

2023年2月

# PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA Kit (ハンドブック)

## 製品説明書



50

バージョン 3 (V3)

IVD

体外診断用医薬品



REF

762174

PreAnalytiX<sup>®</sup> GmbH

Garstligweg 8, 8634 Hombrechtikon, スイス



PreAnalytiX GmbH 用に QIAGEN<sup>®</sup> GmbH が製造

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ドイツ

R2

MAT

1130774JA

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

PreAnalytiX GmbH, 8634 Hombrechtikon, CH.

© 2023 PreAnalytiX GmbH.特に記載のない限り、PreAnalytiX、PreAnalytiX ロゴ、およびその他すべての商標は PreAnalytiX GmbH (スイス、ホンブレヒティコン) の所有物です。

### PAXgene Blood RNA Kit 限定ライセンス契約

本製品を使用することで、本製品の購入者またはユーザーは以下の条項に合意し、本契約を締結したものと見なされます。

1. 本製品は、本製品および本ハンドブックと共に提供されるプロトコールのみに従い、パネルに含まれるコンポーネントのみを用いて使用することができます。PreAnalytiX®は、本製品と共に提供されるプロトコール、本ハンドブック、[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) および [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) に掲載された追加プロトコールに説明されているものを除き、所有する知的財産のもと、本パネルに含まれない一切のコンポーネントを、本パネルに同梱されるコンポーネントと共に使用する、または組み入れるライセンスを一切許諾しません。
2. 明示的に言及されているライセンスを除き、PreAnalytiX は、本キットやその使用が第三者の権利を侵害していないことを保証いたしません。
3. 本キットは1回のみ使用についてライセンスが許諾され、その再利用、再生、再販はできません。
4. PreAnalytiX は明示的に言及されているものを除き、明示・黙示を問わず、他のあらゆるライセンス許諾を具体的に否認します。
5. 本キットの購入者とユーザーは、上記の禁止事項に示した行為を行わず、またかかる行為を容易にする一切の手段を許容しないことに同意します。
6. PreAnalytiX は、本限定ライセンス契約の禁止事項の執行を法廷に対して強要することができ、本限定ライセンス契約、または本キットおよびそのコンポーネントに関する知的財産権行使の一切の行為において、弁護士費用を含む調査と法的措置の経費を回収するものとします。

最新の契約条項については、[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) および [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) をご参照ください。

HB-3009-002 BD-8945 1130774JA © 2023 PreAnalytiX GmbH, all rights reserved.

## PreAnalytiX 販売代理店

PreAnalytiX の製品は、PreAnalytiX に向けて QIAGEN または BD が製造し、販売しています。

# 目次

目次	3
使用目的	6
対象となるユーザー	6
説明と原理	7
はじめに	7
原則と手順	7
サンプル採取と安定化	8
RNA 単離	8
手動 RNA 単離	9
自動 RNA 単離	11
キットに含まれる資材	14
キットの内容	14
キットに含まれるコンポーネント	15
キット以外に必要な資材	16
すべてのプロトコール用	16
手動プロトコール用	17
自動プロトコール用	17
警告と注意	19
安全情報	19
緊急時の連絡先	20
注意事項	20
試薬の保管と取り扱い	23

使用時の安定性 .....	23
試料の採取、保管、および取り扱い .....	24
プロトコール：PAXgene Blood RNA Tubes に採取したヒト全血からトータル RNA を手動単離 .....	25
プロトコール：PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) に採取したヒト全血からトータル RNA を自動単離 .....	34
製品の使用に関する制限事項 .....	43
品質管理 .....	43
性能特性 .....	44
サンプル採取と安定化 .....	44
手動 RNA 単離 .....	49
自動 RNA 単離 .....	57
単離 RNA の安定性 .....	60
重要な注意 .....	61
QIAcube Connect MDx の使用 .....	61
QIAcube Connect MDx の起動 .....	61
QIAcube Connect MDx にプロトコールをインストール .....	63
QIAcube Connect MDx をロード .....	64
スピンカラム (PSC、PRC)、マイクロ遠心チューブ (MCT)、および QIAcube Connect MDx プラスチック製品 .....	68
廃棄 .....	74
参考文献 .....	75
トラブルシューティングガイド .....	76
図記号 .....	78
お問い合わせ先 .....	80

付録 A：RNA 取り扱いの一般的注意事項 .....	81
付録 B: トータル RNA の品質の定量と測定 .....	82
付録 C：PAXgene Blood RNA Tubes（BRT）の取り扱い .....	84
発注情報 .....	86
文書改訂履歴 .....	88

# 使用目的

体外診断用です。

PAXgene Blood RNA System は、採血管（PAXgene Blood RNA Tube、BRT）と核酸精製キット（PAXgene Blood RNA Kit）で構成されています。これは、血液の採取、保存、および輸送と密閉管内での細胞内 RNA の安定化、ならびにその後の、分子診断テストで使用する RT-PCR 用の全血からの宿主 RNA の分離と精製を目的としています。

