουργίας.....             | 7  |
| Εισαγωγή .....                                  | 7  |
| Αρχή λειτουργίας και διαδικασία.....            | 7  |
| Δειγματοληψία και σταθεροποίηση .....           | 8  |
| Απομόνωση RNA .....                             | 8  |
| Χειροκίνητη απομόνωση RNA.....                  | 9  |
| Αυτοματοποιημένη απομόνωση του RNA .....        | 11 |
| Υλικά που παρέχονται .....                      | 14 |
| Περιεχόμενα του κιτ.....                        | 14 |
| Συστατικά του κιτ.....                          | 15 |
| Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται ..... | 16 |
| Για όλα τα πρωτόκολλα.....                      | 16 |
| Για το χειροκίνητο πρωτόκολλο.....              | 16 |
| Για το αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο .....        | 17 |
| Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις.....            | 18 |
| Πληροφορίες ασφάλειας.....                      | 18 |
| Πληροφορίες σε περίπτωση έκτακτης ανάγκης.....  | 19 |
| Προφυλάξεις.....                                | 19 |
| Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων .....       | 22 |

|  |    |
|--|----|
| Σταθερότητα εντός χρήσης.....  | 22 |
| Συλλογή, φύλαξη και χειρισμός δειγμάτων .....  | 23 |
| Πρωτόκολλο: Χειροκίνητη απομόνωση του συνολικού RNA από ανθρώπινο ολικό αίμα συλλεγμένο σε σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes.....                    | 24 |
| Πρωτόκολλο: Αυτοματοποιημένη απομόνωση του συνολικού RNA από ανθρώπινο ολικό αίμα που έχει συλλεχθεί σε σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)..... | 34 |
| Περιορισμοί χρήσης του προϊόντος .....   | 43 |
| Έλεγχος ποιότητας.....   | 43 |
| Χαρακτηριστικά απόδοσης .....  | 44 |
| Δειγματοληψία και σταθεροποίηση .....  | 44 |
| Χειροκίνητη απομόνωση RNA.....   | 49 |
| Αυτοματοποιημένη απομόνωση του RNA.....  | 57 |
| Σταθερότητα απομονωμένου RNA.....  | 60 |
| Σημαντικές σημειώσεις.....   | 61 |
| Χρήση του QIAcube Connect MDx.....   | 61 |
| Έναρξη του QIAcube Connect MDx.....  | 61 |
| Εγκατάσταση πρωτοκόλλων στο QIAcube Connect MDx.....   | 63 |
| Εκτελείται φόρτωση του QIAcube Connect MDx.....  | 64 |
| Στήλες διαχωρισμού (PSC, PRC), MCT και πλαστικά υλικά QIAcube Connect MDx .....  | 68 |
| Απόρριψη.....  | 74 |
| Βιβλιογραφία .....   | 75 |
| Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων.....  | 76 |
| Σύμβολα .....  | 78 |
| Στοιχεία επικοινωνίας .....  | 80 |

|   |    |
|---|----|
| Παράρτημα Α: Γενικές υποδείξεις για τον χειρισμό του RNA.....                     | 81 |
| Παράρτημα Β: Ποσοτικοποίηση και προσδιορισμός της ποιότητας του συνολικού RNA.... | 83 |
| Παράρτημα Γ: Χειρισμός των σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) .....         | 85 |
| Πληροφορίες παραγγελίας .....   | 87 |
| Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου .....   | 89 |

# Προβλεπόμενη χρήση

Για in vitro διαγνωστική χρήση.

Το σύστημα PAXgene Blood RNA System αποτελείται από ένα σωληνάριο συλλογής αίματος (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) και ένα κιτ καθαρισμού νουκλεϊκών οξέων (PAXgene Blood RNA Kit). Προορίζεται για τη συλλογή τη φύλαξη και τη μεταφορά αίματος και τη σταθεροποίηση του ενδοκυτταρικού RNA σε ένα κλειστό σωληνάριο και την επακόλουθη απομόνωση και καθαρισμό του RNA του ξενιστή από ολικό αίμα για την RT-PCR που χρησιμοποιείται στις μοριακές διαγνωστικές εξετάσεις.

Τα χαρακτηριστικά απόδοσης για το σύστημα PAXgene Blood RNA System έχουν τεκμηριωθεί μόνο για τα μεταγραφήματα γονιδίων FOS και IL1B. Ο χρήστης είναι υπεύθυνος για την τεκμηρίωση των κατάλληλων χαρακτηριστικών απόδοσης του συστήματος PAXgene Blood RNA System για άλλα μεταγραφήματα-στόχους.

## Ενδείξεις χρήσης

Το κιτ PAXgene Blood RNA Kit χρησιμεύει στον καθαρισμό του ενδοκυτταρικού RNA από ολικό αίμα που συλλέγεται στο σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Όταν το κιτ χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT), το σύστημα παρέχει καθαρό ενδοκυτταρικό RNA από ολικό αίμα για την RT-PCR που χρησιμοποιείται στις μοριακές διαγνωστικές εξετάσεις.

## Προβλεπόμενοι χρήστες

Το προϊόν προορίζεται για χρήση από επαγγελματίες, π.χ. τεχνολόγους και ιατρούς που έχουν εκπαιδευθεί σε διαγνωστικές διαδικασίες in vitro.

Το κιτ αυτό προορίζεται για επαγγελματική χρήση.

# Περιγραφή και αρχή λειτουργίας

## Εισαγωγή

Το πρώτο βήμα σε πολλούς μοριακούς προσδιορισμούς κυτταρικού RNA είναι η λήψη δείγματος ολικού αίματος. Το κύριο πρόβλημα σε αυτές τις περιπτώσεις είναι η αστάθεια του προφίλ του κυτταρικού RNA in vitro. Έρευνες από την PreAnalytiX έδειξαν ότι ο αριθμός αντιγράφων, για μεμονωμένα είδη mRNA στο ολικό αίμα, μπορεί να αλλάξει περισσότερο από το 1.000-πλάσιο κατά τη διάρκεια της φύλαξης ή της μεταφοράς σε θερμοκρασία δωματίου (Rainen et al., 2002). Αυτό οφείλεται τόσο στην ταχεία αποδόμηση του RNA όσο και στην επαγόμενη έκφραση ορισμένων γονιδίων, μετά τη λήψη αίματος. Τέτοιου είδους αλλαγές του προφίλ έκφρασης RNA εμποδίζουν την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων από μελέτες έκφρασης γονιδίων. Για το λόγο αυτό, μία μέθοδος που διατηρεί το προφίλ έκφρασης RNA κατά τη διάρκεια και μετά τη λήψη αίματος θεωρείται ουσιαστική για ακριβείς αναλύσεις έκφρασης γονιδίων στο ολικό αίμα ανθρώπου.

## Αρχή λειτουργίας και διαδικασία

Η PreAnalytiX ανέπτυξε ένα σύστημα το οποίο καθιστά δυνατή τη λήψη, τη σταθεροποίηση, τη φύλαξη και τη μεταφορά δειγμάτων ολικού αίματος ανθρώπου, καθώς και ένα γρήγορο και αποτελεσματικό πρωτόκολλο για την απομόνωση του ενδοκυτταρικού RNA. Το σύστημα προϋποθέτει τη χρήση σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) για τη λήψη αίματος και τη σταθεροποίηση του RNA, και του κιτ PAXgene Blood RNA Kit για την επακόλουθη χειροκίνητη ή αυτοματοποιημένη απομόνωση του RNA. Και τα δύο πρωτόκολλα, χειροκίνητο και αυτοματοποιημένο, παρέχουν ουσιαστικά ισάξια εκτέλεση σχετικά με την ποιότητα και απόδοση του RNA. Στο παρόν εγχειρίδιο περιέχονται τα δεδομένα απόδοσης για το χειροκίνητο πρωτόκολλο (που ξεκινούν από τη σελίδα 49) και για το αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο (που ξεκινούν από τη σελίδα 57).

Το σύστημα PAXgene Blood RNA System παρέχει τη δυνατότητα τυποποίησης των βημάτων της προαναλυτικής ροής εργασιών από τη συλλογή δειγμάτων αίματος έως την απομόνωση του κυτταρικού RNA σύμφωνα με το πρότυπο ISO 20186-1:2019, Μοριακές in vitro διαγνωστικές εξετάσεις — Προδιαγραφές για διαδικασίες πριν από την εξέταση για φλεβικό ολικό αίμα — Μέρος 1: Απομονωμένο κυτταρικό RNA.

## **Δειγματοληψία και σταθεροποίηση**

Τα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) περιέχουν ιδιόκτητο αντιδραστήριο σταθεροποίησης RNA. Αυτό το πρόσθετο προστατεύει τα μόρια RNA από την αποδόμηση μέσω της RNάσης και μειώνει στο ελάχιστο αλλαγές ex vivo στην έκφραση γονιδίων. Τα χαρακτηριστικά απόδοσης του συστήματος PAXgene Blood RNA System έχουν τεκμηριωθεί για τα μεταγραφήματα γονιδίων FOS και IL1B, τα οποία παρουσιάζονται από τη σελίδα 44.

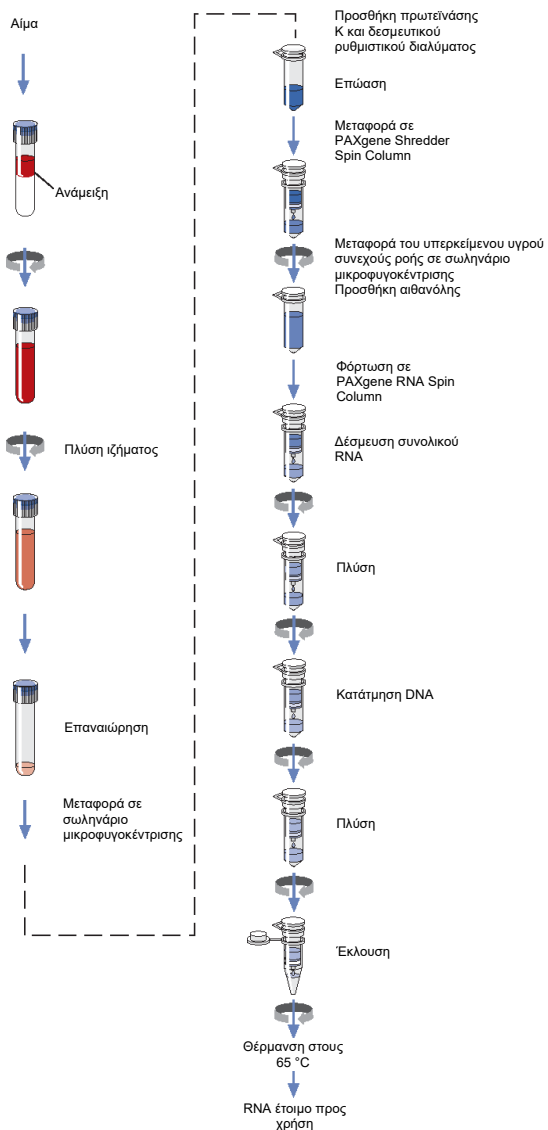
## **Απομόνωση RNA**

Το kit PAXgene Blood RNA Kit προορίζεται για την απομόνωση του συνολικού RNA από 2,5 ml ανθρώπινου ολικού αίματος που συλλέγεται σε ένα σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Η διαδικασία είναι απλή και μπορεί να εκτελεστεί με χρήση χειροκίνητων ή αυτοματοποιημένων διαδικασιών (βλέπε Εικόνα 1 ή Εικόνα 3, σελίδα 10 ή 12 αντίστοιχα). Και στα δύο πρωτόκολλα, η απομόνωση του RNA αρχίζει με ένα στάδιο φυγοκέντρισης, για την ίζηματοποίηση των νουκλεϊκών οξέων στο σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Το ίζημα πλένεται και επαναιωρείται και ακολουθεί η χειροκίνητη ή αυτοματοποιημένη απομόνωση του RNA. Ουσιαστικά και τα δύο πρωτόκολλα ακολουθούν τα ίδια στάδια με τα ίδια συστατικά του kit.



## Χειροκίνητη απομόνωση RNA

Συγκεκριμένα, το επαναιωρημένο ίζημα επωάζεται σε βελτιστοποιημένα ρυθμιστικά διαλύματα με πρωτεΐνάση K (PK), για την κατάτμηση των πρωτεϊνών. Μία πρόσθετη φυγοκέντριση, μέσω στήλης διαχωρισμού PAXgene Shredder (PSC), αποσκοπεί στην ομογενοποίηση του κυτταρολύματος και την απομάκρυνση των υπολειμμάτων των κατακερματισμένων κυττάρων· το υπερκείμενο υγρό του κλάσματος συνεχούς ροής μεταφέρεται σε ένα νέο σωληνάριο μικροφυγοκέντρισης (MCT). Με την αιθανόλη που προστίθεται στη συνέχεια, ρυθμίζονται κατάλληλες συνθήκες δέσμευσης και το παράγωγο λύσης εφαρμόζεται σε στήλη διαχωρισμού PAXgene RNA (PRC). Με την ακόλουθη σύντομη φυγοκέντριση, δεσμεύεται επιλεκτικά RNA στη μεμβράνη διοξειδίου του πυριτίου PAXgene, ενώ οι ουσίες επιμόλυνσης διέρχονται μέσω αυτής. Υπολειπόμενες ουσίες επιμόλυνσης απομακρύνονται με πολλαπλά αποτελεσματικά βήματα πλύσης. Μεταξύ πρώτης και δεύτερης πλύσης, η μεμβράνη υποβάλλεται σε επεξεργασία με DNάση I (RNFD), για την απομάκρυνση τυχόν δεσμευμένων ιχνοποσοτήτων DNA. Μετά τα βήματα πλύσης, το RNA εκλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης (BR5) και μετουσιώνεται μέσω θέρμανσης. Τα χαρακτηριστικά απόδοσης της χειροκίνητης απομόνωσης RNA με τη χρήση του PAXgene Blood RNA System παρουσιάζονται στη σελίδα 49.



Εικόνα 1: Η χειροκίνητη διαδικασία PAXgene Blood RNA.

## Αυτοματοποιημένη απομόνωση του RNA

Η απομόνωση του RNA αίματος είναι αυτοματοποιημένη στο QIAGEN QIAcube Connect MDx. Το πρωτοποριακό όργανο χρησιμοποιεί προηγμένη τεχνολογία για την επεξεργασία στηλών διαχωρισμού QIAGEN, επιτρέποντας την ομαλή ενσωμάτωση αυτοματοποιημένης προετοιμασίας δειγμάτων χαμηλής διεκπεραιωτικής ικανότητας στη ροή εργασιών του εργαστηρίου. Η προετοιμασία δειγμάτων με τη χρήση του QIAcube Connect MDx ακολουθεί τα ίδια βήματα όπως και στη χειροκίνητη διαδικασία (δηλ. λύση, πρόσδεση, πλύση και έκλουση) και μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση του ίδιου PAXgene Blood RNA Kit.

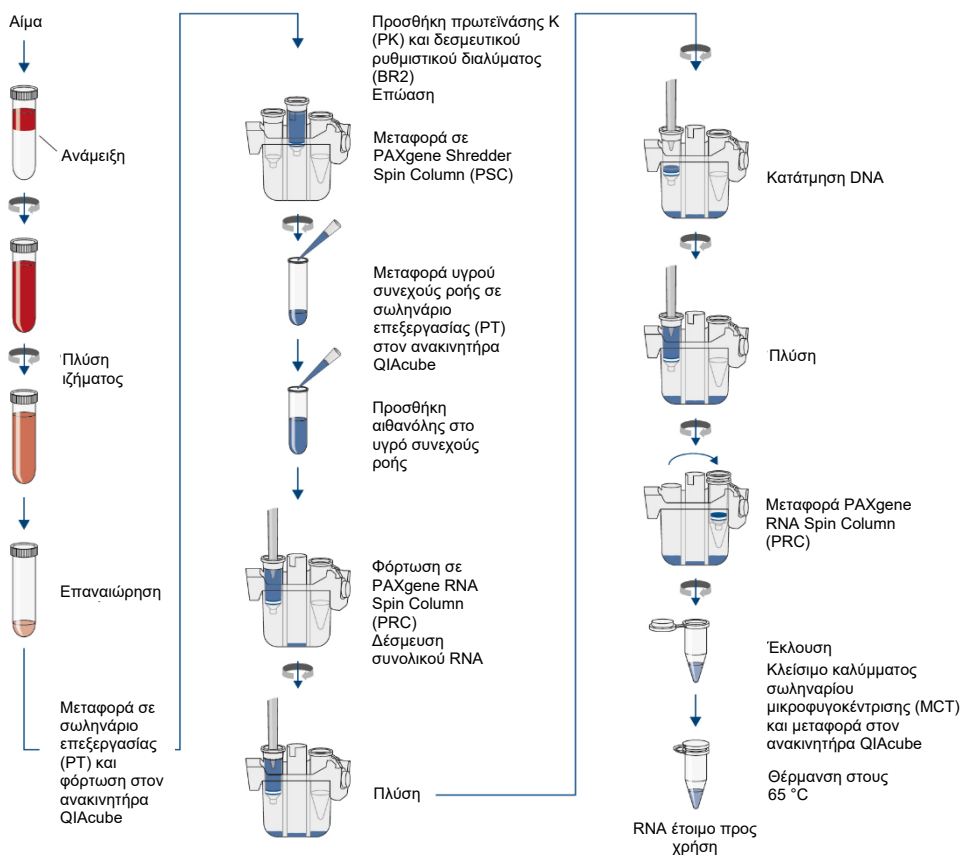


Εικόνα 2: QIAcube Connect MDx.



Το QIAGEN QIAcube Connect MDx δεν είναι διαθέσιμο σε όλες τις χώρες. Για περισσότερες λεπτομέρειες, επικοινωνήστε με το Τμήμα Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN.

Το αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο απομόνωσης RNA αποτελείται από 2 μέρη (ή πρωτόκολλα), το «PAXgene Blood RNA Part A» (από το αίμα στο σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube έως την έκλυση) και το «PAXgene Blood RNA Part B» (μετά την έκλυση έως το έτοιμο για χρήση RNA), με σύντομη χειροκίνητη παρέμβαση μεταξύ των 2 μερών (βλέπε Εικόνα 3).




**Εικόνα 3: Η αυτοματοποιημένη διαδικασία PAXgene Blood RNA.**

Το ίζημα νουκλεϊκού οξέος που έχει φυγοκεντριστεί, πλυθεί και επαναιωρηθεί (βλέπε «Απομόνωση RNA», σελίδα 8) μεταφέρεται από το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) στα σωληνάρια επεξεργασίας (PT), τα οποία τοποθετούνται εντός της μονάδας θερμομίκτη στο τραπέζι εργασίας QIAcube Connect MDx. Ο χειριστής επιλέγει και ξεκινά το πρωτόκολλο «PAXgene Blood RNA Part A» από το μενού. Το QIAcube Connect MDx εκτελεί τα στάδια του πρωτοκόλλου μέχρι την έκλυση του RNA στο ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης (BR5). Ο χειριστής μεταφέρει τα MCT που περιέχουν το καθαρό RNA εντός της μονάδας θερμομίκτη του QIAcube Connect MDx. Ο χειριστής επιλέγει και ξεκινά το πρωτόκολλο «PAXgene Blood RNA Part B» από το μενού και η μετουσίωση μέσω θέρμανσης εκτελείται από το QIAcube Connect MDx. Τα χαρακτηριστικά απόδοσης της αυτοματοποιημένης μόνωσης του RNA με τη χρήση του συστήματος PAXgene Blood RNA System στο QIAcube Connect MDx παρουσιάζονται στη σελίδα 57.

# Υλικά που παρέχονται

## Περιεχόμενα του ΚΙΤ

| PAXgene Blood RNA Kit (κιτ PAXgene Blood RNA)<br>Αρ. Καταλόγου<br>Αριθμός συσκευιών συλλογής |   |   | (50)<br>762174<br>50              |
|--|---|---|-----------------------------------|
| Όνομα στοιχείου  | Περιγραφή   | Σύμβολο   | Ποσότητα                          |
| BR1  | Resuspension Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα επαναϊώρησης)   | RES   BUF   | 20 ml                             |
| BR2  | Binding Buffer (Δεσμευτικό ρυθμιστικό διάλυμα)*   | BIND   BUF  | 18 ml                             |
| BR3  | Wash Buffer 1 (Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 1)*  | WASH   BUF   1  | 45 ml                             |
| BR4  | Wash Buffer 2 (Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2)<br>(συμπυκνωμένο διάλυμα) <sup>†</sup>                            | WASH   BUF   2   CONC   | 11 ml                             |
| BR5  | Elution Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης)  | ELU   BUF   | 6 ml                              |
| RNFW   | RNase-free Water (bottle) (Νερό ελεύθερο RNάσης [φιάλη])  | PEL   WASH  | 2 × 125 ml                        |
| PK   | Proteinase K (green lid) (Πρωτεϊνάση Κ [πράσινο κάλυμμα])   | PROTK   | 2 × 1,4 ml                        |
| PRC  | PAXgene RNA Spin Columns (red) (Στήλες διαχωρισμού PAXgene RNA [κόκκινο]) <sup>‡</sup>                        | PAXgene   RNA   COL   | 5 × 10                            |
| PT   | Processing tubes (Σωληνάρια επεξεργασίας) (2 ml) <sup>§</sup>   | PROC   TUBE   | 6 × 50                            |
| Hemogard™  | Secondary BD Hemogard Closures (Δευτερεύοντα κλείστρα BD Hemogard)  | SEC   CLOS  | 50                                |
| MCT  | Microcentrifuge tubes (Σωληνάρια μικροφυγοκέντρησης) (1,5 ml) <sup>§</sup>                                    | MIC   TUBE  | 3 × 50, 1 × 10                    |
| RNFD   | DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNάση I, ελεύθερη RNάσης [λυοφιλοποιημένη])                                | DNA   REM   | 1.500 μονάδες Kunitz <sup>¶</sup> |
| RDD  | DNA Digestion Buffer (white lid) (Ρυθμιστικό διάλυμα κατάτμησης DNA [λευκό κάλυμμα])                          | DNA   DIG   BUF   | 2 × 2 ml                          |
| DRB  | DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (Ρυθμιστικό διάλυμα επαναϊώρησης DNάσης [σωληνάριο, μοβ κάλυμμα]) | DNase   RES   BUF   | 2 ml                              |
| PSC  | PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (Στήλες διαχωρισμού PAXgene Shredder [μοβ]) <sup>‡</sup>                | PAXgene   SHRED   COL   | 5 × 10                            |
| Εγχειρίδιο   | PAXgene Blood RNA Kit Handbook (Version 3) [Εγχειρίδιο κιτ PAXgene Blood RNA Kit (Έκδοση 3)]                  |  | 1                                 |

\* Μη συμβατό με απολυμαντικά αντιδραστήρια που περιέχουν χλωρίνη. Περιέχει ένα άλας γουανιδίνης. Βλ. σελίδα 18 για Πληροφορίες ασφάλειας.