PAXgene Blood RNA System の性能特性は、FOS および IL1B 遺伝子転写産物でのみ確立されています。ユーザーは責任を持って、他のターゲット転写産物に対して適切な PAXgene Blood RNA System の性能特性を確立しなければなりません。

## 使用の適応

PAXgene Blood RNA Kit は、PAXgene Blood RNA Tube（BRT）で採取した全血からの細胞内 RNA 精製に使用します。キットを PAXgene Blood RNA Tube（BRT）と併用すると、このシステムにより、分子診断テストで使用する RT-PCR 用に、全血から精製した細胞内 RNA が得られます。

# 対象となるユーザー

この製品は、体外診断手順の訓練を受けた技師や医師などの専門家ユーザーが使用するためのものです。

本キットは専門家向けです。

# 説明と原理

## はじめに

全血採取は、細胞の RNA 研究に使用する多くの分子アッセイの第一段階です。しかし、このような実験においては、*in vitro* では細胞の RNA プロファイルが不安定なことが大きな問題となります。PreAnalytiX の研究によると、全血中の個々の mRNA 種のコピー数は、常温で保存または輸送中に 1000 倍以上変化する可能性があります (Rainen et al., 2002)。これは、急速な RNA 分解と、採血後の特定の遺伝子の誘発発現の両方によって引き起こされます。RNA 発現プロファイルのこのような変化は、遺伝子発現の信頼できる研究を不可能なものにします。したがって、瀉血中および瀉血後の RNA 発現プロファイルを保存する方法は、ヒト全血における遺伝子発現の正確な分析に必要不可欠です。

## 原則と手順

PreAnalytiX は、細胞内 RNA を精製する迅速かつ効率的なプロトコールと共に、ヒト全血検体の採取、安定化、保存、輸送を可能にするシステムを開発しました。このシステムでは、採血と RNA 安定化に PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) を使用した後、PAXgene Blood RNA Kit を使用して手動または自動 RNA 単離を行う必要があります。手動プロトコールと自動プロトコールはどちらも、RNA の品質と収量に関して実質的に同等の性能を提供します。このハンドブックには、手動プロトコール (49 ページ〜) と自動プロトコール (57 ページ〜) の性能データが含まれています。

PAXgene Blood RNA System は、ISO 20186-1:2019 「分子体外診断検査—静脈全血の試験前処理に関する規格—第 1 部：単離された細胞 RNA」に従って、血液検体の採取から細胞 RNA の単離までの分析前ワークフロー手順の標準化を可能にします。

## サンプル採取と安定化

PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) には、特許取得済みの RNA 安定化試薬が含まれています。この添加物は、RNA 分子を RNase による分解から保護し、遺伝子発現の *ex vivo* での変化を最小限に抑えます。PAXgene Blood RNA System の性能特性は、FOS および IL1B 遺伝子転写産物でのみ確立されています (44 ページ～)。

## RNA 単離

PAXgene Blood RNA Kit は、PAXgene Blood RNA Tube (BRT) に採取したヒト全血 2.5mL からのトータル RNA 単離に使用します。手順は簡単で、手動または自動化手順を使用して実行できます (10 および 12 ページの図 1 および図 3 参照)。どちらのプロトコールでも、単離は、PAXgene Blood RNA Tube (BRT) で核酸をペレット化する遠心分離ステップから始まります。ペレットを洗浄して再懸濁した後、手動または自動で RNA を単離します。原則として、両プロトコールは、同じキットコンポーネントを使用して同じプロトコールステップに従います。



## 手動 RNA 単離

詳細には、再懸濁したペレットをプロテイナーゼ K (PK) と共に最適化したバッファーでインキュベートし、タンパク質を消化させます。PAXgene Shredder スピンカラム (PSC) を通して追加遠心分離を実行し、細胞溶解物をホモジナイズし、残存細胞破片を除去し、フロースルー画分の上清を新しいマイクロ遠心チューブに移します(MCT)。エタノールを添加して結合条件を調整し、溶解物を PAXgene RNA スピンカラム (PRC) に適用します。短時間の遠心分離中、RNA は PAXgene シリカメンブレンに選択的に結合し、汚染物質は通過します。残りの汚染物質は、いくつかの効率的な洗浄ステップで除去します。1 回目と 2 回目の洗浄ステップの間に、メンブレンを DNase I (RNFD) で処理して、微量の結合 DNA を除去します。洗浄ステップの後、RNA を溶出バッファー (BR5) に溶出し、熱変性させます。PAXgene Blood RNA System を使用した手動 RNA 単離の性能特性は、49 ページを参照してください。

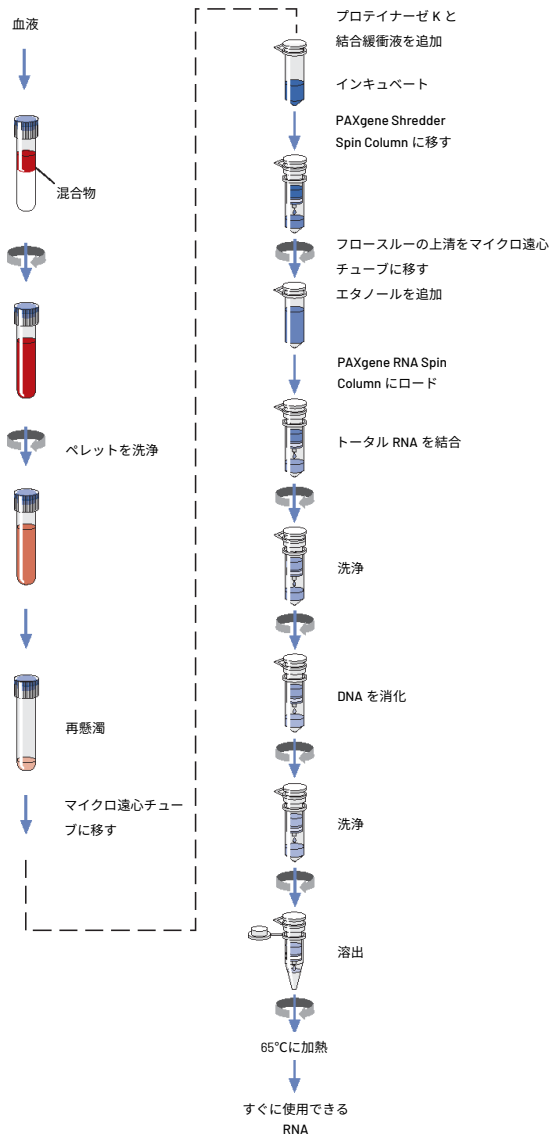


図 1：手動 PAXgene Blood RNA 手順。

## 自動 RNA 単離

血液 RNA の単離は QIAGEN QIAcube Connect MDx で自動化されます。この革新的な機器は、高度なテクノロジーを使用して QIAGEN スピнкаラムを処理し、自動化した低スループットサンプル調製をラボのワークフローにシームレスに統合します。QIAcube Connect MDx を使用するサンプル調製は、手動手順と同じステップ（溶解、結合、洗浄、溶出）をたどり、同じ PAXgene Blood RNA Kit を使用して実行できます。



図 2 : QIAcube Connect MDx



QIAGEN QIAcube Connect MDx は、一部の国ではご利用いただけません。詳細については、QIAGEN テクニカルサービスにお問い合わせください。

自動 RNA 単離プロトコールは、「PAXgene Blood RNA Part A」（PAXgene Blood RNA Tube 内の血液から溶出まで）と「PAXgene Blood RNA Part B」（溶出からすぐに使用できる RNA まで）の 2 つのパート（すなわちプロトコール）で構成され、この 2 つのパートの間に短時間の手動介入が入ります（図 3 参照）。