<sup>†</sup> Το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2 (BR4) παρέχεται σε συμπυκνωμένη μορφή. Πριν από την πρώτη χρήση, προσθέστε στη φιάλη 4 όγκους αιθανόλης (96–100% v/v, βαθμός καθαρότητας p.a.), όπως υποδεικνύεται στη φιάλη για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας.

<sup>‡</sup> Κάθε στήλη παρέχεται σε συσκευασία με κυψέλες που προορίζεται για μία μόνο χρήση. Για τις οδηγίες απόρριψης, ανατρέξτε στις πληροφορίες ασφάλειας.

<sup>§</sup> Τα σωληνάρια διατίθενται σε πλαστικές σακούλες και κάθε σωληνάριο προορίζεται για μία μόνο χρήση. Για τις οδηγίες απόρριψης, ανατρέξτε στις πληροφορίες ασφάλειας.

<sup>¶</sup> Οι μονάδες Kunitz είναι μια κοινή μονάδα μέτρησης της DNάσης I, η οποία ορίζεται ως η ποσότητα DNάσης I που προκαλεί αύξηση της  $A_{260}$  κατά 0,001 ανά λεπτό ανά χιλιοστόλιτρο στους 25°C, pH 5,0, με υψηλά πολυμερισμένο DNA ως υπόστρωμα (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* 33, 349 και 363).

## Συστατικά του Kit

| Όνομα στοιχείου | Περιγραφή  | Ενεργό συστατικό                   | Συγκέντρωση                             |
|-----------------|--|------------------------------------|---|
| BR1             | Resuspension Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα επαναιώρησης)  | Καμία                              | -                                       |
| BR2             | Binding Buffer (Δεσμευτικό ρυθμιστικό διάλυμα)   | Θειοκυανική γουανιδίνη             | ≥ 30 έως < 50% w/w                      |
| BR3             | Wash Buffer 1 (Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 1)  | Θειοκυανική γουανιδίνη<br>Αιθανόλη | ≥ 10 έως < 20% w/w<br>≥ 3 έως < 10% w/w |
| BR4             | Wash Buffer 2 (Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2)<br>(συμπυκνωμένο διάλυμα)  | Καμία                              | -                                       |
| BR5             | Elution Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης)   | Καμία                              | -                                       |
| RNFW            | RNase-free Water (bottle) (Νερό ελεύθερο RNάσης [φιάλη])   | Καμία                              | -                                       |
| PK              | Proteinase K (green lid)<br>(Πρωτεϊνάση K [πράσινο κάλυμμα])   | Proteinase K                       | ≥ 1 έως < 3% w/w                        |
| RNFD            | DNase I, RNase-free (lyophilized)<br>(DNάση I, ελεύθερη RNάσης [λυοφιλοποιημένη])                                | DNάση                              | ≥ 90 έως ≤ 100% w/w                     |
| RDD             | DNA Digestion Buffer (white lid)<br>(Ρυθμιστικό διάλυμα κατάτμησης DNA [λευκό κάλυμμα])                          | Καμία                              | -                                       |
| DRB             | DNase Resuspension Buffer<br>(tube, lilac lid) (Ρυθμιστικό διάλυμα επαναιώρησης DNάσης [σωληνάριο, μοβ κάλυμμα]) | Καμία                              | -                                       |

# Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Κατά την εργασία με χημικές ουσίες, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (Safety Data Sheets, SDS), τα οποία διατίθενται από τον προμηθευτή του προϊόντος.

## Για όλα τα πρωτόκολλα

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX, αρ. κατ. 762165)
- Αιθανόλη (96–100% v/v, βαθμός καθαρότητας p.a.)
- Πιπέτες\* (10  $\mu$ l–4 ml)
- Στείρα ρύγχη πιπετών, με φραγμό αερολυμάτων, ελεύθερα RNάσης<sup>†</sup>
- Ογκομετρικός κύλινδρος<sup>‡</sup>
- Φυγόκεντρος\* με δυνατότητα 3.000–5.000  $\times$  g εξοπλισμένη με ρότορα ταλαντευόμενου κάδου για τη συγκράτηση των σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Αναδευτήρας vortex\*
- Θρυμματισμένος πάγος
- Ανεξίτηλος μαρκαδόρος για την επισήμανση

## Για το χειροκίνητο πρωτόκολλο

- Μικροφυγόκεντρος\* μεταβαλλόμενης ταχύτητας με δυνατότητα εύρους τουλάχιστον 1.000–8.000  $\times$  g, παρότι εφαρμόζονται και χαμηλότερες και υψηλότερες δυνάμεις g (ανατρέξτε στα στάδια του πρωτοκόλλου για λεπτομέρειες), και εξοπλισμένη με ρότορα για MCT των 2 ml

\* Διασφαλίστε ότι οι συσκευές και τα όργανα ελέγχονται, συντηρούνται και βαθμονομούνται τακτικά, σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή.

<sup>†</sup> Διασφαλίστε ότι έχετε εξοικειωθεί με τις κατευθυντήριες οδηγίες χειρισμού του RNA (Παράρτημα A, σελίδα 75).

<sup>‡</sup> Για την προσθήκη αιθανόλης στο συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα BR4.



- Επωαστήρας με ανακινητήρα\* με δυνατότητα επώασης στους 55°C και 65°C και ανακίνησης σε  $\geq 400$  rpm, χωρίς να υπερβαίνει τις 1.400 rpm (π.χ. Eppendorf® Thermomixer Compact ή ισοδύναμος)

## Για το αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο

- Ψαλίδι
- QIAcube Connect MDx\* (QIAGEN, αρ. κατ. 9003070)

### Αναλώσιμα QIAcube Connect MDx:

- Filter-Tips, 1.000  $\mu$ l (1024) (QIAGEN, αρ. κατ. 990352)†
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, αρ. κατ. 990393)†
- Rotor Adapters (10  $\times$  24) (QIAGEN, αρ. κατ. 990394)†

### Εξαρτήματα QIAcube Connect MDx:

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, αρ. κατ. 990392)†

### Δέσμη υπηρεσιών QIAcube Connect MDx:

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

\* Διασφαλίστε ότι η συσκευή και το όργανο ελέγχονται, συντηρούνται και βαθμονομούνται τακτικά, σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή.

† Συμπεριλαμβάνεται επίσης στο Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, αρ. κατ. 990395).

# Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για τους πελάτες στην Ευρωπαϊκή Ένωση: λάβετε υπόψη ότι πρέπει να αναφέρετε στον κατασκευαστή και στην αρμόδια αρχή του κράτους μέλους στο οποίο υπάγεται ο χρήστης ή/και ο ασθενής, οποιαδήποτε σοβαρά συμβάντα σχετίζονται με τη συσκευή.

Για τους πελάτες εκτός της Ευρωπαϊκής Ένωσης, λάβετε υπόψη ότι ενδέχεται να χρειαστεί να ανατρέξετε στους τοπικούς κανονισμούς για την αναφορά σοβαρών συμβάντων που σχετίζονται με το προϊόν στον κατασκευαστή ή/και στον εξουσιοδοτημένο αντιπρόσωπό του και στη ρυθμιστική αρχή στην οποία υπάγεται ο χρήστης ή/και ο ασθενής.

## Πληροφορίες ασφάλειας

Κατά την εργασία με χημικές ουσίες και βιολογικά επικίνδυνα υλικά, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (Safety Data Sheets, SDS). Διατίθενται στο διαδίκτυο σε εύχρηστη και συμπιεσμένη μορφή PDF, στην ιστοσελίδα [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), όπου μπορείτε να βρείτε, να εμφανίσετε και να εκτυπώσετε τα SDS για όλα τα κιτ της QIAGEN καθώς και για τα συστατικά τους.

- Όλες οι χημικές ουσίες και τα βιολογικά υλικά είναι εν δυνάμει επικίνδυνα. Τα δείγματα αίματος είναι εν δυνάμει μολυσματικά και πρέπει να αντιμετωπίζονται ως βιολογικά επικίνδυνα υλικά.
- Τα βιολογικά επικίνδυνα απόβλητα και τα απόβλητα των κιτ πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες ασφαλείας.

# Πληροφορίες σε περίπτωση έκτακτης ανάγκης

CHEMTREC

Εκτός ΗΠΑ και Καναδά +1 703-527-3887

## Προφυλάξεις

Κατά τη χρήση δειγμάτων αίματος, λαμβάνετε γενικές προφυλάξεις για την αποφυγή του κινδύνου πιθανής έκθεσης σε αιματογενώς μεταδιδόμενα παθογόνα (π.χ. HIV, ηπατίτιδα Β και άλλοι αιματογενώς μεταδιδόμενοι ιοί). Χρησιμοποιείτε γάντια, ποδιές, προστατευτικά για τα μάτια, άλλα μέσα ατομικής προστασίας και μηχανικούς ελέγχους για προστασία από την έκθεση στο αίμα. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (Safety Data Sheets, SDS). Διατίθενται στο διαδίκτυο σε εύχρηστη και συμπιεσμένη μορφή PDF στον ιστότοπο [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com), όπου μπορείτε να βρείτε, να δείτε και να εκτυπώσετε τα SDS για αυτό το kit.

### ΠΡΟΣΟΧΗ



ΜΗΝ προσθέτετε λευκαντικά χλωρίου ή όξινα διαλύματα απευθείας στα υγρά απορρίμματα της παρασκευής δειγμάτων.

Το δεσμευτικό ρυθμιστικό διάλυμα (BR2) και το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 1 (BR3) περιέχουν θειοκυανική γουανιδίνη, η οποία κατά την επαφή με λευκαντικό χλωρίου αντιδρά έντονα. Εάν χυθεί δεσμευτικό ρυθμιστικό διάλυμα (BR2) ή ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 1 (BR3), καθαρίστε με κατάλληλο απορρυπαντικό εργαστηρίου και νερό. Εάν χυθεί υγρό που περιέχει δυνητικά μολυσματικούς παράγοντες, καθαρίστε την προσβεβλημένη περιοχή αρχικά με απορρυπαντικό εργαστηρίου και νερό και, στη συνέχεια, με 1% (v/v) υποχλωριώδες νάτριο (χλωρίνη).

Το μείγμα σταθεροποιητικού διαλύματος RNA και αίματος από το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) μπορεί να απολυμανθεί χρησιμοποιώντας 1 όγκο διαλύματος λευκαντικού χλωρίου του εμπορίου (5% υποχλωριώδες νάτριο) ανά 9 όγκους μείγματος σταθεροποιητικού διαλύματος RNA και αίματος.

Τα απορρίμματα που προκύπτουν κατά την παρασκευή των δειγμάτων, π.χ. τα υπερκείμενα υγρά από τα στάδια φυγοκέντρισης στη διαδικασία απομόνωσης του RNA, πρέπει να θεωρούνται πάντα δυνητικά μολυσματικά. Για την απόρριψη βιολογικών υλικών, Χρησιμοποιείτε δοχεία για βιολογικά επικίνδυνα υλικά. Η απόρριψη πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις διαδικασίες του κέντρου σας.

Ορισμένα συστατικά του PAXgene Blood RNA Kit προορίζονται για μία μόνο χρήση. Για πληροφορίες σχετικά με μεμονωμένα συστατικά, ανατρέξτε στην ενότητα Περιεχόμενα του κιτ στη σελίδα 14.

Οι ακόλουθες δηλώσεις κινδύνου και προφύλαξης ισχύουν για τα συστατικά του PAXgene Blood RNA Kit. Βλ. το *Εγχειρίδιο σωληναρίου PAXgene Blood RNA Tube* για πληροφορίες ασφάλειας σχετικά με τα σωληνάκια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

#### Buffer BR2



Περιέχει: θειοκυανική γουανιδίνη. Κίνδυνος! Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης. Μπορεί να είναι επιβλαβές σε επαφή με το δέρμα ή σε περίπτωση εισπνοής. Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Επιβλαβές για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις. Σε επαφή με οξέα ελευθερώνονται πολύ τοξικά αέρια. Αποφύγετε την ελευθέρωσή του στο περιβάλλον. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να

ξεπλύνετε. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ έκθεσης ή πιθανής έκθεσης: Καλέστε αμέσως το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή έναν γιατρό. Απορρίψτε το περιεχόμενο/ τον περιέκτη σε εγκεκριμένη μονάδα διάθεσης αποβλήτων.

### Buffer BR3



Περιέχει: αιθανόλη, θειοκυανική γουανιδίνη. Κίνδυνος! Υγρό και ατμοί εύφλεκτα. Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Σε επαφή με οξέα ελευθερώνονται πολύ τοξικά αέρια. Μακριά από θερμότητα/σπινθήρες/γυμνές φλόγες/θερμές επιφάνειες. Απαγορεύεται το κάπνισμα. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλύνετε. Καλέστε αμέσως το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή έναν γιατρό.

### DNase I



Περιέχει: DNάση. Κίνδυνος! Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση. Μπορεί να προκαλέσει αλλεργία ή συμπτώματα άσθματος ή δύσπνοια σε περίπτωση εισπνοής. Αποφεύγετε να αναπνέετε σκόνη. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο. Φοράτε προστατευτικά για την αναπνοή. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ έκθεσης ή πιθανής έκθεσης: Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή έναν γιατρό. Απομακρύνετε το άτομο σε σημείο με καθαρό αέρα και τοποθετήστε το ώστε να διευκολύνεται η αναπνοή. Πλύνετε τα μολυσμένα ενδύματα πριν τα επαναχρησιμοποιήσετε.

# Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων

Οι στήλες διαχωρισμού PAXgene RNA (PRC), οι στήλες διαχωρισμού PAXgene Shredder (PSC), η πρωτεΐνάση K (PK) και τα ρυθμιστικά διαλύματα (BR1, BR2, BR3, BR4 και BR5) θα πρέπει να φυλάσσονται υπό ξηρές συνθήκες στη θερμοκρασία που αναγράφεται στην ετικέτα του κιτ.

Το RNase-Free DNase Set, το οποίο περιέχει DNάση I (RNFD), ρυθμιστικό διάλυμα κατάτμησης DNA (RDD) και ρυθμιστικό διάλυμα επαναιώρησης DNάσης (DRB), αποστέλλεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Αμέσως μετά την παραλαβή, αποθηκεύστε όλα τα συστατικά του RNase-Free DNase Set στη θερμοκρασία που αναφέρεται στην ετικέτα. Εάν φυλαχθεί σωστά, το κιτ παραμένει σταθερό έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο κουτί του.

Πρέπει να δίδεται προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στα κουτιά και τις επικέτες όλων των συστατικών. Μη χρησιμοποιείτε το περιεχόμενο της συσκευασίας εάν έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης ή δεν έχουν ληφθεί τα σωστά μέτρα αποθήκευσης.

## Σταθερότητα εντός χρήσης

Μετά την πρώτη χρήση του κιτ, τα αντιδραστήρια παραμένουν σταθερά στις αρχικές φιάλες στις θερμοκρασίες και έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του κουτιού του κιτ.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την πλήρωση των φιαλών αντιδραστηρίων του QIAcube Connect MDx παραμένουν σταθερά για 3 μήνες όταν αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C).

Η ανασυσταμένη DNάση I (RNFD) παραμένει σταθερή στους 2–8°C για 6 εβδομάδες στο αρχικό γυάλινο φιαλίδιο (αρχικό διάλυμα).

Υποπολλαπλάσια μίας χρήσης του αρχικού διαλύματος σε MCT των 1,5 ml (παρέχονται με το κιτ) παραμένουν σταθερά για 9 μήνες όταν αποθηκεύονται στους –20°C. Μετά την τήξη, τα υποπολλαπλάσια μίας χρήσης παραμένουν σταθερά για 6 εβδομάδες όταν αποθηκεύονται στους 2–8°C.

## **Συλλογή, φύλαξη και χειρισμός δειγμάτων**

Το PAXgene Blood RNA Kit χρησιμοποιείται με ολικό αίμα που συλλέγεται στα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes. Το αίμα πρέπει να συλλέγεται εντός των σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) σύμφωνα με τις οδηγίες που αναφέρονται στο Εγχειρίδιο σωληναρίου PAXgene Blood RNA Tube. Εάν είναι απαραίτητο, στο Παράρτημα Γ (σελίδα 85) μπορείτε να βρείτε υποδείξεις σχετικά με τον χειρισμό των σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Όλα τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά επικίνδυνα. Τα χαρακτηριστικά απόδοσης για το σύστημα PAXgene Blood RNA System έχουν τεκμηριωθεί για τα μεταγραφήματα γονιδίων FOS και IL1B, τα οποία παρουσιάζονται στις σελίδες 45–48.

# Πρωτόκολλο: Χειροκίνητη απομόνωση του συνολικού RNA από ανθρώπινο ολικό αίμα συλλεγμένο σε σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes

## Σημαντικές υποδείξεις πριν από την έναρξη

- Βεβαιωθείτε ότι το κουτί του kit είναι άθικτο και χωρίς ζημιές και ότι κανένα από τα ρυθμιστικά διαλύματα δεν παρουσιάζει διαρροές. Μη χρησιμοποιείτε κανένα kit που παρουσιάζει ζημιές.
- Κατά τη χρήση πιπέτας, βεβαιωθείτε για τη ρύθμιση του σωστού όγκου και ότι το υγρό αναρροφάται και διανέμεται προσεκτικά και πλήρως.
- Για να αποφύγετε τη μεταφορά δείγματος σε λανθασμένο σωληνάριο ή λανθασμένη στήλη διαχωρισμού, διασφαλίστε ότι όλα τα σωληνάρια και οι στήλες διαχωρισμού έχουν επισημανθεί σωστά με ανεξίτηλο μαρκαδόρο. Επισημάνετε το κάλυμμα και το σώμα κάθε σωληναρίου (PT, MCT). Στις στήλες διαχωρισμού, επισημάνετε το σώμα του σωληναρίου PT. Κλείστε κάθε σωληνάριο ή στήλη διαχωρισμού μετά τη μεταφορά υγρού.
- Το πιπίλισμα δειγμάτων ή ρυθμιστικών διαλυμάτων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μπορεί να μειώσει την απόδοση και καθαρότητα του RNA.
- Εάν δεν υποδεικνύεται διαφορετικά, όλα τα στάδια του πρωτοκόλλου, συμπεριλαμβανομένων και αυτών της φυγοκέντρησης, πρέπει να εκτελεστούν σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C).

Εξαιτίας της υψηλής ευαισθησίας των μεθόδων ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων, κατά τον χειρισμό των δειγμάτων είναι απαραίτητες οι ακόλουθες προφυλάξεις για την αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης:

- Μεταφέρετε προσεκτικά με πιπέτα το δείγμα στη στήλη διαχωρισμού (PSC, PRC) χωρίς να υγρανθεί το χείλος της στήλης.



- Αλλάζετε πάντα τα ρύγχη πιπετών μετά από κάθε μεταφορά υγρού. Χρησιμοποιείτε ρύγχη πιπετών με φραγμό αερολυμάτων.
- Αποφύγετε την επαφή του ρύγχους της πιπέτας με τη μεμβράνη της στήλης διαχωρισμού (PSC, PRC).
- Μετά την ανάδευση σε vortex ή τη θέρμανση ενός σωληναρίου MCT, φυγοκεντρίστε το σύντομα για απομάκρυνση των σταγονιδίων από το εσωτερικό του καλύμματος.
- Φοράτε γάντια σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Αντικαταστήστε αμέσως τα γάντια, εάν έλθουν σε επαφή με το δείγμα.
- Κλείστε τη στήλη διαχωρισμού (PSC, PRC) πριν την τοποθετήσετε στη μικροφυγόκεντρο. Φυγοκεντρίστε όπως περιγράφεται στη διαδικασία.
- Ανοίγετε μόνο μία στήλη διαχωρισμού (PSC, PRC) κάθε φορά και αποφεύγετε τον σχηματισμό αερολυμάτων.
- Για αποτελεσματική παράλληλη επεξεργασία πολλαπλών δειγμάτων, γεμίστε ένα στατώ με σωληνάρια PT στα οποία μπορούν να μεταφερθούν οι στήλες διαχωρισμού (PSC, PRC) μετά τη φυγοκέντριση. Απορρίψτε τα χρησιμοποιημένα σωληνάρια PT που περιέχουν το υγρό συνεχούς ροής και τοποθετήστε τις στήλες διαχωρισμού (PRC, PSC) στα νέα σωληνάρια PT πριν από τη μεταφορά τους πίσω στη μικροφυγόκεντρο.

## **Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη**

- Το αίμα πρέπει να συλλέγεται εντός των σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) σύμφωνα με τις οδηγίες που αναφέρονται στο *Εγχειρίδιο σωληναρίου PAXgene Blood RNA Tube*. Εάν είναι απαραίτητο, στο Παράρτημα Γ (σελίδα 85) μπορείτε να βρείτε υποδείξεις σχετικά με τον χειρισμό των σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

- Διασφαλίστε ότι τα σωληνάκια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) επωάζονται το λιγότερο για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου μετά τη λήψη αίματος, για να εξασφαλίσετε την πλήρη λύση των κυττάρων του αίματος και την κατακρήμνιση του RNA. Επώαση του σωληναρίου PAXgene Blood RNA Tube (BRT) κατά τη διάρκεια της νύχτας μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερες αποδόσεις. Εάν η αρχική επώαση του αίματος σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες δεν έγινε πριν από την αποθήκευση στους 2–8°C, –20°C ή –70°C, αφήστε πρώτα το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) να περιέλθει σε θερμοκρασία δωματίου και, στη συνέχεια, επώαστε το σε αυτήν τη θερμοκρασία για 2 ώρες πριν από την έναρξη της διαδικασίας.
- Διαβάστε τις πληροφορίες ασφάλειας στη σελίδα 18.
- Διαβάστε τις κατευθυντήριες οδηγίες σχετικά με τον χειρισμό του RNA (Παράρτημα A, σελίδα 81).
- Διασφαλίστε ότι όλα τα όργανα, όπως οι πιπέτες και ο επωαστήρας με ανακινήρα, ελέγχονται και βαθμονομούνται τακτικά, σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή.
- Ο επωαστήρας με ανακινήρα απαιτείται για τα στάδια 5 και 20. Ρυθμίστε τη θερμοκρασία του επωαστήρα με ανακινήρα στους 55°C.
- Το δεσμευτικό ρυθμιστικό διάλυμα (BR2) μπορεί κατά την αποθήκευση να σχηματίσει ίζημα. Εάν είναι αναγκαίο, μπορείτε να το διαλύσετε με θέρμανση στους 37°C.
- Το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2 (BR4) παρέχεται σε συμπυκνωμένη μορφή. Πριν από την πρώτη χρήση, προσθέστε στη φιάλη 4 όγκους αιθανόλης (96–100% v/v, βαθμός καθαρότητας p.a.), όπως υποδεικνύεται στη φιάλη για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας.