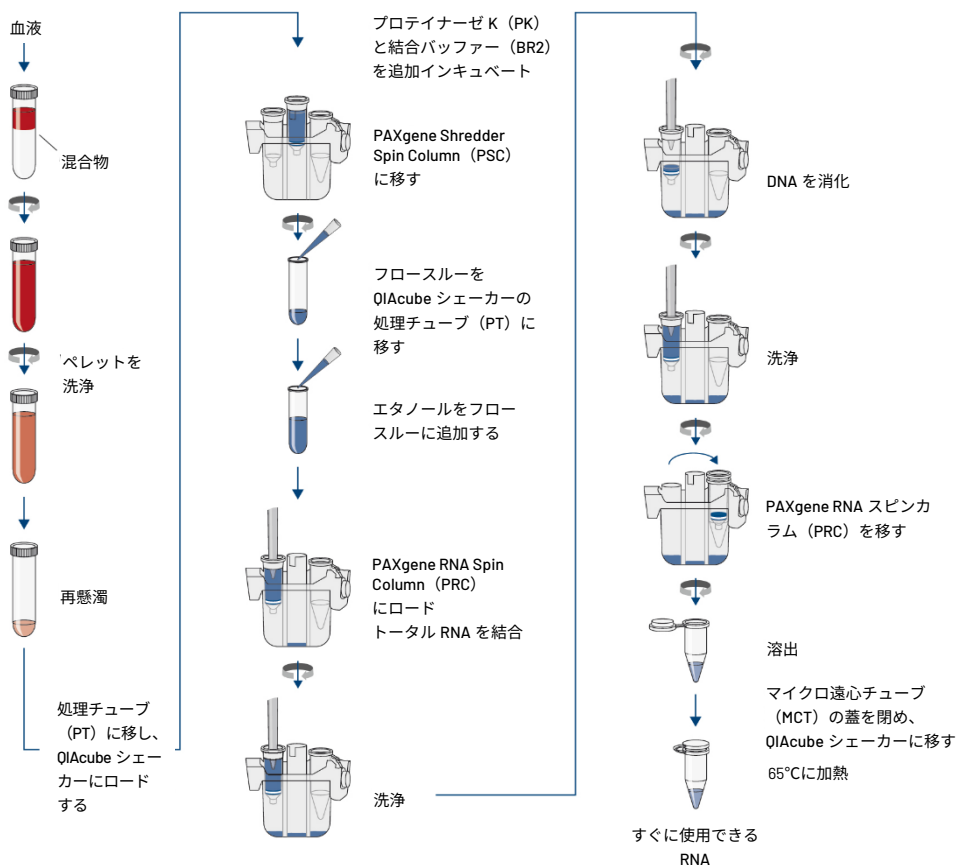


図 3：自動化 PAXgene Blood RNA 手順

遠心分離、洗浄、再懸濁した核酸ペレット（8 ページの「RNA 単離」を参照）を、PAXgene Blood RNA Tube (BRT) から処理チューブ (PT) に移し、QIAcube Connect MDx のワークテーブル上のサーモシェーカーユニットに入れます。オペレーターがメニューから「PAXgene Blood RNA Part A」プロトコルを選択して開始します。QIAcube Connect MDx は、溶出バッファー (BR5) に RNA を溶出するまでのプロトコルステップを実行します。オペレーターが、精製した RNA を含むマイクロ遠心チューブ (MCT) を QIAcube Connect MDx のサーモシェーカーユニットに移します。オペレーターがメニューから「PAXgene Blood RNA Part B」プロトコルを選択して開始し、QIAcube Connect MDx が熱変性を実行します。QIAcube Connect MDx で PAXgene Blood RNA System を使用した自動 RNA 単離の性能特性は、57 ページを参照してください。

# キットに含まれる資材

## キットの内容

PAXgene Blood RNA Kit カタログ番号 採取デバイスの数			(50) 762174 50
コンポーネント名	説明	図記号	数量
BR1	Resuspension Buffer (再懸濁バッファー)	RES   BUF	20 mL
BR2	Binding Buffer (結合緩衝液) *	BIND   BUF	18 mL
BR3	Wash Buffer 1 (洗浄バッファー1) *	WASH   BUF   1	45 mL
BR4	Wash Buffer 2 (洗浄バッファー2) (濃縮) †	WASH   BUF   2   CONC	11 mL
BR5	Elution Buffer (溶出バッファー)	ELU   BUF	6 mL
RNFW	RNase-Free Water (RNase フリー水) (ボトル)	PEL   WASH	2 × 125 mL
PK	Proteinase K (プロテイナーゼK) (緑色の蓋)	PROTK	2 × 1.4 mL
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (PAXgene RNA スピンカラム) (赤色) ‡	PAXgene   RNA   COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (処理チューブ) (2 mL) §	PROC   TUBE	6 × 50
Hemogard™	Secondary BD Hemogard Closures (二次 BD Hemogard クロージャー)	SEC   CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (マイクロ遠心チューブ) (1.5 mL) §	MIC   TUBE	3 × 50、1 × 10
RNFD	Dnase I, RNase-free (RNase フリー) (凍結乾燥)	DNA   REM	1500 Kunitz ユニット¶
RDD	DNA Digestion Buffer (DNA 消化バッファー) (白色の蓋)	DNA   DIG   BUF	2 × 2 mL
DRB	DNase Resuspension Buffer (DNase 再懸濁バッファー) (チューブ、紫色の蓋)	DNase   RES   BUF	2 mL
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (紫色) ‡	PAXgene   SHRED   COL	5 × 10
ハンドブック	PAXgene Blood RNA Kit ハンドブック (バージョン3)		1

\* 漂白剤を含む消毒試薬と共に使用することはできません。グアニジン塩を含みます。安全情報については、19 ページを参照してください。

† 洗浄バッファー2 (BR4) は、濃縮物として供給されます。初めて使用するときは事前に、ボトルの表示に従って、4 倍量のエタノール (96~100% v/v、純度等級 p.a.) を加えて作業溶液を調製します。

‡ カラムはブリスター包装されています。単回使用製品です。廃棄に関する指示は安全情報を参照してください。

§ チューブはビニール袋に入れて供給されます。単回使用製品です。廃棄に関する指示は安全情報を参照してください。

¶ Kunitz ユニットは、DNase I 測定に一般的に使用される単位であり、基質として高度に重合した DNA を使用して、25°C、pH 5.0 で、1 ミリリットル当たり毎分 0.001 の  $A_{260}$  増加を引き起こす DNase I の量と定義されます (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. 33, 349 および 363)。