- Πριν από την πρώτη χρήση του RNase-Free DNase Set, παρασκευάστε ένα αρχικό διάλυμα DNάσης I. Διαλύστε τη στερεή DNάση I (RNFD, 1.500 μονάδες Kunitz)\* σε 550 µl ρυθμιστικού διαλύματος επαναιώρησης DNάσης (DRB), το οποίο παρέχεται με το σετ. Προσέξτε ώστε κατά το άνοιγμα του φιαλιδίου να μη χαθεί καμία ποσότητα DNάσης I (RNFD). Η ανασυσταμένη DNάση I (RNFD) δεν επιτρέπεται να αναδευτεί σε συσκευή vortex. Η DNάση I είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στη φυσική μετουσίωση. Αναμείξτε προσεκτικά μόνο με ήπια αναστροφή του φιαλιδίου.
- Η ανασυσταμένη DNάση I (RNFD) μπορεί να αποθηκευτεί στους 2–8°C στο αρχικό γυάλινο φιαλίδιο (αρχικό διάλυμα) ή στους –20°C μετά την αφαίρεση του αρχικού διαλύματος από το γυάλινο φιαλίδιο και τη διαίρεσή του σε υποπολλαπλάσια μίας χρήσης (χρησιμοποιήστε τα MCT των 1,5 ml που παρέχονται με το kit, επαρκούν για 5 υποπολλαπλάσια). Τα αποψυγμένα υποπολλαπλάσια μπορούν να αποθηκευτούν στους 2–8°C. Μην καταψύχετε εκ νέου τα ήδη αποψυγμένα υποπολλαπλάσια.
- Κατά την ανασύσταση και διαίρεση σε υποπολλαπλάσια του διαλύματος DNάσης I (RNFD), λάβετε υπόψη τις κατευθυντήριες οδηγίες σχετικά με τον χειρισμό του RNA (Παράρτημα A, σελίδα 81).

## Διαδικασία

1. Φυγοκεντρίστε το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) για 10 λεπτά στα 3.000–5000 × g με έναν ρότορα ταλαντευόμενου κάδου.



Διασφαλίστε ότι το δείγμα αίματος επώασθηκε στο σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) το λιγότερο για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) για να επιτύχετε πλήρη λύση των κυττάρων του αίματος και την κατακρήμνιση του RNA.

\* Οι μονάδες Kunitz είναι μια κοινή μονάδα μέτρησης της DNάσης I, η οποία ορίζεται ως η ποσότητα DNάσης I που προκαλεί αύξηση στο  $A_{260}$  κατά 0,001 ανά λεπτό ανά χιλιοστόλιτρο στους 25°C, pH 5,0, με υψηλά πολυμερισμένο DNA ως υπόστρωμα (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 και 363).



Ο ρότορας πρέπει να περιέχει προσαρμογείς σωληναρίου για σωληνάρια με κοίλο πυθμένα. Εάν χρησιμοποιηθούν άλλοι τύποι προσαρμογέα σωληναρίου, είναι δυνατόν τα σωληνάρια να σπάσουν κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης.

2. Απομακρύνετε το υπερκείμενο υγρό με έκχυση ή με πιπέτα. Προσθέστε στο ίζημα 4 ml νερό ελεύθερο RNάσης (RNFW) και κλείστε το σωληνάριο με ένα νέο δευτερεύον κλείστρο BD Hemogard (παρέχεται με το κιτ).

Κατά την έκχυση του υπερκείμενου υγρού, προσέξτε ώστε το ίζημα να παραμείνει άθικτο και σκουπίστε το χείλος του σωληναρίου με ένα καθαρό χαρτομάντιλο.

3. Διαλύστε το ίζημα με ανάδευση σε vortex και φυγοκεντρίστε για 10 λεπτά στα  $3.000\text{--}5000 \times g$  σε έναν ρότορα ταλαντευόμενου κάδου. Αφαιρέστε και απορρίψτε όλο το υπερκείμενο υγρό.

Μικρά κατακερματισμένα κύτταρα που παραμένουν στο υπερκείμενο υγρό μετά την ανάδευση σε vortex αλλά πριν τη φυγοκέντρωση δεν επηρεάζουν τη διαδικασία.



Η ελλειπής απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού θα αναχαιτίσει τη λύση και θα αραιώσει το παράγωγο της λύσης, επηρεάζοντας έτσι τις συνθήκες για τη δέσμευση του RNA στη μεμβράνη PAXgene.

4. Προσθέστε 350 ml ρυθμιστικού διαλύματος επαναιώρησης (BR1) και αναδεύστε σε vortex, μέχρις ότου το ίζημα να διαλυθεί ορατά.
5. Μεταφέρετε το δείγμα με πιπέτα σε ένα σωληνάριο MCT των 1,5 ml. Προσθέστε 300 ml δεσμευτικού ρυθμιστικού διαλύματος (BR2) και 40 ml πρωτεϊνάσης K (PK). Αναμείξτε για 5 δευτ. με ανάδευση σε vortex και επωάστε για 10 λεπτά στους  $55^{\circ}\text{C}$  σε έναν επωαστήρα με ανακινητήρα στα 400-1400 rpm. Μετά την επώαση, ρυθμίστε τη θερμοκρασία του επωαστήρα με ανακινητήρα στους  $65^{\circ}\text{C}$  (για το στάδιο 20).



Μην αναμειγνύετε το δεσμευτικό ρυθμιστικό διάλυμα (BR2) μαζί με την πρωτεϊνάση K (PK) πριν από την προσθήκη τους στο δείγμα.

6. Μεταφέρετε με πιπέτα το προϊόν λύσης απευθείας σε ένα PSC (μολ) τοποθετημένο εντός ενός σωληναρίου PT 2 ml και φυγοκεντρίστε για 3 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα (η οποία δεν πρέπει να υπερβαίνει τα  $20.000 \times g$ ).



Μεταφέρετε προσεκτικά με πιπέτα το προϊόν λύσης στη στήλη διαχωρισμού (PSC) και ελέγξτε οπτικά την πλήρη μεταφορά του προϊόντος λύσης στη στήλη διαχωρισμού (PSC).

Για να αποφύγετε τυχόν ζημιές στις στήλες διαχωρισμού (PSC) και στα σωληνάρια (PT), μην υπερβαίνετε την ταχύτητα των  $20.000 \times g$ .



Μερικά δείγματα μπορεί να διαρρέουν διαμέσου του PSC χωρίς φυγοκέντριση. Αυτό οφείλεται στο χαμηλό ιξώδες ορισμένων δειγμάτων και δεν πρέπει να εκλαμβάνεται ως ένδειξη αστοχίας του προϊόντος.

7. Μεταφέρετε προσεκτικά όλο το υπερκείμενο υγρό του κλάσματος συνεχούς ροής σε ένα νέο σωληνάριο MCT των 1,5 ml χωρίς διατάραξη του ιζήματος στο σωληνάριο PT.

8. Προσθέστε 350 μl αιθανόλης (96–100% v/v, βαθμός καθαρότητας p.a.). Αναμείξτε με ανάδευση σε vortex και φυγοκεντρίστε για μικρό χρονικό διάστημα (1–2 δευτ. στα  $500–1.000 \times g$ ), για την απομάκρυνση σταγονιδίων από το εσωτερικό του καλύμματος του σωληναρίου.



Η διάρκεια της φυγοκέντρωσης δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 1-2 δευτ., καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ιζηματοποίηση των νουκλεϊκών οξέων και έτσι σε μειωμένη απόδοση του συνολικού RNA.

9. Μεταφέρετε με πιπέτα 700 μl του δείγματος σε ένα PRC (κόκκινο) τοποθετημένο σε ένα σωληνάριο PT των 2 ml και φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό στα  $8.000–20.000 \times g$ . Τοποθετήστε τη στήλη διαχωρισμού (PRC) σε ένα νέο σωληνάριο PT των 2 ml και απορρίψτε το ήδη χρησιμοποιημένο σωληνάριο PT που περιέχει το υγρό συνεχούς ροής.

10. Μεταφέρετε με πιπέτα το εναπομείναν δείγμα στο PRC και φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό στα  $8.000\text{--}20.000 \times g$ . Τοποθετήστε τη στήλη διαχωρισμού (PRC) σε ένα νέο σωληνάριο PT των 2 ml και απορρίψτε το ήδη χρησιμοποιημένο σωληνάριο PT που περιέχει το υγρό συνεχούς ροής.



Μεταφέρετε προσεκτικά με πιπέτα το δείγμα στη στήλη διαχωρισμού (PRC) και ελέγξτε οπτικά την πλήρη μεταφορά του δείγματος στη στήλη διαχωρισμού (PRC).

11. Προσθέστε 350 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 1 (BR3) στο PRC. Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό στα  $8.000\text{--}20.000 \times g$ . Τοποθετήστε τη στήλη διαχωρισμού (PRC) σε ένα νέο σωληνάριο PT των 2 ml και απορρίψτε το ήδη χρησιμοποιημένο σωληνάριο PT που περιέχει το υγρό συνεχούς ροής.

12. Προσθέστε 10 μl αρχικού διαλύματος DNάσης I (RNFD) σε 70 μl ρυθμιστικού διαλύματος κατάτμησης DNA (RDD) σε ένα σωληνάριο MCT των 1,5 ml. Αναμείξτε με ελαφρά χτυπήματα του σωληναρίου με τα δάκτυλα και φυγοκεντρίστε για μικρό χρονικό διάστημα για τη συλλογή του υπολειπόμενου υγρού από τα τοιχώματα του σωληναρίου.

Για την επεξεργασία, για παράδειγμα, 10 δειγμάτων μεταφέρετε με πιπέτα 100 μl αρχικού διαλύματος DNάσης I (RNFD) σε 700 μl ρυθμιστικού διαλύματος κατάτμησης DNA (RDD). Χρησιμοποιήστε τα σωληνάρια MCT των 1,5 ml που παρέχονται με το kit.




Η DNάση I είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στη φυσική μετουσίωση. Αναμείξτε προσεκτικά το διάλυμα με ελαφρά χτυπήματα του σωληναρίου. Μη χρησιμοποιείτε αναδευτήρα vortex για την ανάμειξη.

13. Μεταφέρετε με πιπέτα το μείγμα επώασης της DNάσης I (RNFD) (80 μl) απευθείας στη μεμβράνη του PRC και τοποθετήστε στον πάγκο ( $20\text{--}30^\circ\text{C}$ ) για 15 λεπτά.



Προσέξτε ώστε το μείγμα επώασης της DNάσης I (RNFD) να τοποθετηθεί απευθείας επάνω στη μεμβράνη. Η κατάτμηση με DNάση δεν θα ολοκληρωθεί αν ένα μέρος του μείγματος προσκολληθεί και παραμείνει στα τοιχώματα ή στον δακτύλιο O της στήλης διαχωρισμού (PRC).

14. Μεταφέρετε με πιπέτα 350 µl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 1 (BR3) στο PRC και φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό στα  $8.000\text{--}20.000 \times g$ . Τοποθετήστε τη στήλη διαχωρισμού (PRC) σε ένα νέο σωληνάριο PT των 2 ml και απορρίψτε το ήδη χρησιμοποιημένο σωληνάριο PT που περιέχει το υγρό συνεχούς ροής.
15. Μεταφέρετε με πιπέτα 500 µl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 2 (BR4) στο PRC και φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό στα  $8.000\text{--}20.000 \times g$ . Τοποθετήστε τη στήλη διαχωρισμού (PRC) σε ένα νέο σωληνάριο PT των 2 ml και απορρίψτε το ήδη χρησιμοποιημένο σωληνάριο PT που περιέχει το υγρό συνεχούς ροής.
-  Το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2 (BR4) παρέχεται σε συμπυκνωμένη μορφή. Διασφαλίστε ότι πριν από τη χρήση έχει προστεθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2 (BR4) αιθανόλη (βλέπε «Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη» στη σελίδα 25).
16. Προσθέστε επιπλέον 500 µl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 2 (BR4) στο PRC. Φυγοκεντρίστε για 3 λεπτά στα  $8.000\text{--}20.000 \times g$ .
17. Απορρίψτε το σωληνάριο PT που περιέχει το υγρό συνεχούς ροής και τοποθετήστε το PRC σε ένα νέο σωληνάριο PT των 2 ml. Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό στα  $8.000\text{--}20.000 \times g$ .
18. Απορρίψτε το σωληνάριο PT που περιέχει το υγρό συνεχούς ροής. Τοποθετήστε το PRC σε ένα σωληνάριο MCT των 1,5 ml και μεταφέρετε με πιπέτα 40 µl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (BR5) απευθείας στη μεμβράνη του PRC. Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό στα  $8.000\text{--}20.000 \times g$  για την έκλουση του RNA.
- Για να επιτύχετε έκλουση με μέγιστη αποτελεσματικότητα, είναι σημαντική η ύγρανση ολόκληρης της μεμβράνης με το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5).
19. Επαναλάβετε το στάδιο έκλουσης (στάδιο 18) όπως περιγράφεται, με 40 µl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (BR5) και το ίδιο σωληνάριο MCT.

20. Επλώστε το προϊόν έκλουσης για 5 λεπτά στους 65°C σε έναν επωαστήρα με ανακινήτηρα (βλέπε στάδιο 5), χωρίς ανακίνηση. Ακολουθώς ψύξτε τα δείγματα αμέσως σε πάγο.



Με αυτήν την επώαση των δειγμάτων στους 65°C επιτυγχάνεται μετουσίωση του RNA για καθοδικές (downstream) εφαρμογές. Ακόμα και εάν η καθοδική (downstream) εφαρμογή συμπεριλαμβάνει ένα στάδιο θερμικής μετουσίωσης, μην παραλείπετε το στάδιο αυτό. Επαρκής μετουσίωση RNA σε αυτό το σημείο είναι απαραίτητη για μέγιστη αποδοτικότητα στις καθοδικές (downstream) εφαρμογές.

Μην υπερβαίνετε τη διάρκεια ή τη θερμοκρασία επώασης.

21. Εάν τα δείγματα RNA δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν αμέσως, φυλάξτε τα στους -20°C ή -70°C.

Επειδή το RNA παραμένει μετουσιωμένο ακόμα και μετά από πολλαπλές καταψύξεις και αποψύξεις, δεν απαιτείται επανάληψη της επώασης στους 65°C. Εάν πρόκειται να χρησιμοποιήσετε τα δείγματα RNA για έναν διαγνωστικό προσδιορισμό, ακολουθήστε τις υποδείξεις του κατασκευαστή.

Για τον ακριβή και αξιόπιστο ποσοτικό προσδιορισμό του RNA, μέσω της μέτρησης της απορρόφησης στα 260 nm, συνιστούμε την αραίωση των δειγμάτων με 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.\* Μια αραίωση του δείγματος με νερό ελεύθερο RNάσης μπορεί να οδηγήσει σε ανακριβείς χαμηλές τιμές.

Μηδενίστε το φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιώντας ένα τυφλό δείγμα που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) και ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl στην ίδια αναλογία με τα δείγματα που ελέγχονται. Το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) έχει υψηλή απορρόφηση στα 220 nm, που οδηγεί σε υψηλές τιμές απορρόφησης υποβάθρου εάν το φασματοφωτόμετρο δεν μηδενιστεί σωστά.

\* Κατά την εργασία με χημικές ουσίες, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (Safety Data Sheets, SDS), τα οποία διατίθενται από τον προμηθευτή του προϊόντος.





Για ποσοτικοποίηση σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris Hcl, χρησιμοποιήστε τη σχέση  $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ . Βλέπε Παράρτημα Β, σελίδα 83.

22. Κλείστε ξανά όλες τις φιάλες που περιέχουν ρυθμιστικά διαλύματα και νερό ελεύθερο RNάσης, τα φιαλίδια και τα σωληνάρια που περιέχουν ένζυμα και ρυθμιστικά διαλύματα ενζύμων, καθώς και τις σακούλες που περιέχουν πλαστικά υλικά από το κιτ που χρησιμοποιείται για το πρωτόκολλο. Αποθηκεύστε τα υπόλοιπα υλικά του κιτ όπως περιγράφεται στην ενότητα «Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων» (σελίδα 22) και «Σταθερότητα εντός χρήσης» (σελίδα 22) μέχρι την επόμενη χρήση.

# Πρωτόκολλο: Αυτοματοποιημένη απομόνωση του συνολικού RNA από ανθρώπινο ολικό αίμα που έχει συλλεχθεί σε σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

## Σημαντικές υποδείξεις πριν από την έναρξη

- Βεβαιωθείτε ότι το κουτί του kit είναι άθικτο και χωρίς ζημιές και ότι κανένα από τα ρυθμιστικά διαλύματα δεν παρουσιάζει διαρροές. Μη χρησιμοποιείτε κανένα kit που παρουσιάζει ζημιές.
- Κατά τη χρήση πιπέτας, βεβαιωθείτε για τη ρύθμιση του σωστού όγκου και ότι το υγρό αναρροφάται και διανέμεται προσεκτικά και πλήρως.
- Για να αποφύγετε τη μεταφορά δείγματος σε λανθασμένα σωληνάρια και πλαστικά αναλώσιμα, διασφαλίστε ότι όλα τα σωληνάρια PT, τα σωληνάρια MCT και οι προσαρμογείς ρότορα έχουν επισημανθεί κατάλληλα με ανεξίτηλο μαρκαστικό. Επισημάνετε το κάλυμμα και το σώμα κάθε σωληναρίου MCT, το σώμα κάθε σωληναρίου PT και το εξωτερικό τοίχωμα κάθε προσαρμογέα ρότορα.
- Το πιπίλισμα δειγμάτων ή ρυθμιστικών διαλυμάτων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μπορεί να μειώσει την απόδοση και καθαρότητα του RNA.
- Εάν δεν υποδεικνύεται διαφορετικά, όλα τα στάδια του πρωτοκόλλου, συμπεριλαμβανομένων και αυτών της φυγοκέντρησης, πρέπει να εκτελεστούν σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C).

Εξαιτίας της υψηλής ευαισθησίας των μεθόδων ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων, κατά τον χειρισμό των δειγμάτων είναι απαραίτητες οι ακόλουθες προφυλάξεις για την αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης:

- Μεταφέρετε προσεκτικά με πιπέτα το δείγμα στο σωληνάριο PT, στον πυθμένα του σωληναρίου, χωρίς να υγρανθεί το χείλος του σωληναρίου.
- Αλλάζετε πάντα τα ρύγχη πιπετών μετά από κάθε μεταφορά υγρού. Χρησιμοποιείτε ρύγχη πιπετών με φραγμό αερολυμάτων.
- Αποφύγετε την επαφή του ρύγχους της πιπέτας με τη μεμβράνη της στήλης διαχωρισμού (PSC, PRC).
- Μετά την ανάδευση σε vortex ή τη θέρμανση ενός σωληναρίου MCT, φυγοκεντρίστε το σύντομα για απομάκρυνση των σταγονιδίων από το εσωτερικό του καλύμματος.
- Φοράτε γάντια σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Αντικαταστήστε αμέσως τα γάντια, εάν έλθουν σε επαφή με το δείγμα.

## Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη

- Το αίμα πρέπει να συλλέγεται εντός των σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) σύμφωνα με τις οδηγίες που αναφέρονται στο *Εγχειρίδιο σωληναρίου PAXgene Blood RNA Tube*. Εάν είναι απαραίτητο, στο Παράρτημα Γ (σελίδα 85) μπορείτε να βρείτε υποδείξεις σχετικά με τον χειρισμό των σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Διασφαλίστε ότι τα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) επωάζονται το λιγότερο για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου μετά τη λήψη αίματος, για να εξασφαλίσετε την πλήρη λύση των κυττάρων του αίματος και την κατακρήμνιση του RNA. Επώαση του σωληναρίου PAXgene Blood RNA Tube (BRT) κατά τη διάρκεια της νύχτας μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερες αποδόσεις. Εάν ένα σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) μετά τη λήψη αίματος έχει αποθηκευθεί στους 2–8°C, –20°C ή –70°C, αφήστε πρώτα το σωληνάριο να εξισορροπηθεί σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν φυλάξτε το για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου πριν αρχίσετε τη διαδικασία.
- Διαβάστε τις πληροφορίες ασφάλειας στη σελίδα 18.
- Διαβάστε «Σημαντικές σημειώσεις», σελίδα 61.
- Διαβάστε τις κατευθυντήριες οδηγίες σχετικά με τον χειρισμό του RNA (Παράρτημα A, σελίδα 81).

- Διαβάστε το κατάλληλο Εγχειρίδιο χρήστη QIAcube Connect MDx και οποιοσδήποτε πρόσθετες πληροφορίες που παρέχονται μαζί με το όργανο, με ιδιαίτερη προσοχή στις πληροφορίες ασφάλειας.
- Διασφαλίστε ότι όλες οι συσκευές και τα όργανα, όπως οι πιπέτες και το QIAcube Connect MDx, ελέγχονται και βαθμονομούνται τακτικά, σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή.
- Το δεσμευτικό ρυθμιστικό διάλυμα (BR2) μπορεί κατά την αποθήκευση να σχηματίσει ίζημα. Εάν είναι αναγκαίο, μπορείτε να το διαλύσετε με θέρμανση στους 37°C.
- Το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2 (BR4) παρέχεται σε συμπυκνωμένη μορφή. Πριν από την πρώτη χρήση, προσθέστε στη φιάλη τον κατάλληλο όγκο αιθανόλης (96–100% v/v, βαθμός καθαρότητας p.a.), όπως υποδεικνύεται στη φιάλη για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας.
- Πριν από την πρώτη χρήση του RNase-Free DNase Set, παρασκευάστε ένα αρχικό διάλυμα DNάσης I. Διαλύστε τη στερεή DNάση I (RNFD, 1.500 μονάδες Kunitz)\* σε 550 μl ρυθμιστικού διαλύματος επαναιώρησης DNάσης (DRB), το οποίο παρέχεται με το σετ. Προσέξτε ώστε κατά το άνοιγμα του φιαλιδίου να μη χαθεί καμία ποσότητα DNάσης I (RNFD). Η ανασυσταμένη DNάση I (RNFD) δεν επιτρέπεται να αναδευτεί σε συσκευή vortex. Η DNάση I είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στη φυσική μετουσίωση. Αναμείξτε προσεκτικά μόνο με ήπια αναστροφή του φιαλιδίου.
- Η ανασυσταμένη DNάση I (RNFD) μπορεί να αποθηκευτεί στους 2–8°C στο αρχικό γυάλινο φιαλίδιο (αρχικό διάλυμα) ή στους –20°C μετά την αφαίρεση του αρχικού διαλύματος από το γυάλινο φιαλίδιο και τη διαίρεσή του σε υποπολλαπλάσια μίας χρήσης (χρησιμοποιήστε τα MCT των 1,5 ml που παρέχονται με το kit, επαρκούν για 5 υποπολλαπλάσια). Τα αποψυγμένα υποπολλαπλάσια μπορούν να αποθηκευτούν στους 2–8°C. Μην καταψύχετε εκ νέου τα ήδη αποψυγμένα υποπολλαπλάσια.

\* Οι μονάδες Kunitz είναι μια κοινή μονάδα μέτρησης της DNάσης I, η οποία ορίζεται ως η ποσότητα DNάσης I που προκαλεί αύξηση στο  $A_{260}$  κατά 0,001 ανά λεπτό ανά χιλιοστόλιτρο στους 25°C, pH 5,0, με υψηλά πολυμερισμένο DNA ως υπόστρωμα (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 και 363).

- Κατά την ανασύσταση και διαίρεση σε υποπολλαπλάσια του διαλύματος DNάσης I (RNFD), λάβετε υπόψη τις κατευθυντήριες οδηγίες σχετικά με τον χειρισμό του RNA (Παράρτημα A, σελίδα 81).
- Εγκαταστήστε τον σωστό προσαρμογέα ανακινήτηρα (συμπεριλαμβάνεται στο QIAcube Connect MDx, χρησιμοποιήστε τον προσαρμογέα για σωληνάρια 2 ml με κλείστρο ασφαλείας, σημειωμένα με «2») και τοποθετήστε το στατώ ανακινήτηρα στο επάνω μέρος του προσαρμογέα.
- Ελέγξτε το συρτάρι αποβλήτων και εάν είναι απαραίτητο αδειάστε το.
- Εγκαταστήστε οποιαδήποτε σχετικά πρωτόκολλα εάν δεν το έχετε ήδη κάνει για προηγούμενες εκτελέσεις. Για το QIAcube Connect MDx απαιτείται να ληφθούν όλα τα πρωτόκολλα που υπάρχουν στο αντίστοιχο αρχείο zip. Βλ. «Εγκατάσταση πρωτοκόλλων στο QIAcube Connect MDx», σελίδα 63.

## Διαδικασία

1. Κλείστε το κάλυμμα του QIAcube Connect MDx και ενεργοποιήστε το όργανο με τον κεντρικό διακόπτη (βλέπε Εικόνα 15, σελίδα 62).

Ακούγεται ένας ήχος βομβητή και εμφανίζεται η αρχική οθόνη. Το όργανο εκτελεί αυτόματα τεστ αρχικοποίησης.

2. Ανοίξτε το κάλυμμα του QIAcube Connect MDx και τοποθετήστε τα απαραίτητα αντιδραστήρια και πλαστικά είδη μέσα στο όργανο. Βλ. «Εκτελείται φόρτωση του QIAcube Connect MDx», σελίδα 64.

Για οικονομία χρόνου, η φόρτωση μπορεί να διεξαχθεί κατά τη διάρκεια του ενός ή και των δύο ακόλουθων σταδίων φυγοκέντρισης διάρκειας 10 λεπτών (στάδια 3 και 5).

3. Φυγοκεντρίστε το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) για 10 λεπτά στα  $3.000\text{--}5000 \times g$  με έναν ρότορα ταλαντευόμενου κάδου.



Διασφαλίστε ότι το δείγμα αίματος επωάσθηκε στο σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) το λιγότερο για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ( $15\text{--}25^\circ\text{C}$ ) για να επιτύχετε πλήρη λύση των κυττάρων του αίματος και την κατακρήμνιση του RNA.



Ο ρότορας πρέπει να περιέχει προσαρμογείς σωληναρίου για σωληνάρια με κοίλο πυθμένα. Εάν χρησιμοποιηθούν άλλοι τύποι προσαρμογέα σωληναρίου, είναι δυνατόν τα σωληνάρια να σπάσουν κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρισης.

4. Απομακρύνετε το υπερκείμενο υγρό με έκχυση ή με πιπέτα. Κατά την έκχυση του υπερκείμενου υγρού, προσέξτε ώστε το ίζημα να παραμείνει άθικτο και σκουπίστε το χείλος του σωληναρίου με ένα καθαρό χαρτομάντιλο. Προσθέστε στο ίζημα 4 ml νερό ελεύθερο RNάσης (RNF<sub>W</sub>) και κλείστε το σωληνάριο με ένα νέο δευτερεύον κλείστρο BD Hemogard (παρέχεται με το κιτ).

5. Διαλύστε το ίζημα με ανάδευση σε vortex και φυγοκεντρίστε για 10 λεπτά στα  $3.000\text{--}5000 \times g$  σε έναν ρότορα ταλαντευόμενου κάδου. Αφαιρέστε και απορρίψτε όλο το υπερκείμενο υγρό.

Μικρά κατακερματισμένα κύτταρα που παραμένουν στο υπερκείμενο υγρό μετά την ανάδευση σε vortex αλλά πριν τη φυγοκέντριση δεν επηρεάζουν τη διαδικασία.



Η ελλειπής απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού θα αναχαιτίσει τη λύση και θα αραιώσει το παράγωγο της λύσης, επηρεάζοντας έτσι τις συνθήκες για τη δέσμευση του RNA στη μεμβράνη PAXgene.

6. Προσθέστε 350 ml ρυθμιστικού διαλύματος επαναιώρησης (BR1) και αναδεύστε σε vortex, μέχρις ότου το ίζημα να διαλυθεί ορατά.

7. Μεταφέρετε το δείγμα με πιπέτα σε ένα σωληνάριο PT των 2 ml.



Χρησιμοποιείτε τα σωληνάρια PT των 2 ml που περιλαμβάνονται στο κιτ PAXgene Blood RNA Kit.

8. Φορτώστε τα ανοικτά σωληνάρια PT που περιέχει δείγμα στον ανακινητήρα QIAcube Connect MDx (βλέπε Εικόνα 18, σελίδα 67). Οι θέσεις των δειγμάτων είναι αριθμημένες για εύκολη φόρτωση. Τοποθετήστε τα βύσματα του στατώ ανακινητήρα (συμπεριλαμβάνεται στο QIAcube Connect MDx) στις υποδοχές στην άκρη του στατώ ανακινητήρα δίπλα σε κάθε σωληνάριο PT. Αυτό καθιστά δυνατή την ανίχνευση των δειγμάτων κατά τη διάρκεια του ελέγχου φόρτωσης.



Βεβαιωθείτε ότι έχει εγκατασταθεί ο σωστός προσαρμογέας ανακινητήρα (Shaker Adapter, 2 ml, σωληνάρια με κλείστρο ασφαλείας, επισημασμένα με «2», που περιλαμβάνονται στο QIAcube Connect MDx).



Εάν επεξεργάζεστε λιγότερα από 12 δείγματα, βεβαιωθείτε ότι φορτώνετε το στατώ ανακινητήρα όπως φαίνεται στην Εικόνα 22, σελίδα 71. Δεν είναι δυνατή η επεξεργασία ενός (1) ή 11 δειγμάτων. Οι αριθμοί των θέσεων στο στατώ ανακινητήρα αντιστοιχούν στους αριθμούς θέσεων στη φυγόκεντρο.

9. Κλείστε το κάλυμμα του QIAcube Connect MDx (βλέπε Εικόνα 15, σελίδα 62).

10. Επιλέξτε το πρωτόκολλο «PAXgene Blood RNA Part A» και εκκινήστε το.

Ακολουθήστε τις οδηγίες που δίνονται στην οθόνη αφής του QIAcube Connect MDx.



Βεβαιωθείτε ότι και τα δύο μέρη του προγράμματος (μέρος A και μέρος B) εγκαταστάθηκαν στο QIAcube Connect MDx (βλέπε «Εγκατάσταση πρωτοκόλλων στο QIAcube Connect MDx», σελίδα 63).



Το όργανο εκτελεί ελέγχους φόρτωσης για δείγματα, ρύγχη, προσαρμογείς ρότορα και φιάλες αντιδραστηρίων.

11. Μετά το τέλος του πρωτοκόλλου «PAXgene Blood RNA Part A», ανοίξτε το κάλυμμα του QIAcube Connect MDx (βλέπε Εικόνα 15, σελίδα 62). Απομακρύνετε και απορρίψτε το PRC από τους προσαρμογείς ρότορα και τα άδεια σωληνάρια PT από τον ανακινητήρα.



Κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης, οι στήλες διαχωρισμού μεταφέρονται από τη θέση 1 του προσαρμογέα ρότορα (θέση καλύμματος L1) στη θέση 3 του προσαρμογέα ρότορα (θέση καλύμματος L2) από το όργανο (βλέπε Εικόνα 20, σελίδα 69).

12. Κλείστε τα καλύμματα όλων των σωληναρίων MCT των 1,5 ml που περιέχουν το απομονωμένο RNA στους προσαρμογείς ρότορα (θέση 3, θέση καλύμματος L3, βλέπε Εικόνα 20, σελίδα 69). Μεταφέρετε τα σωληνάρια MCT των 1,5 ml στον προσαρμογέα ανακινητήρα QIAcube Connect MDx (βλέπε Εικόνα 18, σελίδα 67).

13. Κλείστε το κάλυμμα του QIAcube Connect MDx (βλέπε Εικόνα 15, σελίδα 62).

14. Επιλέξτε το πρωτόκολλο «PAXgene Blood RNA Part B» και εκκινήστε το.

Ακολουθήστε τις οδηγίες που δίνονται στην οθόνη αφής του QIAcube Connect MDx.



Το πρόγραμμα αυτό επωάζει τα δείγματα στους 65°C και μετουσιώνει το RNA για τις καθοδικές (downstream) εφαρμογές. Ακόμα και εάν η καθοδική (downstream) εφαρμογή συμπεριλαμβάνει ένα στάδιο θερμικής μετουσίωσης, μην παραλείπετε το στάδιο αυτό. Επαρκής μετουσίωση RNA σε αυτό το σημείο είναι απαραίτητη για μέγιστη αποδοτικότητα στις καθοδικές (downstream) εφαρμογές.

15. Μετά το τέλος του προγράμματος «PAXgene Blood RNA Part B», ανοίξτε το κάλυμμα του QIAcube Connect MDx (βλέπε Εικόνα 15, σελίδα 62). Τοποθετήστε αμέσως τα σωληνάρια MCT που περιέχουν το κεκαθαρωμένο RNA σε πάγο.



**ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ:** Θερμή επιφάνεια. Ο ανακινητήρας μπορεί να φθάσει σε θερμοκρασίες μέχρι 70°C. Μην τον αγγίζετε όταν είναι θερμός.





Μην αφήνετε το κεκαθαρισμένο RNA στο QIAcube Connect MDx. Δεδομένου ότι τα δείγματα δεν ψύχονται, το απομονωμένο RNA μπορεί να αποδομηθεί. Για το λόγο αυτό, εκτελέσεις παρασκευών δειγμάτων κατά τη διάρκεια της νύχτας χωρίς επιτήρηση δεν συνιστώνται.

16. Εάν τα δείγματα RNA δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν αμέσως, φυλάξτε τα στους  $-20^{\circ}\text{C}$  ή  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Επειδή το RNA παραμένει μετουσιωμένο μετά από επαναλαμβανόμενη ψύξη και απόψυξη, δεν είναι απαραίτητο να επαναλάβετε το πρωτόκολλο θερμικής επώασης («PAXgene Blood RNA Part B»). Εάν πρόκειται να χρησιμοποιήσετε τα δείγματα RNA για έναν διαγνωστικό προσδιορισμό, ακολουθήστε τις υποδείξεις του κατασκευαστή.

Για τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό του RNA, μέσω της μέτρησης της απορρόφησης στα 260 nm, συνιστούμε την αραίωση των δειγμάτων σε 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. \* Μια αραίωση του δείγματος με νερό ελεύθερο RNάσης μπορεί να οδηγήσει σε ανακριβείς χαμηλές τιμές.

Μηδενίστε το φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιώντας ένα τυφλό δείγμα που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) και ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl στην ίδια αναλογία με τα δείγματα που ελέγχονται. Το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) έχει υψηλή απορρόφηση στα 220 nm, που οδηγεί σε υψηλές τιμές απορρόφησης υποβάθρου εάν το φασματοφωτόμετρο δεν μηδενιστεί σωστά.



Για τον ποσοτικό προσδιορισμό στο ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, χρησιμοποιήστε τη σχέση

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ } \mu\text{g/ml}$ . Βλέπε Παράρτημα Β, σελίδα 83.

\* Κατά την εργασία με χημικές ουσίες, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (Safety Data Sheets, SDS), τα οποία διατίθενται από τον προμηθευτή του προϊόντος.

17. Απομακρύνετε το στατώ φιαλών αντιδραστηρίων από το τραπέζι εργασίας του QIAcube Connect MDx (βλέπε Εικόνα 18, σελίδα 67) και κλείστε όλες τις φιάλες αντιδραστηρίων με τα κατάλληλα επισημασμένα καλύμματα. Κλείστε ξανά όλες τις φιάλες που περιέχουν ρυθμιστικά διαλύματα και νερό ελεύθερο RNάσης, τα φιαλίδια και τα σωληνάρια που περιέχουν ένζυμα και ρυθμιστικά διαλύματα ενζύμων, καθώς και τις σακούλες που περιέχουν πλαστικά υλικά από το κιτ που χρησιμοποιείται για το πρωτόκολλο. Αποθηκεύστε το υπόλοιπο περιεχόμενο του κιτ και τις φιάλες αντιδραστηρίων όπως περιγράφεται στην ενότητα «Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων» (σελίδα 22) και «Σταθερότητα εντός χρήσης» (σελίδα 22) μέχρι την επόμενη χρήση. Απομακρύνετε και απορρίψτε τα αντιδραστήρια που παραμένουν στα σωληνάρια PT εντός των υποδοχών των σωληναρίων MCT του οργάνου QIAcube Connect MDx. Απομακρύνετε και απορρίψτε τους προσαρμογείς ρότορα από τη φυγόκεντρο. Αδειάστε το συρτάρι αποβλήτων QIAcube Connect MDx (βλέπε Εικόνα 15, σελίδα 62). Κλείστε το κάλυμμα του οργάνου και απενεργοποιήστε το όργανο με τον κεντρικό διακόπτη.

# Περιορισμοί χρήσης του προϊόντος

Το kit PAXgene Blood RNA Kit προορίζεται για την απομόνωση ενδοκυτταρικού RNA από ανθρώπινο ολικό αίμα ( $4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$  λευκοκύτταρα/ml), για διαγνωστικές εφαρμογές in vitro. Δεν ενδείκνυται για την απομόνωση γονιδιωματικού DNA ή νουκλεϊκών οξέων ιών από ανθρώπινο ολικό αίμα. Επειδή οι αναφερόμενες στο εγχειρίδιο αυτό προδιαγραφές σταθεροποίησης ισχύουν για έναν περιορισμένο αριθμό μεταγραφημάτων (μεταγραφήματα γονιδίων FOS και IL1B), δεν έχουν τεκμηριωθεί τα χαρακτηριστικά απόδοσης για όλα τα μεταγραφήματα. Οι χρήστες πρέπει να ανασκοπήσουν τα δεδομένα του κατασκευαστή και τα δεδομένα του εργαστηρίου για να καθορίσουν εάν είναι απαραίτητη επικύρωση για άλλα μεταγραφήματα. Τα συστατικά του kit προορίζονται μόνο για χρήση στο χειροκίνητο και στο αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο που περιγράφεται σε αυτές τις οδηγίες χρήσης.

Βλ. το *Εγχειρίδιο σωληναρίου PAXgene Blood RNA Tube* για πληροφορίες σχετικά με τη χρήση των σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

## Έλεγχος ποιότητας

Σύμφωνα με το πιστοποιημένο κατά ISO σύστημα διαχείρισης ποιότητας της QIAGEN, ελέγχεται κάθε παρτίδα του kit PAXgene Blood RNA Kit έναντι προκαθορισμένων προδιαγραφών, για την εξασφάλιση μιας ομοιόμορφης ποιότητας του προϊόντος.

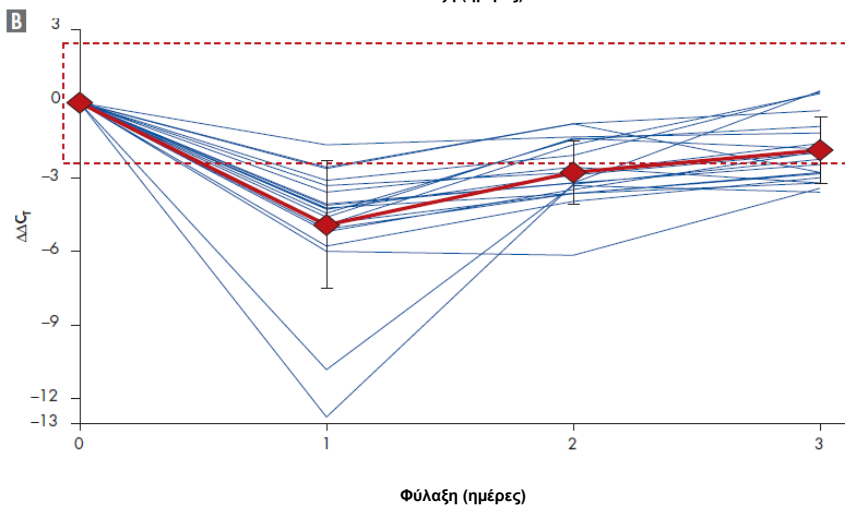
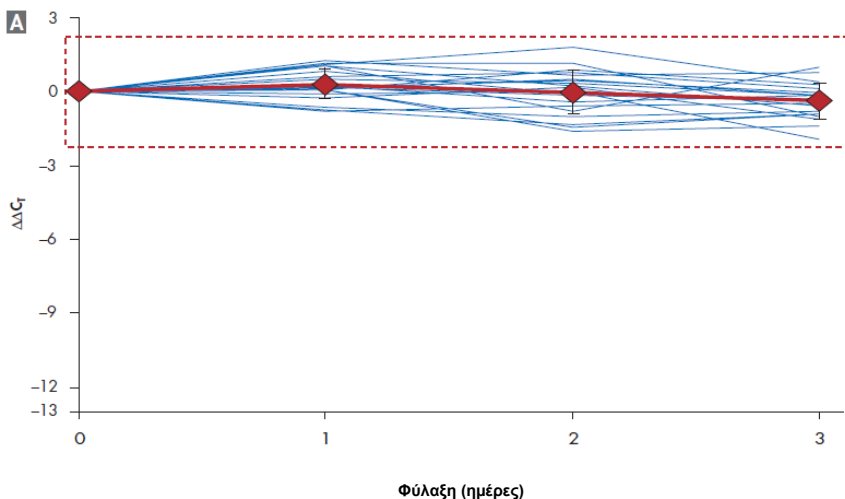
# Χαρακτηριστικά απόδοσης

## Δειγματοληψία και σταθεροποίηση

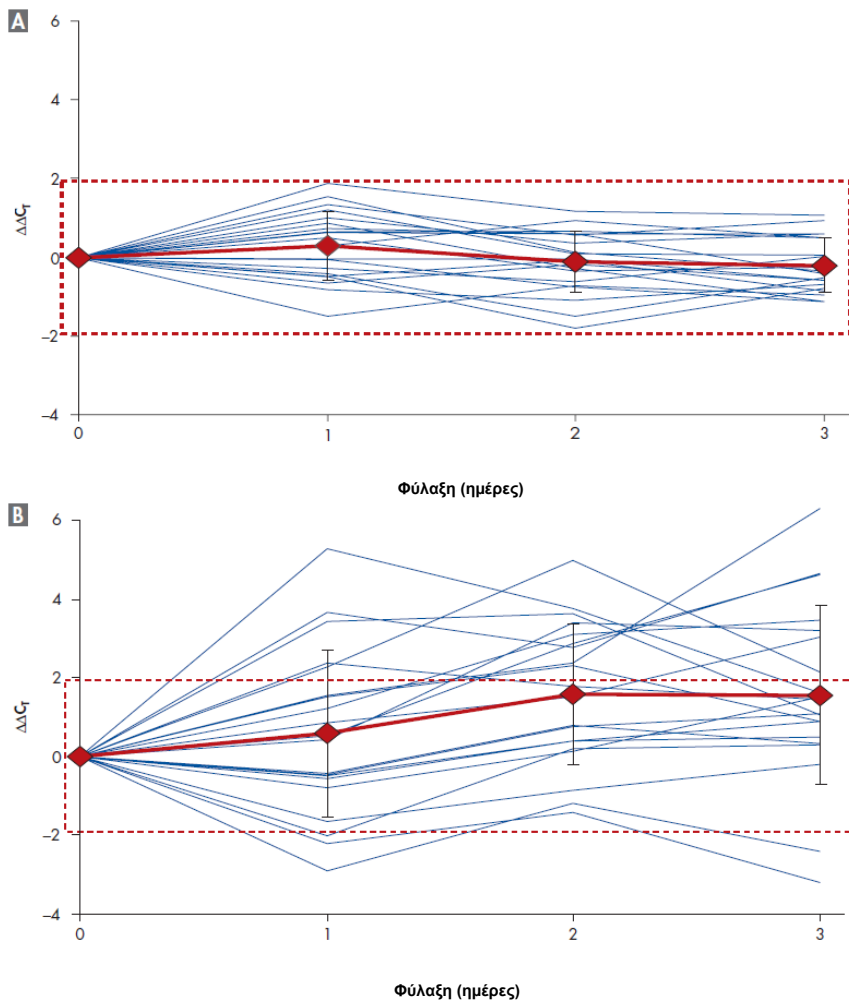
Τα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) περιέχουν ιδιόκτητο αντιδραστήριο σταθεροποίησης RNA. Αυτό το πρόσθετο προστατεύει τα μόρια RNA από την αποδόμηση μέσω της RNάσης και μειώνει στο ελάχιστο αλλαγές ex vivo στην έκφραση γονιδίων. Τα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) προορίζονται για τη συλλογή ανθρώπινου ολικού αίματος και τη σταθεροποίηση κυτταρικού RNA για έως 3 ημέρες στους 18-25°C (Εικόνα 4 και Εικόνα 5, σελίδες 45 και 46 αντίστοιχα) ή έως 5 ημέρες στους 2-8°C (Εικόνα 6 και Εικόνα 7, σελίδες 47 και 48). Επιπρόσθετα, το σταθεροποιημένο αίμα μπορεί να αποθηκευτεί στην κατάψυξη. Προς το παρόν, τα διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι το κυτταρικό RNA παραμένει σταθερό το λιγότερο για 11 έτη στους -20°C ή -70°C\*. Για περισσότερες πληροφορίες από τρέχουσες μελέτες που αξιολογούν τη σταθερότητα για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, επισκεφθείτε τη διεύθυνση [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) ή επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής εξυπηρέτησης της QIAGEN.

Η πραγματική διάρκεια της σταθεροποίησης του RNA μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το είδος κυτταρικού RNA και την καθοδική (downstream) εφαρμογή που χρησιμοποιείται. Επειδή οι αναφερόμενες στο εγχειρίδιο αυτό προδιαγραφές σταθεροποίησης ισχύουν για έναν περιορισμένο αριθμό μεταγραφημάτων (μεταγραφήματα γονιδίων FOS και IL1B), δεν έχουν τεκμηριωθεί τα χαρακτηριστικά απόδοσης για όλα τα μεταγραφήματα. Οι χρήστες πρέπει να ανασκοπήσουν τα δεδομένα του κατασκευαστή και τα δεδομένα του εργαστηρίου για να καθορίσουν εάν είναι απαραίτητη επικύρωση για άλλα μεταγραφήματα.