## キットに含まれるコンポーネント

コンポーネント名	説明	有効成分	濃度
BR1	再懸濁バッファー	なし	-
BR2	結合緩衝液	グアニジンチオシアン酸塩	30% w/w 以上、50% w/w 未満
BR3	洗浄バッファー1	グアニジンチオシアン酸塩 エタノール	10% w/w 以上、20% w/w 未満 3% w/w 以上、10% w/w 未満
BR4	洗浄バッファー2（濃縮）	なし	-
BR5	溶出バッファー	なし	-
RNFW	RNase フリー水（ボトル）	なし	-
PK	プロテイナーゼK（緑色の蓋）	プロテイナーゼK	1% w/w 以上、3% w/w 未満
RNFD	Dnase I、RNase フリー （凍結乾燥）	DNase	90% w/w 以上、100% w/w 以下
RDD	DNA 消化バッファー（白色の蓋）	なし	-
DRB	DNase 再懸濁バッファー（チューブ、紫色の蓋）	なし	-

# キット以外に必要な資材

薬品を取り扱う際には、必ず適切な白衣を着用し、使い捨ての手袋と保護メガネを装着してください。詳細については、製品の供給元が提供する適切な安全データシート（SDS）をご参照ください。

## すべてのプロトコール用

- PAXgene Blood RNA Tubes（BRT、PreAnalytiX、カタログ番号 762165）
- エタノール（96～100% v/v、純度等級 p.a.）
- ピペット\*（10 L～4 mL）
- 無菌、エアロゾルバリア、RNase フリーのピペットチップ †
- メスシリンダー ‡
- 3000～5000 x g を達成可能な遠心分離機\*。PAXgene Blood RNA Tubes（BRT）保持用スイングバケットローターを搭載。
- ボルテックスミキサー\*
- 破碎氷片
- ラベル付け用油性ペン

\* デバイスおよび機器が製造者の推奨とおりに定期的に点検され、メンテナンスされ、校正されていることをご確認ください。

† RNA の取り扱いに関するガイドラインをよくお読みになり、理解してください（付録 A、75 ページ）。

‡ バッファ-BR4 濃縮物へのエタノール添加用



## 手動プロトコール用

- 少なくとも 1000~8000 x g の範囲が可能な可変速マイクロ遠心機\*。ただし、これ以下およびこれ以上の g 力が適用可能であり（詳細についてはプロトコール手順参照）、2 mL マイクロ遠心チューブ用のローターが搭載されています。
- 55°C および 65°C でインキュベートし、400 rpm 以上、1400 rpm を超えない範囲で振とう可能なシェーカーインキュベーター\*（例：Eppendorf® Thermomixer Compact または同等品）

## 自動プロトコール用

- ハサミ
- QIAcube Connect MDx\*（QIAGEN、カタログ番号 9003070）

### QIAcube Connect MDx の消耗品：

- Filter-Tips, 1000 µl (1024) QIAGEN、カタログ番号 990352) †
- Reagent Bottles, 30 mL (6) (QIAGEN、カタログ番号 990393) †
- Rotor Adapters (10 × 24) (QIAGEN、カタログ番号 990394) †

### QIAcube Connect MDx 付属品：

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN、カタログ番号 990392) †

\* デバイスおよび機器が製造者の推奨とおりに定期的に点検され、メンテナンスされ、校正されていることをご確認ください。

† Starter Pack、QIAcube (QIAGEN、カタログ番号 990395) にも含まれています。

### QIAcube Connect MDx サービスバンドル：

- QIAcube Connect MDx System FUL-2 (QIAGEN、カタログ番号 9003071)
- QIAcube Connect MDx System FUL-3 (QIAGEN、カタログ番号 9003072)
- QIAcube Connect MDx System PRV-1 (QIAGEN、カタログ番号 9003073)
- QIAcube Connect MDx Device PRV-1 (QIAGEN、カタログ番号 9003074)
- QIAcube Connect MDx System PRM-1 (QIAGEN、カタログ番号 9003075)

## 警告と注意

EU のユーザーは、デバイスに関連して発生した重大なインシデントを製造元、およびユーザーや患者が所在する加盟国の規制当局に報告する必要があります。

EU 以外のユーザーは、デバイスに関連して発生した重大なインシデントを、製造元やその権限を有する代表者、ならびにユーザーや患者が所在する地域の規制当局に報告する際には、地域の規制に留意しなければならない可能性があることにご注意ください。

## 安全情報

薬品および生物学的有害物質を取り扱う際には、適切な白衣、使い捨て手袋、保護メガネを必ず着用してください。詳細は、適切な安全データシート（Safety Data Sheets, SDS）を参照してください。SDS は、[www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) からオンラインで、便利でコンパクトな PDF 形式で入手できます。このサイトで、QIAGEN キットおよびキットコンポーネントの SDS を検索、表示、印刷することができます。

- すべての化学物質と生物学的物質は、潜在的に危険性を持っています。血液検体やサンプルは潜在的に感染性があり、生物学的有害物質として扱われなければなりません。
- 生物学的有害廃棄物およびキットの廃棄物は、地域の安全手順に従って廃棄してください。