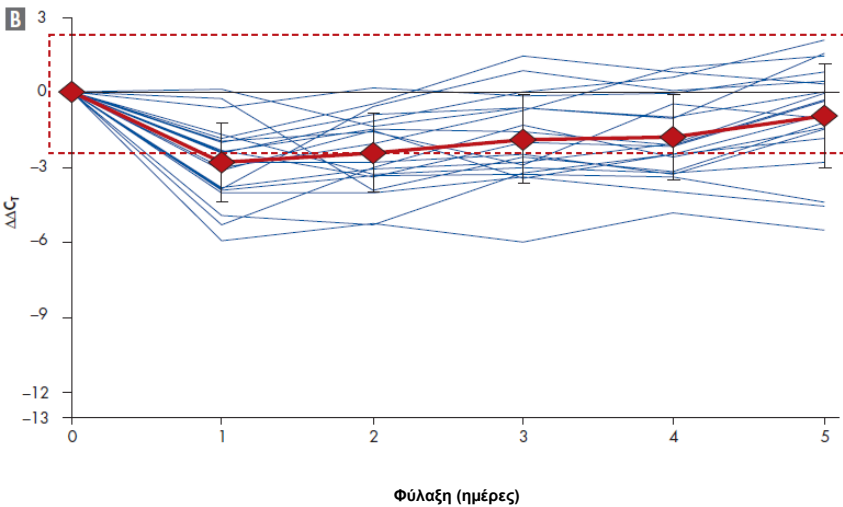
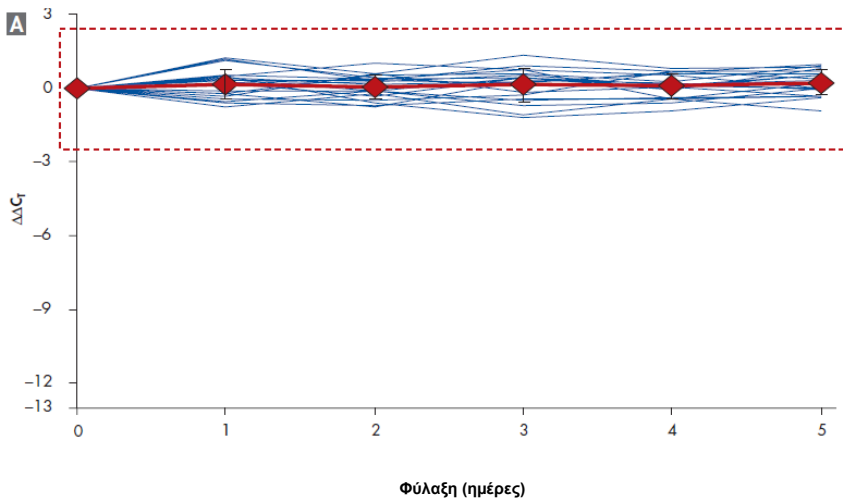
\* Μια μακροχρόνια μελέτη της φύλαξης αίματος στα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes βρίσκεται σε εξέλιξη.



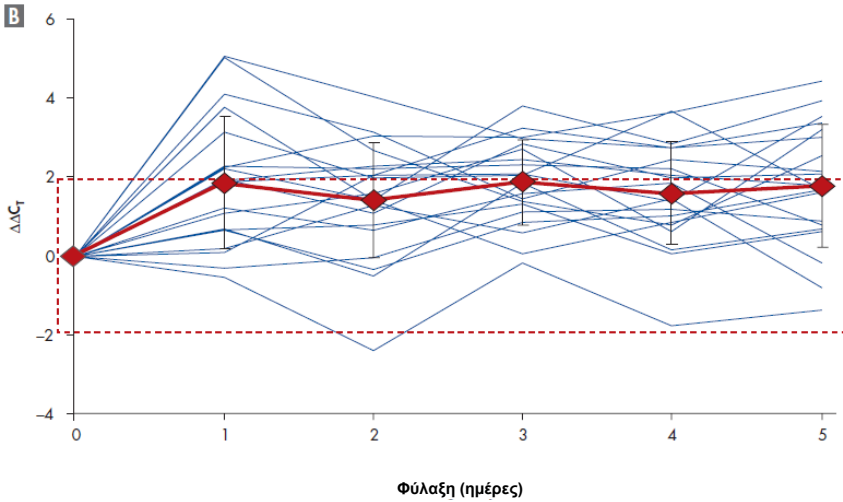
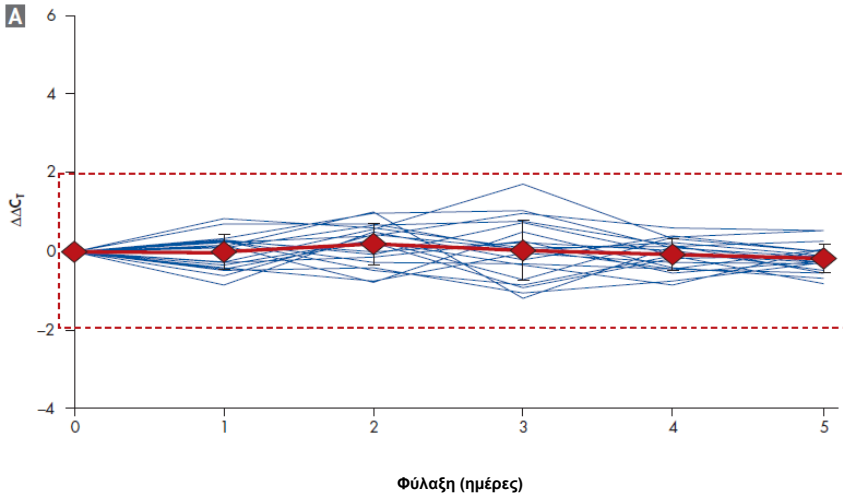
**Εικόνα 4: Σταθερότητα RNA σε δείγματα αίματος στους 18–25°C: FOS.** Λήψη δειγμάτων αίματος εις διπλούν από 10 φαινομενικά υγιείς δότες, τα οποία αποθηκεύτηκαν στους 18-25°C για τον αναγραφόμενο αριθμό ημερών, ακολουθούμενη από την απομόνωση του ολικού RNA. **[A]** Λήψη αίματος και φύλαξη σε σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), απομόνωση του ολικού RNA με το PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Λήψη αίματος και φύλαξη σε τυπικά σωληνάρια λήψης αίματος με EDTA ως αντιπηκτικό και απομόνωση του συνολικού RNA με μια τυπική μέθοδο απομόνωσης με οργανικά μέσα με καθαρισμό του RNA βασιζόμενο σε μεμβράνη διοξειδίου του πυριτίου. Τα σχετικά επίπεδα μεταγραφημάτων FOS καθορίστηκαν μέσω duplex RT-PCR πραγματικού χρόνου, χρησιμοποιώντας 18S rRNA ως εσωτερικό πρότυπο. Οι τιμές όλων των δειγμάτων που αναλύθηκαν σχεδιάστηκαν με μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν την  $\pm 3$ πλάσια συνολική ακρίβεια του προσδιορισμού ( $2,34 C_T$ ).



**Εικόνα 5: Σταθερότητα RNA σε δείγματα αίματος στους 18–25°C: IL1B.** Η λήψη αίματος και η απομόνωση του συνολικού RNA, μετά από φύλαξη στους 18–25°C, πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 4. Τα σχετικά επίπεδα μεταγραφημάτων IL1B καθορίστηκαν μέσω duplex RT-PCR πραγματικού χρόνου, χρησιμοποιώντας 18S rRNA ως εσωτερικό πρότυπο. Οι τιμές όλων των δειγμάτων που αναλύθηκαν σχεδιάστηκαν με μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν την  $\pm$  3πλάσια συνολική ακρίβεια του προσδιορισμού (1,93  $C_T$ ).



**Εικόνα 6: Σταθερότητα RNA σε δείγματα αίματος στους 2-8°C: FOS.** Λήψη δειγμάτων αίματος εις διπλούν από 10 δότες, τα οποία αποθηκεύτηκαν στους 2-8°C για τον αναγραφόμενο αριθμό ημερών, ακολουθούμενη από την απομόνωση του ολικού RNA. [A] Λήψη αίματος και φύλαξη σε σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), απομόνωση του ολικού RNA με το PAXgene Blood RNA Kit. [B] Λήψη αίματος και φύλαξη σε τυπικά σωληνάρια λήψης αίματος με EDTA ως αντιπηκτικό, και απομόνωση του συνολικού RNA με μια τυπική μέθοδο απομόνωσης με οργανικά μέσα με καθαρισμό του RNA βασισμένο σε μεμβράνη διοξειδίου του πυριτίου. Τα σχετικά επίπεδα μεταγραφημάτων FOS καθορίστηκαν μέσω duplex RT-PCR πραγματικού χρόνου, χρησιμοποιώντας 18S rRNA ως εσωτερικό πρότυπο. Οι τιμές όλων των δειγμάτων που αναλύθηκαν σχεδιάστηκαν με μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν την  $\pm$  3πλάσια συνολική ακρίβεια του προσδιορισμού (2,34 Ct).



**Εικόνα 7: Σταθερότητα RNA σε δείγματα αίματος στους 2-8°C: IL1B.** Η λήψη αίματος και η απομόνωση του συνολικού RNA, μετά από φύλαξη στους 2-8°C, πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 6. Τα σχετικά επίπεδα μεταγραφημάτων IL1B καθορίστηκαν μέσω duplex RT-PCR πραγματικού χρόνου, χρησιμοποιώντας 18S rRNA ως εσωτερικό πρότυπο. Οι τιμές όλων των δειγμάτων που αναλύθηκαν σχεδιάστηκαν με μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν την  $\pm$  3πλάσια συνολική ακρίβεια του προσδιορισμού (1,93 C<sub>T</sub>).



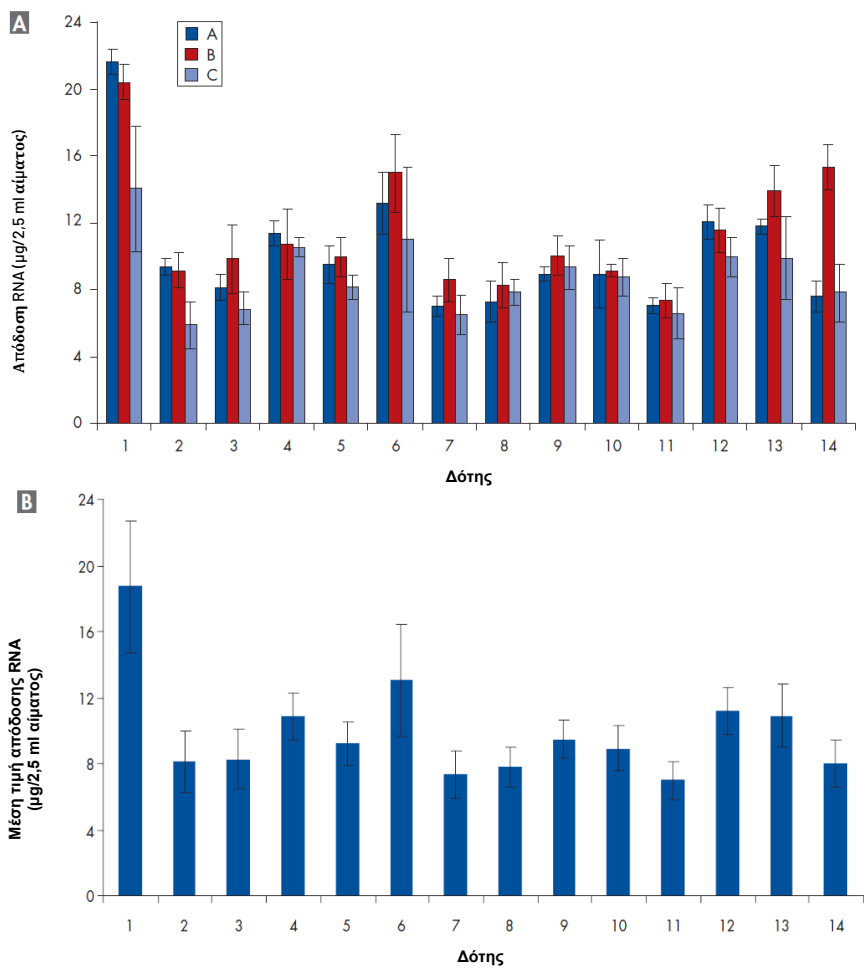
## Χειροκίνητη απομόνωση RNA

Το συνολικό RNA που απομονώνεται με το σύστημα PAXgene Blood RNA System είναι καθαρό. Χρησιμοποιώντας το χειροκίνητο πρωτόκολλο, οι τιμές  $A_{260}/A_{280}$  είναι μεταξύ 1,8 και 2,2 ενώ  $\leq 1\%$  (w/w) του γονιδιωματικού DNA είναι παρόν σε  $\geq 95\%$  όλων των δειγμάτων, όπως μετρείται από την ποσοτική real-time PCR μιας αλληλουχίας του γονιδίου β-ακτίνης. Τουλάχιστον 95% των δειγμάτων δεν δείχνουν αναστολή στην RT-PCR όταν το έκλουσμα ανέρχεται σε έως 30% του όγκου αντίδρασης RT-PCR.

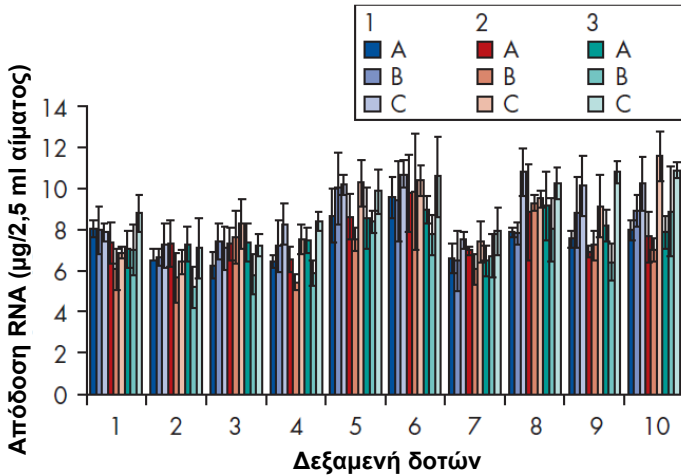
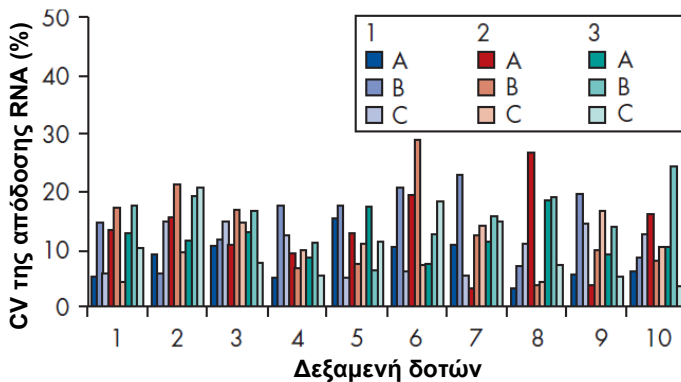
Χρησιμοποιώντας το χειροκίνητο πρωτόκολλο, ο μέσος χρόνος παρασκευής του δείγματος (με βάση τα δεδομένα από την παρασκευή 12 δειγμάτων) είναι περίπου 90 λεπτά\*, ενώ ο καθαρός χρόνος χειρισμού είναι μόνο 40 λεπτά. Σε πάνω από 95% των δειγμάτων που υποβάλλονται σε επεξεργασία, επιτυγχάνεται μια απόδοση RNA  $\geq 3$  μg από 2,5 ml ολικού αίματος υγιών δοτών. Καθώς οι αποδόσεις εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τους εξεταζόμενους δότες, μπορεί οι μεμονωμένες αποδόσεις να ποικίλλουν. Κατά την εξέταση μεμονωμένων ατόμων, το σύστημα PAXgene Blood RNA System παρέχει σε υψηλό βαθμό αναπαραγωγίμες και επαναλήψιμες αποδόσεις (εικόνα 8 και Εικόνα 9, σελίδες 50 και 51 αντίστοιχα) και αναπαραγωγίμη και επαναλήψιμη RT-PCR (Εικόνα 10 και Εικόνα 11, σελίδες 55 και 56 αντίστοιχα), γεγονός το οποίο το καθιστά εξαιρετικά αξιόπιστο για κλινικές διαγνωστικές εξετάσεις.

Η Εικόνα 8 (σελίδα 50) παρουσιάζει την αναπαραγωγιμότητα και επαναληψιμότητα του συστήματος PAXgene Blood RNA System. Σε περαιτέρω μελέτες εξετάστηκαν διαφορετικές παρτίδες του kit PAXgene Blood RNA, καθώς και η επίδραση του προσωπικού του εργαστηρίου που εκτελεί τις εξετάσεις, στην αναπαραγωγιμότητα της απόδοσης του RNA και στα αποτελέσματα απόδοσης της RT-PCR πραγματικού χρόνου. Επειδή για τις εξετάσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από δεξαμενή αίματος και όχι αίμα από μεμονωμένα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), τα αποτελέσματα των μελετών αυτών δεν αντανακλούν την επαναληψιμότητα του συστήματος ούτε τις διακυμάνσεις μεταξύ μεμονωμένων αιμοληψιών, αλλά απλώς και μόνο την επαναληψιμότητα της παρασκευής του δείγματος (βλέπε Εικόνα 9, σελίδα 51).

\* Συνολικός χρόνος εκτέλεσης του πρωτοκόλλου, συμπεριλαμβανομένου του χειρισμού των σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes που προηγείται (φυγοκεντρίσεις, πλύση ιζήματος και επαναιώρηση ιζήματος).



**Εικόνα 8: Αναπαραγωγή και επαναλήψιμη απομόνωση του RNA.** Δείγματα αίματος εις τετραπλούν από 14 δότες υποβλήθηκαν σε χειροκίνητη επεξεργασία από καθέναν από 3 τεχνολόγους (A, B, C). Χρησιμοποιήθηκαν τρία σύνολα εξοπλισμού, και όλα τα δείγματα που παρασκευάστηκαν από τον κάθε τεχνολόγο υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με χρήση του ίδιου εξοπλισμού. [A] Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις της απόδοσης RNA ανά επαναλαμβανόμενο δείγμα από τους ίδιους δότες και διαφορετικούς τεχνολόγους. [B] Δώδεκα επαναλαμβανόμενα δείγματα αίματος από καθέναν από τους 14 δότες υποβλήθηκαν σε επεξεργασία από 3 διαφορετικούς χειριστές. Παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις της απόδοσης RNA ανά δείγμα από τους ίδιους δότες και όλους τους τεχνολόγους. Για όλα τα δείγματα RNA, οι αναλογίες  $A_{260}/A_{280}$  κυμαίνονταν από 1,8 έως 2,2.

**A****B**

**Εικόνα 9: Επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα της απόδοσης του RNA από διαφορετικούς χειριστές και παρτίδες PAXgene Blood RNA Kit με χρήση δεξαμενοποιημένων δειγμάτων.** Από 30 διαφορετικούς δότες συλλέχθηκαν δείγματα αίματος σε σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) (12 σωληνάρια ανά δότη, συνολικά 360 σωληνάρια). Το περιεχόμενο των σωληναρίων από 3 δότες δεξαμενοποιήθηκε και, στη συνέχεια, κλασματοποιήθηκε εκ νέου σε 36 δείγματα. Τα 36 αυτά δείγματα ανά δεξαμενή 3 δοτών εξετάστηκαν χειροκίνητα από 3 διαφορετικούς χειριστές. Κάθε χειριστής χρησιμοποίησε για την απομόνωση RNA 3 διαφορετικές παρτίδες του kit PAXgene Blood RNA Kit και εξέτασε δείγματα εις τετραπλούν από καθεμία από τις 10 δεξαμενές δοτών. **[A]** Απόδοση RNA και τυπική απόκλιση για κάθε συνδυασμό χειριστή-παρτίδας. Δείγματα αίματος εις τετραπλούν από 10 δεξαμενές δοτών υποβλήθηκαν σε επεξεργασία από 3 διαφορετικούς χειριστές (A, B, C) με κάθε μία από τις 3 παρτίδες kit (1, 2, 3). Παρουσιάζονται οι μέσες αποδόσεις (στήλες) και οι τυπικές αποκλίσεις (ράβδοι σφαλμάτων) ανά τετραπλό δείγμα από την ίδια δεξαμενή δοτών για διαφορετικούς χειριστές και διαφορετικές παρτίδες κτ. **[B]** Υπολογισμός του συντελεστή μεταβλητότητας (CV) της απόδοσης RNA ανά δεξαμενή δοτών για όλους τους συνδυασμούς χειριστή-παρτίδας (A, B, C, 1, 2, 3) από τις μέσες τιμές και τις τυπικές αποκλίσεις της απόδοσης που εμφανίζονται στην Εικόνα 9A.