## 緊急時の連絡先

CHEMTREC

米国およびカナダ以外の国 +1 703-527-3887

## 注意事項

血液を取り扱う際には、血液媒介病原体（HIV、B型肝炎ウイルス、その他血液媒介性ウイルスなど）への暴露のリスクを回避するための一般予防策を実施してください。手袋、目およびその他の保護具を使用し、技術的対策を実施して血液への曝露を防止してください。詳細は、適切な安全データシート（Safety Data Sheets, SDS）を参照してください。これらは、このキットの SDS を検索、表示、および印刷可能な [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) から、便利でコンパクトな PDF 形式で入手することが可能です。

### 注意



サンプル調製廃棄物に直接漂白剤や酸性の溶液を混ぜないでください。

結合緩衝液（BR2）と洗浄バッファー1（BR3）にはチオシアン酸グアニジンが含まれており、漂白剤と混ぜると高反応性化合物が生じる可能性があります。結合緩衝液（BR2）または洗浄バッファー1（BR3）がこぼれた場合は、適切な実験室用洗浄剤と水で洗浄してください。こぼれた液に感染病原体が含まれる可能性がある場合は、まず汚染された部分を実験室用洗浄剤と水で洗浄し、その後、次亜塩素酸ナトリウムの 1%（v/v）水溶液（漂白剤）で洗浄してください。

PAXgene Blood RNA Tube (BRT) の RNA 安定化溶液と血液混合物は、9 容量の RNA 安定化溶液と血液混合物あたり 1 容量の市販の漂白剤溶液（5%次亜塩素酸ナトリウム）を使用して消毒できます。

RNA 単離手順の遠心分離ステップ由来上清などのサンプル調製廃棄物は、潜在的に感染性があると見なされます。生物学的物質を廃棄するには、生物学的有害物質用の容器を使用してください。地域の規制と施設が定める手順に従って廃棄しなければなりません。

PAXgene Blood RNA Kit の一部のコンポーネントは単回使用製品です。各コンポーネントに関する情報は、キットの内容（14 ページ）を参照してください。

次のハザードおよび警告に関する表示は、PAXgene Blood RNA Kit のコンポーネントに適用されます。PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) の安全情報については、*PAXgene Blood RNA Tube* ハンドブックをご参照ください。

#### Buffer BR2



含有物質：グアニジンチオシアン酸塩危険！飲み込むと有害。皮膚に接触したり、吸入すると有害であるお恐れがある。重篤な目の損傷を引き起こす可能性がある。長期間にわたり持続的に水性生物に有害性をもたらす恐れがある。酸に接触すると有毒性の高いガスが発生する。環境中に放出しないでください。防護用手袋、防護服、目および顔面の保護具を使用すること。目に入った場合：数分間かけて入念に水で洗い落とす。コンタクトレンズを装着しており、それを容易に外せるときは外して洗眼を続ける。曝露したとき、または曝露

が懸念されるとき：直ちに中毒センター、または医師に連絡する。内容物、容器は承認された廃棄物処理装置または廃棄物処理工場へ廃棄してください。

### Buffer BR3



含有物質：エタノール、グアニジンチオシアン酸塩危険！可燃性のある液体や蒸気が発生する。重篤な目の損傷を引き起こす可能性がある。酸に接触すると有毒性の高いガスが発生する。熱、火花、裸火、高温の表面から遠ざける。禁煙。防護用手袋、防護服、目および顔面の保護具を使用すること。目に入った場合：数分間かけて入念に水で洗い落とす。コンタクトレンズを装着しており、それを容易に外せるときは外して洗眼を続ける。直ちに中毒センター、または医師に連絡する。

### DNase I



含有物質：DNase 危険！皮膚のアレルギー反応の原因となる可能性がある。吸入すると、アレルギーやぜんそくの症状や呼吸困難を引き起こす可能性がある。粉塵を吸い込まないこと。防護用手袋、防護服、目および顔面の保護具を使用すること。呼吸器用保護具を装着する。曝露したとき、または曝露が懸念されるとき：中毒センター、または医師に連絡する。患者を空気の新鮮な場所に移し、呼吸しやすい姿勢で休息させてください。汚染された衣服を再度使用する場合には洗濯してください。

## 試薬の保管と取り扱い

PAXgene RNA スピнкаラム (PRC)、PAXgene Shredder スピнкаラム (PSC)、プロテイナーゼ K (PK)、およびバッファー (BR1、BR2、BR3、BR4、BR5) は、キットのラベルに表示している温度の乾燥した環境で保存する必要があります。

DNase I (RNFD)、DNA 消化バッファー (RDD)、DNase 再懸濁バッファー (DRB) を含む RNase フリーDNase セットは、常温で出荷します。RNase フリーDNase セットの全コンポーネントは、受領し次第、ラベルに記載されている温度環境で保存してください。適切に保存すれば、キットは箱に記載されている有効期限まで安定した状態を保ちます。

すべてのコンポーネントの箱とラベルに印刷された有効期限と保管条件に注意する必要があります。期限切れの、または不適切な方法で保管したコンポーネントは使用しないでください。

## 使用時の安定性

初めて使用した試薬は、元のボトルに入れてキットの箱ラベルに記載されている温度で保存すれば、記載の有効期限まで安定した状態を保ちます。

QIAcube Connect MDx の試薬ボトルに充填した試薬は、室温 (15~25°C) で3ヶ月間安定した状態で保存できます。

再構成した DNase I (RNFD) は、元のガラスバイアル (保存液) に入れて 2~8°C で6週間保存できます。

保存液は、1回分の分量に分けて 1.5mL マイクロ遠心チューブ（MCT、キットに付属）に入れると、-20°Cで9ヶ月間安定した状態を保ちます。解凍後は2~8°Cで6週間保存できます。

## 試料の採取、保管、および取り扱い

PAXgene Blood RNA Kit は、PAXgene Blood RNA Tube S で採取した血液に使用します。PAXgene Blood RNA Tube ハンドブックの指示に従って、PAXgene Blood RNA Tubes（BRT）に血液を採取する必要があります。必要に応じて、PAXgene Blood RNA Tubes（BRT）の取り扱いに関する推奨事項について、付録 C（84 ページ）をご参照ください。すべてのサンプルは、潜在的に有害なものとして扱う必要があります。PAXgene Blood RNA System の性能特性は、FOS および IL1B 遺伝子転写産物でのみ確立されています（45~48 ページ）。



# プロトコール：PAXgene Blood RNA Tubes に採取したヒト全血からトータル RNA を手動単離

## 開始する前の重要な留意点

- キットボックスがインタクトで、損傷がないこと、バッファーが漏れていないことを確認します。破損したキットは使用しないでください。
- ピペットを使用するときは、ピペットが正しい容量に設定されていること、液体が注意深く完全に吸引され、分注されていることを確認してください。
- サンプルを間違ったチューブやスピncラムに移さないようにするため、油性ペンを使用してすべてのチューブとスピncラムに適切なラベルを付けます。各チューブ（PT、MCT）の蓋と本体にラベルを付けます。スピncラムの場合は、処理チューブ（PT）の本体にラベルを付けます。液体をチューブまたはスピncラムに移してから、閉じます。
- 手順中にサンプルやバッファーがこぼれると、RNA の収量と純度が低下する可能性があります。
- 特に明記されていない限り、遠心分離ステップを含むこのプロトコールのすべてのステップは、室温（15～25℃）で実行する必要があります。

核酸増幅技術は感度が高いため、サンプルを取り扱う際には、クロスコンタミネーションを避けるために以下の予防措置が必要となります。

- カラムの縁を湿らせないように、ピペットでサンプルをスピncラム（PSC、PRC）に慎重に移します。
- 液体を移すたびにピペットチップを交換します。エアロゾルバリアピペットチップを使用します。

- ピペットチップでスピнкаラム（PSC、PRC）メンブレンに触れないでください。
- マイクロ遠心チューブ（MCT）をボルテックスまたは加熱した後、短時間遠心分離して蓋の内側から滴を取り除きます。
- 手順全体にわたり手袋を着用します。手袋とサンプルが接触した場合は、すぐに手袋を交換します。
- スピнкаラム（PSC、PRC）を閉じてから、マイクロ遠心機にセットします。手順の説明に従って遠心分離します。
- 一度に1つのスピнкаラム（PSC、PRC）のみを開き、エアロゾルが発生しないように注意します。
- 複数のサンプルを効率的に並行処理するには、処理チューブ（PT）をラックに充填し、遠心分離後に、そこにスピнкаラム（PSC、PRC）を移します。フロースルーを含む使用済みの処理チューブ（PT）を廃棄し、スピнкаラム（PSC、PRC）を新しい処理チューブ（PT）にセットしてマイクロ遠心機に戻します。

## 開始する前に

- *PAXgene Blood RNA Tube* ハンドブックの指示に従って、*PAXgene Blood RNA Tubes*（BRT）に血液を採取する必要があります。必要に応じて、*PAXgene Blood RNA Tubes*（BRT）の取り扱いに関する推奨事項について、付録 C（84 ページ）をご参照ください。
- 採血後、*PAXgene Blood RNA Tubes*（BRT）を室温で少なくとも 2 時間インキュベートして、確実に血球を完全に溶解させ、RNA を沈殿させます。*PAXgene Blood RNA Tube*（BRT）を夜間にわたりインキュベートすると、収量が増える可能性があります。最初に血液を室温で 2 時間インキュベート

せずに 2~8°C、-20°Cまたは-70°Cで保存した場合は、まず PAXgene Blood RNA Tube (BRT) を室温に戻して、次にその温度で 2 時間インキュベートしてから、手順を開始します。