**Πίνακας 1Α: Αναπαραγωγιμότητα εντός κάθε παρτίδας και για κάθε χρήστη για επιλεγμένες δεξαμενές δοτών (1, 6, 9, 10)**

| Συνδυασμός δεδομένων | Δεξαμενή δοτών 1<br>( $5,1 \times 10^6$ κύτταρα/ml) |         |        | Δεξαμενή δοτών 6<br>( $6,5 \times 10^6$ κύτταρα/ml)   |         |        |
|----------------------|---|---------|--------|---|---------|--------|
|                      | Μέση απόδοση (μg)                                   | SD (μg) | CV (%) | Μέση απόδοση (μg)                                     | SD (μg) | CV (%) |
| Παρτίδα 1, χρήστης Α | 8,03  | 0,42    | 5      | 9,55  | 0,99    | 10     |
| Παρτίδα 1, χρήστης Β | 7,98  | 1,17    | 15     | 9,38  | 1,94    | 21     |
| Παρτίδα 1, χρήστης C | 7,87  | 0,45    | 6      | 10,71   | 0,65    | 6      |
| Παρτίδα 2, χρήστης Α | 7,32  | 0,98    | 13     | 9,78  | 1,89    | 19     |
| Παρτίδα 2, χρήστης Β | 6,09  | 1,04    | 17     | 9,82  | 2,83    | 29     |
| Παρτίδα 2, χρήστης C | 6,87  | 0,31    | 4      | 10,37   | 0,74    | 7      |
| Παρτίδα 3, χρήστης Α | 7,04  | 0,90    | 13     | 8,96  | 0,68    | 8      |
| Παρτίδα 3, χρήστης Β | 6,98  | 1,22    | 17     | 7,73  | 0,97    | 13     |
| Παρτίδα 3, χρήστης C | 8,78  | 0,89    | 10     | 10,59   | 1,94    | 18     |
|                      | Δεξαμενή δοτών 9<br>( $8,4 \times 10^6$ κύτταρα/ml) |         |        | Δεξαμενή δοτών 10<br>( $10,2 \times 10^6$ κύτταρα/ml) |         |        |
|                      | Μέση απόδοση (μg)                                   | SD (μg) | CV (%) | Μέση απόδοση (μg)                                     | SD (μg) | CV (%) |
| Παρτίδα 1, χρήστης Α | 7,52  | 0,41    | 6      | 7,96  | 0,49    | 6      |
| Παρτίδα 1, χρήστης Β | 8,82  | 1,72    | 19     | 8,90  | 0,76    | 9      |
| Παρτίδα 1, χρήστης C | 10,14   | 1,46    | 14     | 10,22   | 1,29    | 13     |
| Παρτίδα 2, χρήστης Α | 6,92  | 0,27    | 4      | 7,63  | 1,23    | 16     |
| Παρτίδα 2, χρήστης Β | 7,20  | 0,71    | 10     | 7,00  | 0,56    | 8      |
| Παρτίδα 2, χρήστης C | 9,14  | 1,52    | 17     | 11,56   | 1,21    | 10     |
| Παρτίδα 3, χρήστης Α | 8,18  | 0,76    | 9      | 7,85  | 0,82    | 10     |
| Παρτίδα 3, χρήστης Β | 6,41  | 0,88    | 14     | 8,88  | 2,17    | 24     |
| Παρτίδα 3, χρήστης C | 10,78   | 0,56    | 5      | 10,88   | 0,37    | 3      |

**Πίνακας 1B: Αναπαραγωγιμότητα μεταξύ όλων των παρτίδων κιτ για κάθε χρήστη για επιλεγμένες δεξαμενές δοτών (1, 6, 9, 10)**

| Συνδυασμός δεδομένων        | Δεξαμενή δοτών 1<br>( $5,1 \times 10^6$ κύτταρα/ml) |         |        | Δεξαμενή δοτών 6<br>( $6,5 \times 10^6$ κύτταρα/ml)   |         |        |
|-----------------------------|---|---------|--------|---|---------|--------|
|                             | Μέση απόδοση (μg)                                   | SD (μg) | CV (%) | Μέση απόδοση (μg)                                     | SD (μg) | CV (%) |
| Χρήστης Α, όλες οι παρτίδες | 7,46  | 0,85    | 11     | 9,43  | 1,22    | 13     |
| Χρήστης Β, όλες οι παρτίδες | 7,02  | 1,31    | 19     | 8,98  | 2,09    | 23     |
| Χρήστης C, όλες οι παρτίδες | 7,84  | 0,98    | 13     | 10,56   | 1,15    | 11     |
|                             | Δεξαμενή δοτών 9<br>( $8,4 \times 10^6$ κύτταρα/ml) |         |        | Δεξαμενή δοτών 10<br>( $10,2 \times 10^6$ κύτταρα/ml) |         |        |
|                             | Μέση απόδοση (μg)                                   | SD (μg) | CV (%) | Μέση απόδοση (μg)                                     | SD (μg) | CV (%) |
| Χρήστης Α, όλες οι παρτίδες | 7,54  | 0,72    | 10     | 7,81  | 0,82    | 11     |
| Χρήστης Β, όλες οι παρτίδες | 7,48  | 1,50    | 20     | 8,26  | 1,54    | 19     |
| Χρήστης C, όλες οι παρτίδες | 10,02   | 1,34    | 13     | 10,89   | 1,10    | 10     |

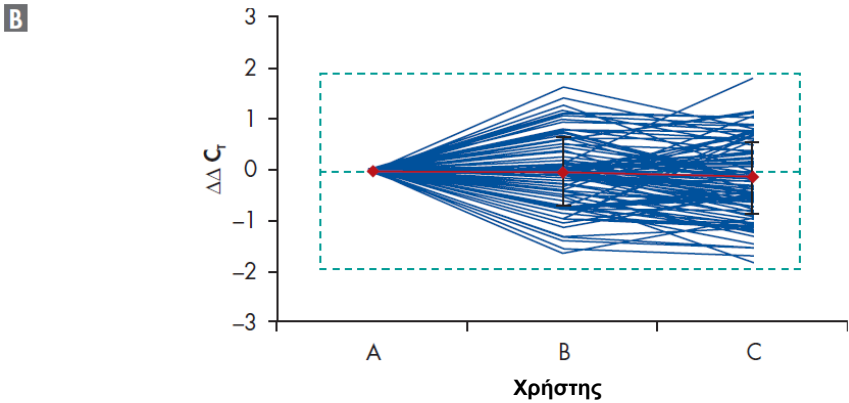
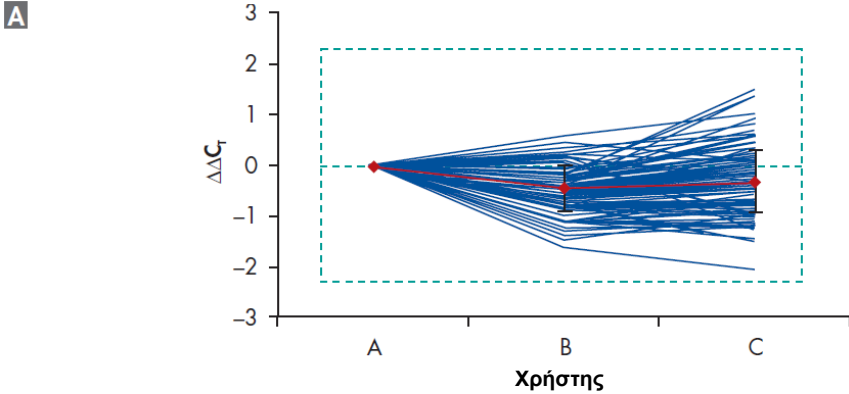
**Πίνακας 1C: Αναπαραγωγιμότητα εντός κάθε παρτίδας και μεταξύ όλων των χρηστών για επιλεγμένες δεξαμενές δοτών (1, 6, 9, 10)**

| Συνδυασμός δεδομένων       | Δεξαμενή δοτών 1<br>( $5,1 \times 10^6$ κύτταρα/ml) |         |        | Δεξαμενή δοτών 6<br>( $6,5 \times 10^6$ κύτταρα/ml)   |         |        |
|----------------------------|---|---------|--------|---|---------|--------|
|                            | Μέση απόδοση (μg)                                   | SD (μg) | CV (%) | Μέση απόδοση (μg)                                     | SD (μg) | CV (%) |
| Παρτίδα 1, όλοι οι χρήστες | 7,96  | 0,69    | 9      | 9,88  | 1,34    | 14     |
| Παρτίδα 2, όλοι οι χρήστες | 6,76  | 0,93    | 14     | 9,99  | 1,84    | 18     |
| Παρτίδα 3, όλοι οι χρήστες | 7,60  | 1,27    | 17     | 9,09  | 1,71    | 19     |
|                            | Δεξαμενή δοτών 9<br>( $8,4 \times 10^6$ κύτταρα/ml) |         |        | Δεξαμενή δοτών 10<br>( $10,2 \times 10^6$ κύτταρα/ml) |         |        |
|                            | Μέση απόδοση (μg)                                   | SD (μg) | CV (%) | Μέση απόδοση (μg)                                     | SD (μg) | CV (%) |
| Παρτίδα 1, όλοι οι χρήστες | 8,83  | 1,63    | 19     | 9,02  | 1,27    | 14     |
| Παρτίδα 2, όλοι οι χρήστες | 7,75  | 1,36    | 18     | 8,73  | 2,31    | 26     |
| Παρτίδα 3, όλοι οι χρήστες | 8,46  | 1,99    | 24     | 9,20  | 1,80    | 20     |

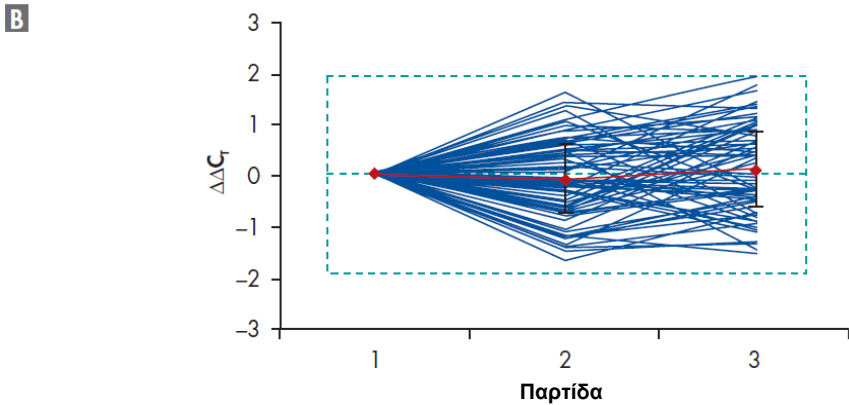
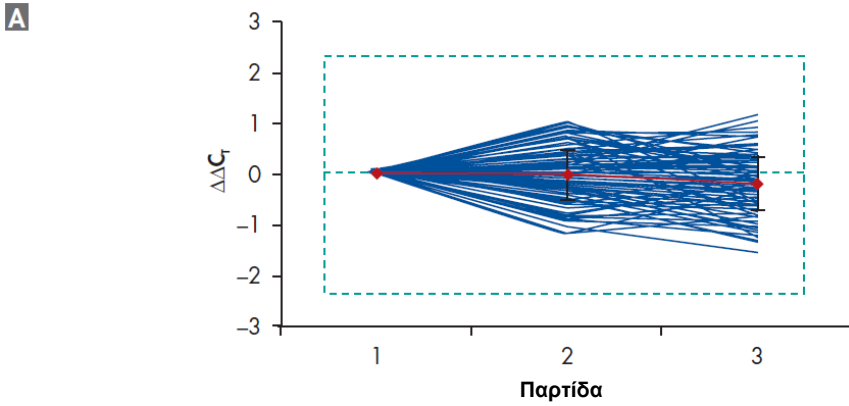
**Πίνακας 1D: Αναπαραγωγιμότητα μεταξύ όλων των παρτίδων και όλων των χρηστών για επιλεγμένες δεξαμενές δοτών (1, 6, 9, 10)**

| Συνδυασμός δεδομένων       | Δεξαμενή δοτών 1<br>( $5,1 \times 10^6$ κύτταρα/ml) |         |        | Δεξαμενή δοτών 6<br>( $6,5 \times 10^6$ κύτταρα/ml)   |         |        |
|----------------------------|---|---------|--------|---|---------|--------|
|                            | Μέση απόδοση (μg)                                   | SD (μg) | CV (%) | Μέση απόδοση (μg)                                     | SD (μg) | CV (%) |
| Παρτίδα 1, όλοι οι χρήστες | 7,44  | 1,09    | 15     | 9,66  | 1,65    | 17     |
|                            | Δεξαμενή δοτών 9<br>( $8,4 \times 10^6$ κύτταρα/ml) |         |        | Δεξαμενή δοτών 10<br>( $10,2 \times 10^6$ κύτταρα/ml) |         |        |
|                            | Μέση απόδοση (μg)                                   | SD (μg) | CV (%) | Μέση απόδοση (μg)                                     | SD (μg) | CV (%) |
| Παρτίδα 1, όλοι οι χρήστες | 8,35  | 1,70    | 20     | 8,99  | 1,80    | 20     |

Λεπτομερειακή ανάλυση από 4 αντιπροσωπευτικές δεξαμενές δοτών. Οι δεξαμενές επιλέχθηκαν βάσει του αριθμού των λευκοκυττάρων τους και αντιπροσωπεύουν την ανώτερη, μέση και κατώτερη τιμή του εύρους φυσιολογικών τιμών των λευκοκυττάρων ( $4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$  λευκοκύτταρα/ml). Ο αριθμός των λευκοκυττάρων αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή των 3 μετρήσεων λευκοκυττάρων από τους 3 δότες ανά δεξαμενή δοτών.



**Εικόνα 10: Αναπαραγωγίμτητα της RT-PCR — μεταξύ χρηστών.** Το απομονωμένο RNA του πειράματος που περιγράφεται στην Εικόνα 9 χρησιμοποιήθηκε για την RT-PCR πραγματικού χρόνου. Τα σχετικά επίπεδα μεταγραφημάτων **[A]** FOS και **[B]** IL1B καθορίστηκαν μέσω duplex RT-PCR πραγματικού χρόνου, χρησιμοποιώντας 18S rRNA ως εσωτερικό πρότυπο. Σχεδιάστηκαν οι τιμές για όλα τα δείγματα, σε σχέση με τις τιμές για τον χρήστη A (10 δεξαμενές δοτών × 3 παρτίδες kit × 4 επαναλήψεις = 120 σύνολα δεδομένων για κάθε γονίδιο), με μέσες τιμές (κόκκινες γραμμές) και τυπικές αποκλίσεις (μαύρες ράβδοι). Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν την ± 3πλάσια συνολική ακρίβεια των προσδιορισμών (FOS: 2,34  $C_t$ , IL1B: 1,93  $C_t$ ).



**Εικόνα 11: Αναπαραγωγίμτητα της RT-PCR – μεταξύ των παρτίδων κит.** Το απομονωμένο RNA του πειράματος που περιγράφεται στην Εικόνα 9 χρησιμοποιήθηκε για την RT-PCR πραγματικού χρόνου. Τα σχετικά επίπεδα μεταγραφημάτων **[A]** FOS και **[B]** IL1B καθορίστηκαν μέσω duplex RT-PCR πραγματικού χρόνου, χρησιμοποιώντας 18S rRNA ως εσωτερικό πρότυπο. Σχεδιάστηκαν οι τιμές όλων των δειγμάτων σε σχέση με τις τιμές για τις παρτίδες κит 1 (10 δεξαμενές δοτών × 3 χρήστες × 4 επαναλήψεις = 120 σειρές δεδομένων για κάθε γονίδιο) με μέσες τιμές (κόκκινες γραμμές) και τυπικές αποκλίσεις (μαύρες ράβδοι). Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν την ± 3πλάσια συνολική ακρίβεια των προσδιορισμών (FOS: 2,34 C<sub>T</sub>, IL1B: 1,93 C<sub>T</sub>).



**Πίνακας 2: Σύνοψη των αποτελεσμάτων της RT-PCR από την Εικόνα 10 και την Εικόνα 11Fig11**

| Σύστημα δοκιμασίας  | Προσδιορισμός FOS/18S rRNA       |                                 | Προσδιορισμός IL1B/18S rRNA      |                                 |
|---|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
|   | Μέση τιμή ( $\Delta\Delta C_T$ ) | $\pm$ SD ( $\Delta\Delta C_T$ ) | Μέση τιμή ( $\Delta\Delta C_T$ ) | $\pm$ SD ( $\Delta\Delta C_T$ ) |
| <b>Αναπαραγωγικότητα μεταξύ όλων των παρτίδων kit για κάθε χρήστη</b> |                                  |                                 |                                  |                                 |
| Όλοι οι χρήστες, παρτίδα 1–παρτίδα 1                                  | 0,00                             | 0,00                            | 0,00                             | 0,00                            |
| Όλοι οι χρήστες, παρτίδα 1–παρτίδα 2                                  | -0,03                            | 0,48                            | -0,07                            | 0,66                            |
| Όλοι οι χρήστες, παρτίδα 1–παρτίδα 3                                  | -0,21                            | 0,52                            | 0,11                             | 0,71                            |
| <b>Αναπαραγωγικότητα μεταξύ όλων των παρτίδων kit για κάθε χρήστη</b> |                                  |                                 |                                  |                                 |
| Όλες οι παρτίδες, χρήστης Α–χρήστης Α                                 | 0,00                             | 0,00                            | 0,00                             | 0,00                            |
| Όλες οι παρτίδες, χρήστης Α–χρήστης Β                                 | -0,46                            | 0,44                            | -0,06                            | 0,69                            |
| Όλες οι παρτίδες, χρήστης Α–χρήστης C                                 | -0,31                            | 0,60                            | -0,15                            | 0,71                            |

Χρήστης: Τεχνολόγος που εκτέλεσε τη μελέτη.

Παρτίδα: Αριθμός παρτίδας του kit που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή.

SD: Τυπική απόκλιση.

Εμφανίζονται οι μέσες τιμές  $\Delta\Delta C_T$  (N = 120) και οι τυπικές αποκλίσεις των δεδομένων που παρουσιάζονται στην Εικόνα 10 και στην Εικόνα 11.

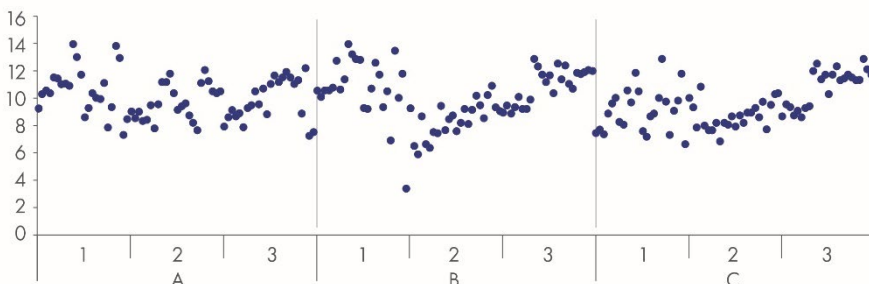
## Αυτοματοποιημένη απομόνωση του RNA

Σε πάνω από 95% των δειγμάτων που υποβάλλονται σε επεξεργασία, επιτυγχάνεται μια απόδοση RNA  $\geq 3$   $\mu\text{g}$  από 2,5 ml ολικού αίματος υγιών δοτών. Η Εικόνα 12 (σελίδα 58) παρουσιάζει την απόδοση του RNA από ένα σύνολο 216 δειγμάτων που παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας το αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο με 3 παρτίδες kit από 3 χειριστές. Επειδή για τις μελέτες αυτές χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από δεξαμενή αίματος αντί για μεμονωμένα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), τα αποτελέσματα αυτών των μελετών δεν αντανακλούν την απόδοση RNA που αναμένεται από επιμέρους δείγματα μεμονωμένων δειγματοληψιών. Δεδομένου ότι οι αποδόσεις εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τους δότες, οι μεμονωμένες αποδόσεις μπορεί να ποικίλλουν (Εικόνα 12, σελίδα 58).

Τουλάχιστον 95% των δειγμάτων δεν δείχνουν αναστολή στην RT-PCR όταν το έκλουσμα ανέρχεται σε έως 30% του όγκου αντίδρασης RT-PCR. Με τη χρήση του αυτοματοποιημένου πρωτοκόλλου δεν εντοπίζεται διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των δειγμάτων, όπως μετριέται με την ποσοτική RT-PCR πραγματικού χρόνου σε αλληλουχίες της ABL1 και μεταγραφημάτων FOS σε αρνητικά δείγματα RNA (νερό) αντιστοιχισμένα με θετικά δείγματα RNA (ανθρώπινο ολικό αίμα) στην ίδια εκτέλεση.

Το RNA που απομονώνεται με το σύστημα PAXgene Blood RNA System και το αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο είναι καθαρό, όπως φαίνεται από την έλλειψη αναστολής της RT-PCR και τιμές  $A_{260}/A_{280}$  μεταξύ 1,8 και 2,2.  $\leq 1\%$  (w/w) του γονιδιωματικού DNA είναι παρόν σε  $\geq 95\%$  όλων των δειγμάτων, όπως μετριέται με την ποσοτική real-time PCR σε αλληλουχία του γονιδίου β-ακτίνης. Η Εικόνα 13 και η Εικόνα 14 (σελίδα 59) παρουσιάζουν τις τιμές  $A_{260}/A_{280}$  και το σχετικό γονιδιωματικό DNA επί του συνόλου 216 δειγμάτων που παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας το αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο με 3 παρτίδες κιτ από 3 χειριστές.

Απόδοση RNA (μg/2,5 ml αίματος) QIAcube Connect MDx



**Εικόνα 12: Απόδοση RNA — αυτοματοποιημένη επεξεργασία με το QIAcube Connect MDx.** Δείγματα αίματος από μεμονωμένους δότες συλλέχθηκαν σε σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Το περιεχόμενο των σωληναρίων συνενώθηκε σε 6 δεξαμενές δοτών και, στη συνέχεια, κλασματοποιήθηκε εκ νέου. Συνολικά, εξετάστηκαν 216 σωληνάρια (δηλ. 36 ανά δεξαμενή) από 3 διαφορετικούς χειριστές (A, B, C). Κάθε χειριστής χρησιμοποίησε για την αυτοματοποιημένη απομόνωση 3 διαφορετικές παρτίδες (1, 2, 3) του κιτ PAXgene Blood RNA Kit με το QIAcube Connect MDx και εξέτασε δείγματα εις τετραπλούν από καθεμία από τις 6 δεξαμενές δοτών. Οι αποδόσεις RNA όλων των επιμέρους δειγμάτων παρουσιάζονται για κάθε συνδυασμό παρτίδας-χειριστή.



## Σταθερότητα απομονωμένου RNA

Τα δείγματα RNA που απομονώθηκαν από τα γεμάτα με αίμα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes με τη χρήση του κιτ PAXgene Blood RNA Kit είναι σταθερά για αποθήκευση 5 ετών στους  $-20^{\circ}\text{C}$  και για αποθήκευση 7 ετών στους  $-70^{\circ}\text{C}$  (τελικό σημείο μελετών).

# Σημαντικές σημειώσεις

## Χρήση του QIAcube Connect MDx

Διασφαλίστε ότι έχετε εξοικειωθεί με τη λειτουργία του QIAcube Connect MDx. Πριν ξεκινήσετε με το αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο PAXgene Blood RNA, διαβάστε το εγχειρίδιο χρήστη οργάνου και όλες τις πρόσθετες πληροφορίες που παρέχονται με το όργανο, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στις πληροφορίες ασφάλειας.

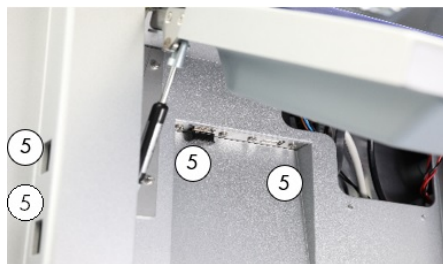
## Έναρξη του QIAcube Connect MDx

Κλείστε το κάλυμμα του QIAcube Connect MDx και ενεργοποιήστε το όργανο με τον κεντρικό διακόπτη (βλέπε Εικόνα 15, σελίδα 62).

Ακούγεται ένας ήχος βομβητή και εμφανίζεται η αρχική οθόνη. Το όργανο εκτελεί αυτόματα τεστ αρχικοποίησης.



Πρόσωση του QIAcube Connect MDx



Πτυσσόμενη οθόνη αφής



Πίσω όψη του QIAcube Connect MDx (αριστερή πλευρά)



Πίσω όψη του QIAcube Connect MDx (δεξιά πλευρά)

Εικόνα 15: Εξωτερικά χαρακτηριστικά του QIAcube Connect MDx.

- |  |   |
|--|---|
| <p>1 Οθόνη αφής</p> <p>2 Κάλυμμα</p> <p>3 Συρτάρι αποβλήτων</p> <p>4 Κεντρικός διακόπτης</p> | <p>5 2 θύρες USB στην αριστερή πλευρά της οθόνης αφής, 2 θύρες USB πίσω από την οθόνη αφής (μονάδα Wi-Fi συνδεδεμένη σε 1 θύρα USB)</p> <p>6 Θύρα Ethernet RJ-45</p> <p>7 Πρίζα καλωδίου τροφοδοσίας</p> <p>8 Έξοδος αέρα ψύξης</p> |
|--|---|

## Οθόνη αφής

Το QIAcube Connect MDx ελέγχεται με τη χρήση μιας οθόνης αφής. Η οθόνη αφής επιτρέπει στον χρήστη να λειτουργήσει το όργανο και καθοδηγεί τους χρήστες σε όλη τη ρύθμιση της τράπεζας εργασίας του χρήστη. Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των δειγμάτων, η οθόνη αφής εμφανίζει την κατάσταση του πρωτοκόλλου και τον χρόνο που απομένει.



Εικόνα 16: Πτυσσόμενη οθόνη αφής του QIAcube Connect MDx.

## Εγκατάσταση πρωτοκόλλων στο QIAcube Connect MDx

Μπορεί να απαιτείται μια αρχική εγκατάσταση πρωτοκόλλου πριν από την διεξαγωγή της πρώτης εκτέλεσης παρασκευής RNA στο QIAcube Connect MDx. Εγκαταστήστε και τα δύο πρωτόκολλα «PAXgene Blood RNA Part A» και «PAXgene Blood RNA Part B».

Τα πρωτόκολλα για το QIAcube Connect MDx παρέχονται στη διεύθυνση [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) και η λήψη τους πρέπει να γίνει στη μονάδα USB που παρέχεται με το όργανο. Αυτά τα πρωτόκολλα θα μεταφερθούν στο όργανο μέσω της θύρας USB.

Η θύρα USB (η οποία βρίσκεται στο πλάι της οθόνης αφής, βλέπε Εικόνα 15, σελίδα 62) επιτρέπει τη σύνδεση του QIAcube Connect MDx σε μια μονάδα μνήμης USB που παρέχεται με το όργανο. Αρχεία δεδομένων, όπως αρχεία καταγραφής ή αρχεία αναφορών, μπορούν επίσης να μεταφερθούν μέσω της θύρας USB από το όργανο στη μονάδα μνήμης USB.



Η θύρα USB προορίζεται για χρήση μόνο με τη μονάδα μνήμης USB που παρέχεται από την QIAGEN. Μη συνδέετε άλλες συσκευές στη θύρα αυτή.



Μην αφαιρείτε τη μονάδα USB κατά τη διάρκεια της λήψης πρωτοκόλλων ή μεταφοράς αρχείων δεδομένων ή κατά την εκτέλεση πρωτοκόλλου.

Για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τη διαδικασία της αποστολής πρωτοκόλλων στο QIAcube Connect MDx, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη του οργάνου.




## Εκτελείται φόρτωση του QIAcube Connect MDx

Για οικονομία χρόνου, η φόρτωση μπορεί να διεξαχθεί κατά τη διάρκεια του ενός ή και των δύο σταδίων φυγοκέντρησης 10 λεπτών (στάδια 3 και 5) στο «Πρωτόκολλο: Αυτοματοποιημένη απομόνωση του συνολικού RNA από ανθρώπινο ολικό αίμα που έχει συλλεχθεί σε σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)», σελίδα 34.

### Φιάλες αντιδραστηρίων

Πριν από κάθε εκτέλεση στο QIAcube Connect MDx, γεμίστε προσεκτικά τις 4 φιάλες αντιδραστηρίου με τα αντιδραστήρια που παρατίθενται στον πίνακα 3 (σελίδα 65) μέχρι τον μέγιστο δείκτη στάθμης ή, εάν δεν είναι δυνατόν, στη στάθμη που επιτρέπεται από τους όγκους ρυθμιστικών διαλυμάτων που παρέχονται στο kit PAXgene Blood RNA Kit. Επισημάνετε ευκρινώς τις φιάλες και τα καλύμματα με τα ονόματα των ρυθμιστικών διαλυμάτων και τοποθετήστε τις γεμάτες φιάλες στις κατάλληλες θέσεις στο στατώ φιαλών αντιδραστηρίων. Φορτώστε το στατώ στο τραπέζι εργασίας του οργάνου όπως απεικονίζεται (Εικόνα 17 και Εικόνα 18, σελίδες 66 και 67 αντίστοιχα).

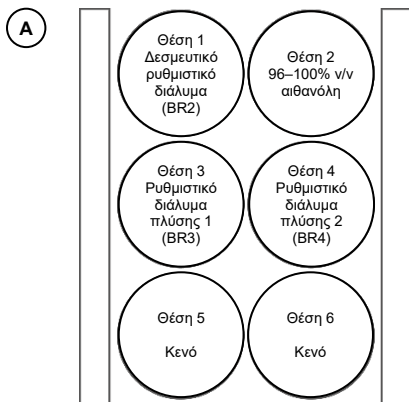


-  Ο παρεχόμενος όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος BR2 δεν θα γεμίσει μια φιάλη αντιδραστηρίου μέχρι τον δείκτη στάθμης. Τα ρυθμιστικά διαλύματα BR3 και BR4 ενδέχεται να μη γεμίσουν τη φιάλη μέχρι τον δείκτη στάθμης μετά την επεξεργασία πολλαπλών δειγμάτων σε προηγούμενες εκτελέσεις.
-  Βεβαιωθείτε ότι έχετε βγάλει το κάλυμμα από τις φιάλες πριν από την τοποθέτησή τους στο τραπέζι εργασίας.
-  Οι ποσότητες ρυθμιστικών διαλυμάτων που παρέχονται με το kit PAXgene Blood RNA Kit (50) επαρκούν κατά το μέγιστο για 7 εκτελέσεις παρασκευής RNA στο QIAcube Connect MDx με 2 έως 12 δείγματα ανά εκτέλεση. Γενικά, οι εκτελέσεις με μικρό αριθμό δειγμάτων ανά εκτέλεση πρέπει να αποφεύγονται για επεξεργασία 50 δειγμάτων συνολικά ανά kit. Περισσότερες από 7 εκτελέσεις παρασκευής RNA μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα μη επαρκείς όγκους ρυθμιστικών διαλυμάτων για την επεξεργασία των τελευταίων δειγμάτων.

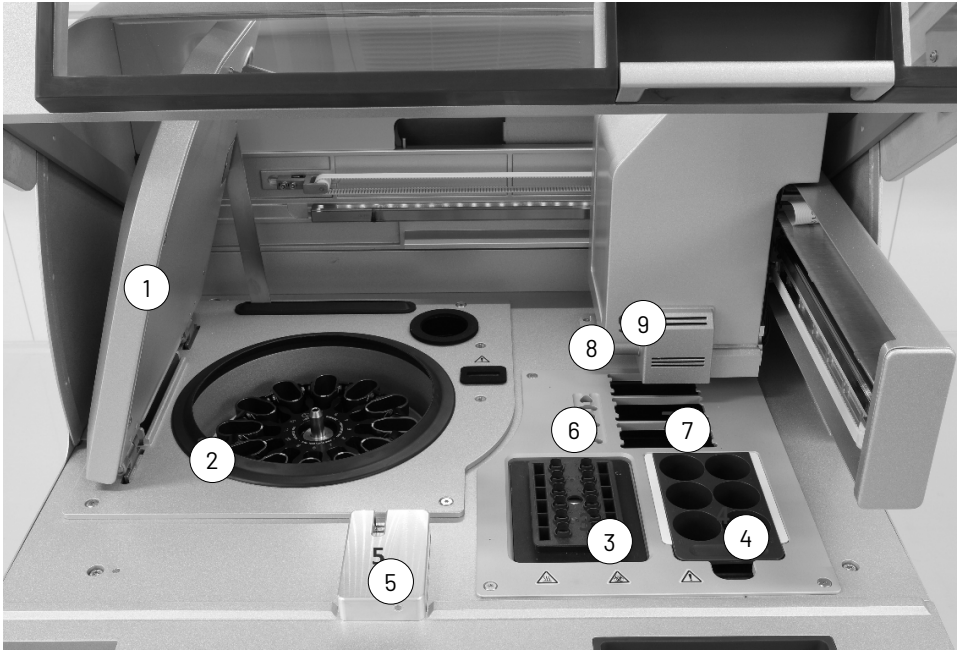
**Πίνακας 3: Θέσεις στο στατώ φιαλών αντιδραστηρίων**

| Θέση | Αντιδραστήριο                       |
|------|-------------------------------------|
| 1    | Δεσμευτικό ρυθμιστικό διάλυμα (BR2) |
| 2    | Αιθανόλη (96–100% v/v)              |
| 3    | Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 1 (BR3)   |
| 4    | Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2 (BR4)*  |
| 5    | – (αφήστε το κενό)                  |
| 6    | – (αφήστε το κενό)                  |

\* Το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2 (BR4) παρέχεται σε συμπυκνωμένη μορφή. Πριν από την πρώτη χρήση, προσθέστε στη φιάλη 4 όγκους αιθανόλης (96–100% v/v, βαθμός καθαρότητας p.a.), όπως υποδεικνύεται στη φιάλη για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας.



**Εικόνα 17: Φόρτωση του στατώ φιαλών αντιδραστηρίων. [A]** Σχηματική αναπαράσταση των θέσεων και του περιεχομένου των φιαλών στο στατώ φιαλών αντιδραστηρίων. **[B]** Φόρτωση του στατώ στο QIAcube Connect MDx.



**Εικόνα 18: Εσωτερική όψη του QIAcube Connect MDx.**

- |   |  |   |   |
|---|--|---|---|
| 1 | Κάλυμμα φυγόκεντρου                        | 6 | Υποδοχές MCT  |
| 2 | Φυγόκεντρος                                | 7 | 3 υποδοχές για στατώ ρυγχών   |
| 3 | Ανακινητήρας                               | 8 | Υποδοχές απόρριψης για ρύγχη και σήλες  |
| 4 | Στατώ φιαλών αντιδραστηρίων                | 9 | Ρομποτικός βραχίονας (περιλαμβάνει πιπέτα 1 καναλιού, αρπάγη, υπερηχητικό και οπτικό αισθητήρα, καθώς και UV LED) |
| 5 | Αισθητήρας ρύγχους και ασφάλιση καλύμματος |   |   |

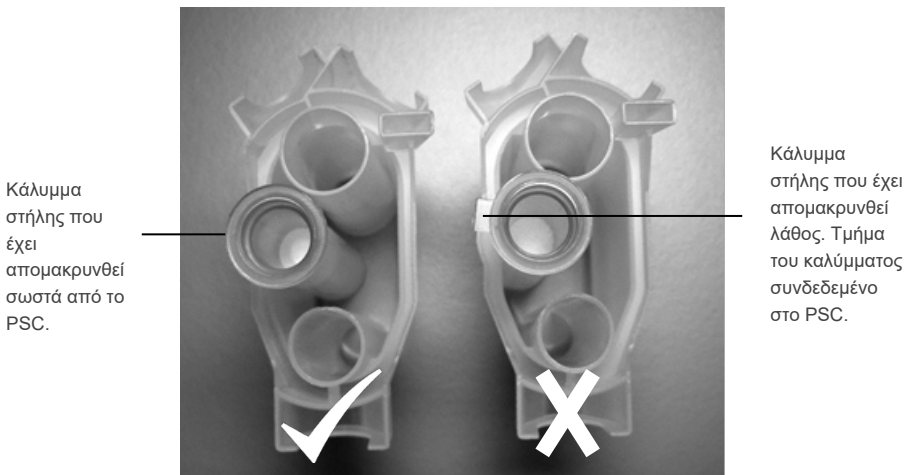
## Στήλες διαχωρισμού (PSC, PRC), MCT και πλαστικά υλικά QIAcube Connect MDx

Τοποθετήστε 2 στατώ ρυγχών γεμάτες με ρύγχη Filter-Tips 1.000 μl στο QIAcube Connect MDx (βλέπε Εικόνα 18, σελίδα 67). Επαναπληρώστε τα στατώ με ρύγχη όταν είναι απαραίτητο.

**i** Χρησιμοποιείτε μόνο ρύγχη φίλτρου 1.000 μl που είναι σχεδιασμένα για χρήση με το QIAcube Connect MDx.

Επισημάνετε τους προσαρμογείς ρότορα και τα σωληνάρια MCT για κάθε δείγμα χρησιμοποιώντας ανεξίτηλο μαρκαδόρο. Ανοίξτε το PSC που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί και κόψτε το κάλυμμα τελείως χρησιμοποιώντας ψαλίδι (βλέπε Εικόνα 19).

**i** Για τη σωστή λειτουργία της ρομποτικής αρπάγης του QIAcube Connect MDx, απομακρύνετε τελείως (αποκόψτε) τα καλύμματα και όλα τα πλαστικά μέρη που συνδέουν το κάλυμμα με το PSC (βλέπε Εικόνα 19). Διαφορετικά, η ρομποτική αρπάγη δεν μπορεί να πιάσει το PSC σωστά.



**Εικόνα 19: Φόρτωση του PSC.** Το PSC φορτώνεται στη μεσαία θέση του προσαρμογέα ρότορα. Κόψτε το κάλυμμα του PSC πριν από τη φόρτωση της στήλης.

Φορτώστε το PSC (χωρίς κάλυμμα, βλέπε Εικόνα 19, σελίδα 68), το PRC και το επισημασμένο σωληνάριο MCT στις σωστές θέσεις σε κάθε επισημασμένο προσαρμογέα ρότορα όπως φαίνεται στον Πίνακα 4 και στην Εικόνα 20.

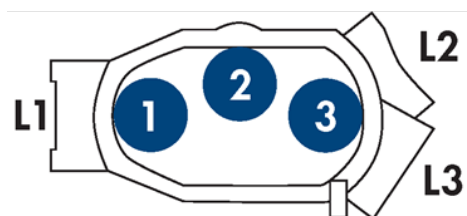


Βεβαιωθείτε ότι τα καλύμματα της στήλης διαχωρισμού (PRC) και του σωληναρίου MCT ωθούνται στον πυθμένα των υποδοχών στην άκρη του προσαρμογέα ρότορα, διαφορετικά κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρισης τα καλύμματα θα σπάσουν.

**Πίνακας 4: Πλαστικά αναλώσιμα στον προσαρμογέα ρότορα**

| Θέση | Αντιδραστήριο   | Θέση καλύμματος |
|------|---|-----------------|
| 1    | Στήλη διαχωρισμού PAXgene RNA (κόκκινη, PRC)  | L1              |
| 2    | Στήλη διαχωρισμού PAXgene Shredder (μοβ, PSC) (αποκόψτε το κάλυμμα πριν από την τοποθέτηση στον προσαρμογέα ρότορα) | -               |
| 3    | MCT*  | L3              |

\* Χρησιμοποιείτε τα σωληνάρια MCT (1,5 ml) που περιλαμβάνονται στο kit PAXgene Blood RNA Kit.



**Εικόνα 20: Θέσεις στον προσαρμογέα ρότορα.** Ο προσαρμογέας ρότορα έχει 3 θέσεις σωληναρίων (1–3) και τρεις θέσεις καλυμμάτων (L1–L3).

## Φόρτωση της φυγόκεντρου

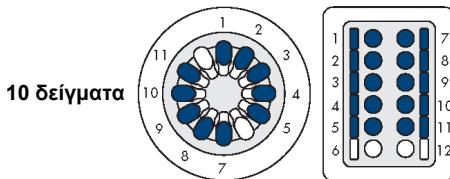
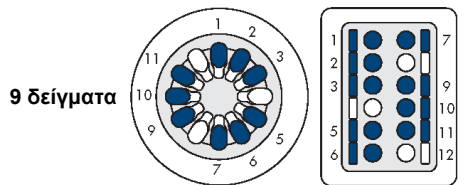
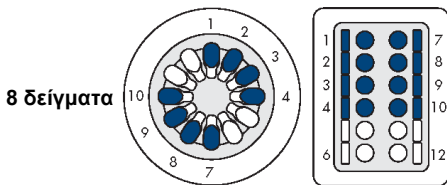
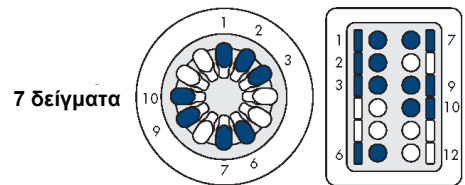
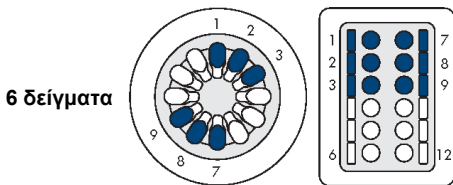
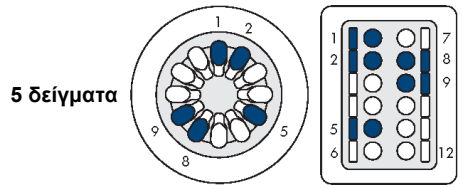
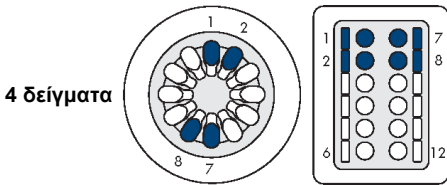
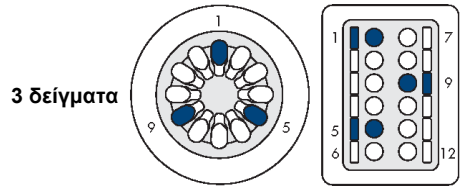
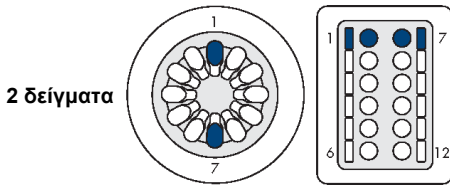
Τοποθετήστε τους συναρμολογημένους προσαρμογείς ρότορα εντός των κάδων του QIAcube Connect MDx όπως φαίνεται στην Εικόνα 21 παρακάτω.



Εάν επεξεργάζεστε λιγότερα από 12 δείγματα, βεβαιωθείτε ότι φορτώνετε τον ρότορα της φυγόκεντρου ισορροπημένα ακτινωτά (βλέπε Εικόνα 22, σελίδα 71). Πριν από την εκκίνηση της εκτέλεσης ενός πρωτοκόλλου, πρέπει να εγκατασταθούν όλοι οι κάδοι της φυγόκεντρου ακόμα και όταν πρόκειται να υποβληθούν σε επεξεργασία λιγότερα από 12 δείγματα. Δεν είναι δυνατή η επεξεργασία μεμονωμένου (ενός) δείγματος ή 11 δειγμάτων.



**Εικόνα 21:** Φόρτωση της φυγόκεντρου στο QIAcube Connect MDx. Φορτώστε τους συναρμολογημένους προσαρμογείς ρότορα εντός των κάδων της φυγόκεντρου.





**Εικόνα 22: Φόρτωση της φυγόκεντρο και του ανακινητήρα.** Εμφανίζονται οι θέσεις στη φυγόκεντρο και στον ανακινητήρα για την επεξεργασία από δύο (2) μέχρι δέκα (10) δείγματα. Δεν είναι δυνατή η επεξεργασία ενός (1) ή 11 δειγμάτων. Για την επεξεργασία 12 δειγμάτων, φορτώνονται όλες οι θέσεις στη φυγόκεντρο και στον ανακινητήρα (δεν παρουσιάζεται εικόνα).

## Σωληνάρια επεξεργασίας

Αφαιρέστε κάθε σωληνάριο PT που έχει απομείνει εντός των υποδοχών MCT από προηγούμενες εκτελέσεις (βλέπε Εικόνα 18, σελίδα 67). Γεμίστε 3 σωληνάρια PT με την ποσότητα αντιδραστηρίων που αναφέρεται στον πίνακα 5 σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων στην εκτέλεση.

Για μείγμα επώασης DNάσης I, μεταφέρετε με πιπέτα τον υποδεικνυόμενο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος κατάτμησης DNA (RDD) στο σωληνάριο PT και προσθέστε τον υποδεικνυόμενο όγκο αρχικού διαλύματος DNάσης I (RNFD). Αναμείξτε προσεκτικά με ρύγχος πιπέτας των 1.000 μl το ολικό μείγμα 3 φορές.

-  Χρησιμοποιείτε τα σωληνάρια PT των 2 ml που περιλαμβάνονται στο κιτ PAXgene Blood RNA Kit. Επισημάνετε τα σωληνάρια ευκρινώς με τα ονόματα των αντιδραστηρίων και τοποθετήστε τα στη σωστή θέση εντός των υποδοχών MCT, όπως αναφέρεται στον πίνακα 6 (σελίδα 73).
-  Η DNάση I (RNFD) είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στη φυσική μετουσίωση. Αναμείξτε μόνο με πιπέτα, χρησιμοποιώντας ρύγχη πιπέτας μεγάλης διαμέτρου για να μειώσετε τη διάτμηση. Μη χρησιμοποιείτε αναδευτήρα vortex για την ανάμειξη.

Διασφαλίστε ότι μεταφέρετε με πιπέτα μόνο τον απαιτούμενο όγκο όπως αναφέρεται στον Πίνακα 5 παρακάτω.



**Πίνακας 5: Όγκος αντιδραστηρίων που απαιτείται στα σωληνάρια PT για τις υποδοχές MCT**

| Αριθμός δειγμάτων | Όγκος αντιδραστηρίων για τον υποδεικνυόμενο αριθμό δειγμάτων (μl) |                                    |                                   |
|-------------------|---|------------------------------------|-----------------------------------|
|                   | Πρωτεϊνάση K (PK)   | Μείγμα επώασης DNάσης I            | Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) |
| 2                 | 126   | 187 (23 DNάση I + 164 Buffer RDD)  | 313                               |
| 3                 | 170   | 261 (33 DNάση I + 228 Buffer RDD)  | 399                               |
| 4                 | 213   | 334 (42 DNάση I + 292 Buffer RDD)  | 486                               |
| 5                 | 256   | 407 (51 DNάση I + 356 Buffer RDD)  | 572                               |
| 6                 | 299   | 481 (60 DNάση I + 421 Buffer RDD)  | 658                               |
| 7                 | 342   | 554 (69 DNάση I + 485 Buffer RDD)  | 745                               |
| 8                 | 386   | 627 (78 DNάση I + 549 Buffer RDD)  | 831                               |
| 9                 | 429   | 701 (88 DNάση I + 613 Buffer RDD)  | 918                               |
| 10                | 472   | 775 (97 DNάση I + 678 Buffer RDD)  | 1004                              |
| 12                | 558   | 921 (115 DNάση I + 806 Buffer RDD) | 1177                              |

**Πίνακας 6: Υποδοχές MCT**

|             | Θέση                    |                         |                                   |
|-------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
|             | A                       | B                       | Γ                                 |
| Περιεχόμενο | Proteinase K            | Μείγμα επώασης DNάσης I | Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) |
| Δοχείο      | Σωληνάριο επεξεργασίας* | Σωληνάριο επεξεργασίας* | Σωληνάριο επεξεργασίας*           |

\* Χρησιμοποιείτε τα σωληνάρια PT των 2 ml που περιλαμβάνονται στο κιτ PAXgene Blood RNA Kit.

# Απόρριψη

Για την ασφαλή απόρριψη μετά τη συλλογή δειγμάτων και τη χειροκίνητη απομόνωση RNA, ανατρέξτε στις πληροφορίες και στις προφυλάξεις ασφάλειας στις σελίδες 18 και 19 αντίστοιχα.

Επιπρόσθετα, για αυτοματοποιημένη απομόνωση του RNA με τη χρήση του QIAcube Connect MDx, ανατρέξτε στην Εικόνα 21 και στην Εικόνα 22, σελίδες 70 και 71 αντίστοιχα, όπου υποδεικνύονται οι ειδικές υποδοχές χρησιμοποιημένων ρυγχών και στηλών για απόρριψη.

# Βιβλιογραφία

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.

# Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση ενδεχόμενων προβλημάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στη σελίδα «Συχνές ερωτήσεις» του Κέντρου Τεχνικής Υποστήριξης της εταιρείας μας: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Οι επιστήμονες του τμήματος τεχνικής εξυπηρέτησης της QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι να απαντήσουν σε τυχόν ερωτήσεις σχετικά με τις πληροφορίες και τα πρωτόκολλα που περιέχονται στο παρόν εγχειρίδιο ή τις τεχνολογίες παρασκευής δειγμάτων και προσδιορισμού (για πληροφορίες επικοινωνίας, ανατρέξτε στο οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε τον ιστότοπο [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

| Παρατηρήσεις και προτάσεις   |  |
|--|--|
| <b>Αποδόμηση του RNA</b>   |  |
| a) Επιμόλυνση με RNάση   |  Προσέχετε να μην προστεθεί RNάση στα αντιδραστήρια κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ή του μεταγενέστερου χειρισμού (βλέπε Παράρτημα Α, σελίδα 81).   |
| <b>Χαμηλή απόδοση RNA</b>  |  |
| b) Λιγότερο από 2,5 ml αίματος συλλέχθηκαν στο σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT)                    |  Βεβαιωθείτε ότι 2,5 ml αίματος συλλέγονται στο σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT), βλέπε <i>Εγχειρίδιο σωληναρίου PAXgene Blood RNA Tube</i>   |
| c) Μέτρηση συγκέντρωσης RNA στο νερό   |  Το RNA πρέπει να αραιώνεται σε 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* για ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό (βλέπε Παράρτημα Β, σελίδα 83).   |
| d) Μεταφορά κατακεραματισμένων κυττάρων στο PRC στα στάδια 9 και 10 του χειροκίνητου πρωτοκόλλου         |  Αποφύγετε τη μεταφορά μεγάλων σωματιδίων όταν μεταφέρετε με πιπέτα το υπερκείμενο υγρό στο στάδιο 7 του χειροκίνητου πρωτοκόλλου (μεταφορά μικρών σωματιδίων δεν θα επηρεάσει τη διαδικασία).  |
| e) Μη ολοκληρωτική απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού στο στάδιο 3                                       |  Βεβαιωθείτε ότι το υπερκείμενο υγρό απομακρύνθηκε πλήρως. Κατά την έκχυση του υπερκείμενου υγρού, απομακρύνετε τα σταγονίδια από το χείλος του σωληναρίου PAXgene Blood RNA Tube (BRT) με ένα χαρτομάντιλο. Λάβετε προφυλάξεις για την αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης. |
| f) Μετά τη συλλογή στο σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT), το αίμα επωάστηκε για λιγότερο από 2 ώρες |  Μετά τη συλλογή στο σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT), επωάστε το αίμα τουλάχιστον για 2 ώρες.  |


\* Κατά την εργασία με χημικές ουσίες, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (Safety Data Sheets, SDS), τα οποία διατίθενται από τον προμηθευτή του προϊόντος.

| Παρατηρήσεις και προτάσεις   |   |
|--|---|
| <b>Χαμηλή τιμή <math>A_{260}/A_{280}</math></b>                                  |   |
| g) Χρησιμοποιήθηκε νερό για την αραιώση του RNA για τη μέτρηση $A_{260}/A_{280}$ |  Χρησιμοποιήστε 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, για την αραιώση του RNA πριν από τη μέτρηση της καθαρότητας* (βλέπε Παράρτημα Β, σελίδα 83).   |
| h) Το φασματοφωτόμετρο δεν μηδενίστηκε σωστά                                     |  Μηδενίστε το φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιώντας ένα τυφλό δείγμα που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) και 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, στην ίδια αναλογία με τα δείγματα που ελέγχονται. Το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) έχει υψηλή απορρόφηση στα 220 nm, που οδηγεί σε υψηλές τιμές απορρόφησης υποβάθρου εάν το φασματοφωτόμετρο δεν μηδενιστεί σωστά. |
| <b>Δυσλειτουργία του οργάνου</b>   |   |
| i) Το QIAcube Connect MDx δεν λειτουργεί σωστά                                   | Διαβάστε το <i>Εγχειρίδιο χρήση QIAcube Connect MDx</i> δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στην ενότητα αντιμετώπισης προβλημάτων. Διασφαλίστε ότι το όργανο συντηρείται σωστά, όπως περιγράφεται στο εγχειρίδιο χρήστη.  |

\* 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.

# Σύμβολα

Τα παρακάτω σύμβολα ενδέχεται να εμφανίζονται στις οδηγίες χρήσης ή στη συσκευασία και την επισήμανση. Πρόσθετα σύμβολα περιγράφονται στην ενότητα Περιεχόμενα του κιτ (σελίδα 6).

| Σύμβολο   | Ορισμός συμβόλου                                       |
|---|--|
| V<N1>   | Έκδοση <N1> του προϊόντος                              |
|  <N2> | Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N2> εξετάσεις |
|       | Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης                      |
|       | Ημερομηνία λήξης                                       |
| <b>IVD</b>  | In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν           |
| <b>REF</b>  | Αριθμός καταλόγου                                      |
| <b>LOT</b>  | Αριθμός παρτίδας                                       |
| <b>MAT</b>  | Αριθμός υλικού   |
| <b>COMP</b>   | Συστατικά  |
| <b>NUM</b>  | Αριθμός  |
| <b>KU</b>   | Μονάδες Kunitz   |
| <b>ADD</b>  | Προσθήκη   |
| <b>CONT</b>   | Περιέχει   |
| <b>RCNS</b>   | Ανασυσταθέν  |

**DNase**

Δεσοξυριβονουκλεάση I

**EtOH**

Αιθανόλη

**GITC**

Ισοθειοκυανική γουανιδίνη

**RNase-Free DNase Set**

RNase-Free DNase Set

**GTIN**

Παγκόσμιος κωδικός μονάδων εμπορίας



Περιορισμός θερμοκρασίας



Άνω όριο θερμοκρασίας



Κατασκευαστής

**EC REP**

Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρώπη (EE) 2017/746



Σημαντική σημείωση



Προσθήκη αιθανόλης



Σήμανση CE. Αυτό το προϊόν πληροί τις απαιτήσεις του Κανονισμού (ΕΕ) 2017/746 για τα in vitro διαγνωστικά ιατροτεχνολογικά προϊόντα.

**UDI**

Αποκλειστική ταυτοποίηση ιατροτεχνολογικού προϊόντος



Προσοχή



ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ: Θερμή επιφάνεια

# Στοιχεία επικοινωνίας

Στην QIAGEN είμαστε υπερήφανοι για την ποιότητα και τη διαθεσιμότητα της τεχνικής υποστήριξής μας. Τα τμήματα τεχνικής εξυπηρέτησης της εταιρείας μας είναι πλαισιωμένα με έμπειρους επιστήμονες με ευρεία πρακτική και θεωρητική γνώση στη μοριακή βιολογία και στη χρήση των προϊόντων της PreAnalytiX. Εάν έχετε ερωτήσεις που αφορούν το kit PAXgene Blood RNA Kit, μη διστάσετε να επικοινωνήσετε μαζί μας.

Για τεχνική υποστήριξη και περισσότερες πληροφορίες, επισκεφθείτε το κέντρο τεχνικής υποστήριξης στην ιστοσελίδα [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), καλέστε στο 00800-22-44-6000 ή απευθυνθείτε σε κάποιο από τα τμήματα τεχνικής υποστήριξης της QIAGEN ή τους κατά τόπους αντιπροσώπους (δείτε το οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε την ιστοσελίδα [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).



# Παράρτημα Α: Γενικές υποδείξεις για τον χειρισμό του RNA

## Χειρισμός RNA



Οι ριβονουκλεάσες (RNάσες) είναι ιδιαίτερα σταθερά και ενεργά ένζυμα τα οποία γενικά δεν χρειάζονται συμπαραγόντες για να λειτουργήσουν. Επειδή οι RNάσες αδρανοποιούνται δύσκολα και ακόμα και μικρές ποσότητες επαρκούν για την αποδόμηση του RNA, δεν πρέπει να χρησιμοποιείτε γυάλινα ή πλαστικά υλικά εργαστηρίου τα οποία δεν είναι απαλλαγμένα από κάθε πρόσμιξη με RNάση. Θα πρέπει να είστε ιδιαίτεροι προσεκτικοί και να αποφεύγετε την ακούσια προσθήκη RNασών στο δείγμα RNA κατά τη διάρκεια ή μετά τη διαδικασία απομόνωσης. Για τη δημιουργία και τη διατήρηση ενός περιβάλλοντος χωρίς RNάσες, θα πρέπει να λάβετε μέτρα προφύλαξης κατά την προκαταρκτική επεξεργασία και να χρησιμοποιείτε αναλώσιμα και μη αναλώσιμα δοχεία και διαλύματα κατά την εργασία με RNA.

## Γενικές οδηγίες κατά τον χειρισμό



Κατά την εργασία με RNA πρέπει πάντοτε να εφαρμόζονται οι κατάλληλες μικροβιολογικές τεχνικές ασηψίας. Τα χέρια και τα σωματίδια σκόνης μεταφέρουν βακτήρια και μύκητες που αποτελούν τις συχνότερες αιτίες επιμόλυνσης με RNάση. Για το λόγο αυτό, φοράτε πάντοτε γάντια από λατέξ ή βινύλιο όταν εργάζεστε με αντιδραστήρια και δείγματα RNA, για να αποφύγετε την επιμόλυνση με RNάση από την επιφάνεια του δέρματος ή από σκονισμένα όργανα του εργαστηρίου. Αλλάζετε γάντια συχνά και διατηρείτε τα σωληνάρια κλειστά όποτε είναι δυνατόν. Διατηρείτε το καθαρό RNA σε πάγο όταν υποπολλαπλάσια μεταφέρονται με πιπέτα για τις καθοδικές εφαρμογές.

Πρωτόκολλα για την απομάκρυνση προσμίξεων RNάσης από γυάλινα υλικά και διαλύματα μπορείτε να βρείτε σε γενικούς οδηγούς μοριακής βιολογίας, όπως π.χ. στο Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

# Παράρτημα Β: Ποσοτικοποίηση και προσδιορισμός της ποιότητας του συνολικού RNA

## Ποσοτικοποίηση RNA

Η συγκέντρωση του RNA θα πρέπει να προσδιορίζεται με τη μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm ( $A_{260}$ ) στο φασματοφωτόμετρο. Για τη διασφάλιση της σημαντικότητας, οι τιμές πρέπει να εμπίπτουν στο γραμμικό εύρος του φασματοφωτομέτρου. Η απορρόφηση 1 μονάδας στα 260 nm αντιστοιχεί σε 44 μg RNA ανά ml ( $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ ). Η σχέση αυτή ισχύει μόνο για μετρήσεις σε 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.\* Για το λόγο αυτό, εάν είναι απαραίτητο να αραιωθεί το δείγμα RNA, αυτό θα πρέπει να γίνει σε 10 mM Tris-HCl. Όπως περιγράφεται παρακάτω (βλέπε «Καθαρότητα του RNA», στη σελίδα 84), η αναλογία των τιμών απορρόφησης στα 260 nm και 280 nm δίνει μια εκτίμηση της καθαρότητας του RNA. Κατά τη μέτρηση των δειγμάτων RNA, βεβαιωθείτε ότι οι κυβέτες είναι ελεύθερες RNάσης. Μηδενίστε το φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιώντας ένα τυφλό δείγμα που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) και ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl στην ίδια αναλογία με τα δείγματα που ελέγχονται. Το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) έχει υψηλή απορρόφηση στα 220 nm, που οδηγεί σε υψηλές τιμές απορρόφησης υποβάθρου εάν το φασματοφωτόμετρο δεν μηδενιστεί σωστά. Ένα παράδειγμα για τον υπολογισμό του ποσοτικού προσδιορισμού του RNA δίνεται παρακάτω.

Όγκος δείγματος RNA = 80 μl  
Αραίωση (1/15) = 10 μl δείγματος RNA + 140 μl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5

Μέτρηση απορρόφησης του αραιωμένου δείγματος σε κυβέτα (ελεύθερη RNάσης).

\* Κατά την εργασία με χημικές ουσίες, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (Safety Data Sheets, SDS), τα οποία διατίθενται από τον προμηθευτή του προϊόντος.

$$\begin{aligned}
 A_{260} &= 0,3 \\
 \text{Συγκέντρωση δείγματος} &= 44 \times A_{260} \times \text{συντελεστής αραίωσης} \\
 &= 44 \times 0,3 \times 15 \\
 &= 198 \mu\text{g/ml} \\
 \text{Συνολική απόδοση} &= \text{συγκέντρωση} \times \text{όγκος δείγματος σε χιλιοστόλιτρα} \\
 &= 198 \mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml} \\
 &= 15,8 \mu\text{g RNA}
 \end{aligned}$$

## Καθαρότητα του RNA

Η αναλογία των τιμών στα 260 και 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) παρέχει μια εκτίμηση της καθαρότητας του RNA όσον αφορά τις ουσίες επιμόλυνσης που απορροφούν το υπεριώδες (UV) φως, όπως η πρωτεΐνη. Ωστόσο, η αναλογία  $A_{260}/A_{280}$  εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την τιμή του pH. Χαμηλό pH έχει ως αποτέλεσμα χαμηλή αναλογία  $A_{260}/A_{280}$  και μειωμένη ευαισθησία έναντι επιμολύνσεων με πρωτεΐνη.\* Για ακριβείς τιμές, προτείνουμε τη μέτρηση της απορρόφησης σε 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Το καθαρό RNA έχει αναλογία  $A_{260}/A_{280}$  1,8–2,2 σε 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Μηδενίστε το φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιώντας ένα τυφλό δείγμα που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) και ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl στην ίδια αναλογία με τα δείγματα που ελέγχονται. Το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) έχει υψηλή απορρόφηση στα 220 nm, που οδηγεί σε υψηλές τιμές απορρόφησης υποβάθρου εάν το φασματοφωτόμετρο δεν μηδενιστεί σωστά.

\* 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.

# Παράρτημα Γ: Χειρισμός των σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Οι ακόλουθες συστάσεις από την BD μπορεί να είναι χρήσιμες όταν χειρίζεστε σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Βλ. το *Εγχειρίδιο σωληναρίου PAXgene Blood RNA Tube* για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

## Οδηγίες για την αφαίρεση του κλείστρου BD Hemogard

1. Πιάστε με το ένα χέρι το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT), τοποθετώντας τον αντίχειρα κάτω από το κλείστρο BD Hemogard. (Για επιπλέον σταθερότητα, στηρίξτε τον βραχίονά σας σε μια σταθερή επιφάνεια.) Γυρίστε με το άλλο χέρι το κλείστρο BD Hemogard, ενώ συγχρόνως πιέζετε με τον αντίχειρα του άλλου χεριού προς τα πάνω μόνο μέχρι να χαλαρώσει το πώμα του σωληναρίου.
2. Απομακρύνετε τον αντίχειρα πριν την αφαίρεση του κλείστρου. Μην πιέζετε το κλείστρο για να το αφαιρέσετε από το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) με τον αντίχειρα. Προσοχή: Εάν το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) περιέχει αίμα, υπάρχει κίνδυνος έκθεσης σε μολυσματικές ουσίες. Για την αποφυγή τραυματισμού κατά την αφαίρεση του κλείστρου, είναι σημαντικό να απομακρύνετε τον αντίχειρα με τον οποίο πιέζετε το κλείστρο προς τα επάνω από το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) αμέσως μόλις χαλαρώσει το κλείστρο BD Hemogard.
3. Απομακρύνετε το κλείστρο από το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Στην απίθανη περίπτωση που το πλαστικό προστατευτικό κάλυμμα αποχωριστεί από το ελαστικό πώμα, μην επανασυναρμολογήτε το κλείστρο. Αφαιρέστε προσεκτικά το ελαστικό πώμα εισχώρησης από το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

## **Οδηγίες για την εισαγωγή του δευτερεύοντος κλείστρου BD Hemogard**

1. Τοποθετήστε ξανά το κλείστρο στο σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Περιστρέψτε και ωθήστε προς τα κάτω το πώμα εισχώρησης μέχρι να επανεισαχθεί πλήρως. Το πώμα εισχώρησης πρέπει να επανεισαχθεί πλήρως προκειμένου το κλείστρο να παραμείνει σταθερά στη θέση του στο σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) κατά τον χειρισμό.

# Πληροφορίες παραγγελίας

| Προϊόν  | Περιεχόμενα  | Αριθ. καταλ. |
|---|--|--------------|
| PAXgene Blood RNA Kit (50)  | 50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, σωληνάρια επεξεργασίας, DNάση I ελεύθερη RNάσης, αντιδραστήρια και ρυθμιστικά διαλύματα ελεύθερα RNάσης. Για χρήση σε συνδυασμό με τα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes   | 762174       |
| PAXgene Blood RNA Tubes (100)   | 100 σωληνάρια λήψης αίματος  | 762165       |
| <b>Σχετικά προϊόντα που μπορούν να παραγγελθούν από την QIAGEN για αυτοματοποιημένη απομόνωση RNA στο QIAcube</b> |  |              |
| Starter Pack, QIAcube   | Το πακέτο περιλαμβάνει: στατώ φιαλών αντιδραστηρίων (3), ταινίες επισήμανσης στατώ (8), ρύγχη με φίλτρο 200 μl (1.024), ρύγχη με φίλτρο 1.000 μl (1.024), ρύγχη με φίλτρο 1.000 μl μεγάλης διαμέτρου (1.024), φιάλες αντιδραστηρίων 30 ml (18), προσαρμογείς ρότορα (240), στήριγμα προσαρμογέα ρότορα | 990395       |
| Filter-Tips, 1000 μL (1024)   | Στείρα, αναλώσιμα ρύγχη πιπετών με φίλτρο, σε στατώ  | 990352       |
| Reagent Bottles, 30 mL (6)  | Reagent Bottles (30 ml) με καλύμματα, συσκευασία των 6, για χρήση με το στατώ φιαλών αντιδραστηρίων QIAcube  | 990393       |
| Rotor Adapters (10 × 24)  | Για 240 παρασκευές: 240 προσαρμογείς ρότορα μίας χρήσης, για χρήση με το QIAcube   | 990394       |
| Reagent Bottle Rack   | Στατώ για τη συγκράτηση φιαλών αντιδραστηρίων 6 × 30 ml στο τραπέζι εργασίας QIAcube   | 9026197      |
| Rotor Adapter Holder  | Στήριγμα για 12 αναλώσιμους προσαρμογείς ρότορα, για χρήση με το QIAcube   | 990392       |

| Προϊόν  | Περιεχόμενα   | Αριθ. καταλ.  |
|---|---|---------------|
| <b>Σχετικά προϊόντα που μπορούν να παραγγελθούν από την BD για συλλογή αίματος με τα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)*</b> |   |               |
| BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set   | Βελόνες 21G, 0,75 ιντσών (0,8 x 19 mm), σωλήνας 12 ιντσών (305 mm) με προσαρμογέα luer, 50 ανά κουτί, 200 ανά κιβώτιο | 367286/367281 |
| BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set   | Βελόνα 21G 3/4 ιντσών (0,8 x 19 mm), σωλήνας 12 ιντσών (305 mm) με προσαρμογέα luer. 50/κουτί, 200/κιβώτιο            | 367344        |
| BD Vacutainer One-Use Holder  | Περίβλημα μόνο για διάμετρο 13 mm και 16 mm, 1.000/κιβώτιο  | 364815        |
| BD Vacutainer Plus Serum Tubes  | 13 x 75 mm, αναρρόφηση 4,0 ml, με κόκκινο κλείστρο BD Hemogard και χάρτινη ετικέτα, 100/κουτί, 1.000/κιβώτιο          | 368975/367812 |
| BD Vacutainer EST Tube  | 13 x 75 mm, αναρρόφηση 3,0 ml, με διαφανές κλείστρο BD Hemogard και διάφανη ετικέτα, 100/κουτί, 1.000/κιβώτιο         | 362725        |
| BD Vacutainer No Additive (Z) Tube  | 13 x 75 mm, αναρρόφηση 3,0 ml, με διαφανές κλείστρο BD Hemogard και χάρτινη ετικέτα, 100/κουτί, 1.000/κιβώτιο         | 366703        |

\* Αυτά τα παρελκόμενα για τη λήψη αίματος αποτελούν συνήθη προϊόντα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν με τα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Περαιτέρω πληροφορίες για αυτά τα παρελκόμενα, μαζί με πληροφορίες παραγγελίας μπορείτε να βρείτε στην ιστοσελίδα [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).



# Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου

| Ημερομηνία            | Αλλαγές  |
|-----------------------|--|
| [R1] Απρίλιος 2022    | Αρχική κυκλοφορία IVDR   |
| [R2] Φεβρουάριος 2023 | Η διεύθυνση της PreAnalytiX GmbH έχει αλλάξει από «Feldbachstrasse» σε «Garstligweg 8». Προσθήκη προϊόντων BD στις πληροφορίες παραγγελίας. Ενημέρωση πληροφοριών ασφάλειας. |

## Σημειώσεις



Για τις τρέχουσες πληροφορίες άδειας χρήσης και αποποιήσεις σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο αντίστοιχο εγχειρίδιο ή το εγχειρίδιο χρήστη των κιτ της PreAnalytiX ή της QIAGEN. Τα εγχειρίδια και τα εγχειρίδια χρήστη των κιτ της PreAnalytiX ή της QIAGEN είναι διαθέσιμα στον ιστότοπο [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) και [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από το τμήμα Τεχνικής Υποστήριξης της QIAGEN ή τον διανομέα της περιοχής σας.

**Better samples  
More to explore**

 **PreAnalytiX**  
A QIAGEN / BD Company

Μάθετε περισσότερα στη διεύθυνση: [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)

HB-3009-002 02/2023

Παραγγελίες [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Τεχνική υποστήριξη [www.support.qiagen.com](http://www.support.qiagen.com) | Ιστότοπος [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ή [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)