- 19 ページの安全情報をお読みください。
- RNA の取り扱いに関するガイドラインをお読みください (81 ページの付録 A)。
- ピペットやシェーカーインキュベーターなどの機器が、製造者の推奨とおりに定期的に点検され、校正されていることを確認します。
- シェーカーインキュベーターは手順 5 と 20 で必要です。シェーカーインキュベーターの温度を 55°C に設定します。
- 結合緩衝液 (BR2) は、保存時に沈殿物を形成することがあります。必要に応じて、37°C に温めて溶解します。
- 洗浄バッファー 2 (BR4) は、濃縮物として供給されます。初めて使用するときは事前に、ボトルの表示に従って、4 倍量のエタノール (96~100% v/v、純度等級 p.a.) を加えて作業溶液を調製します。
- RNase フリー DNase セットを初めて使用する場合は、DNase I 保存液を調製します。固体 DNase I (RNFD; 1500 Kunitz ユニット) \*を、セットに付属の DNase 再懸濁バッファー (DRB) 550  $\mu$ L に溶解します。バイアルを開けるときに DNase I (RNFD) が消失しないように注意します。再構成した DNase I (RNFD) をボルテックスしないでください。DNase I は物理的変性に特に敏感です。混和は、バイアルの反転でのみ、やさしく行ってください。

\* Kunitz ユニットは、DNase I 測定に一般的に使用される単位であり、基質として高度に重合した DNA を使用して、25°C、pH 5.0 で、1 ミリリットル当たり毎分 0.001 の  $A_{260}$  増加を引き起こす DNase I の量と定義されます (Kunitz, M. (1950) J.Gen.Physiol. **33**, 349 および 363)。

- 再構成した DNase I (RNFD) は、元のガラスバイアル（保存液）に入れて 2～8℃で、またはガラスバイアルから保存液を取り除き 1 回分の分量に分けると -20℃で保存できます（キットに付属の 1.5 mL マイクロ遠心チューブ（MCT）を使用、5 回分を十分に得られます）。解凍した 1 回分の保存液は 2～8℃で保存できます。解凍後は再度冷凍しないでください。
- DNase I (RNFD) を再構成し、分取するときは、RNA の取り扱いに関するガイドライン（81 ページの付録 A）に必ず従います。

## 操作手順

1. スイングバケットローターを使用して、PAXgene Blood RNA Tube（BRT）を 3000～5000 × g で 10 分間遠心分離します。



血球を完全に溶解させて RNA を沈殿させるには、血液サンプルを PAXgene Blood RNA Tube（BRT）で室温（15～25℃）にて確実に最低 2 時間インキュベートします。



ローターには、丸底チューブ用のチューブアダプターが含まれている必要があります。別のタイプのチューブアダプターを使用すると、遠心分離中にチューブが破損する可能性があります。

2. デカンテーションまたはピペット操作により上清を除去します。ペレットに RNase フリー水（RNFW）4 mL を加え、新しい二次 BD Hemogard クロージャー（キットに付属）を使用してチューブを閉じます。

上清をデカンテーションする場合は、ペレットを乱さないように注意し、きれいなペーパータオルでチューブの縁を乾かします。

3. ペレットの溶解が目視できるまでボルテックスし、スイングバケットローターを使用して 3000~5000 x g で 10 分間遠心分離します。上清全体を取り除き、廃棄します。

ボルテックス後、遠心分離前に上清に残っている小さな破片は、手順に影響を与えません。



上清の除去が不完全な場合、溶解が阻害され、溶解物が希釈されるため、RNA が PAXgene メンブレンに結合する条件に影響を与えます。

4. 再懸濁バッファー (BR1) 350  $\mu$ L を加え、ペレットの溶解が目視できるまでボルテックスします。
5. ピペットでサンプルを 1.5 mL マイクロ遠心チューブ (MCT) に移します。結合バッファー (BR2) 300  $\mu$ L とプロテイナーゼ K (PK) 40  $\mu$ L を加えます。5 秒間ボルテックスして混合し、シェーカーインキュベーターを使用して 400~1400 rpm、55°C で 10 分間インキュベートします。インキュベーション後、シェーカーインキュベーターの温度を 65°C に設定します (ステップ 20)。



結合緩衝液 (BR2) とプロテイナーゼ K (PK) を、サンプルに加える前に混合しないでください。

6. 2 mL の処理チューブ (PT) にセットした PSC (紫色) に溶解物を直接ピペットで移し、最高速度 (ただし、20,000 x g を超えない) で 3 分間遠心分離します。



溶解物をスピнкаラム (PSC) に注意深くピペットで移し、溶解物がスピнкаラム (PSC) に完全に移ったことを目視確認します。

カラム (PSC) とチューブ (PT) の損傷を防ぐために、20,000 x g を超えないでください。



一部のサンプルは、遠心分離することなく PSC を通過することがあります。これはサンプルの粘度が低いためであり、製品の故障を示すものと見なしてはなりません。

7. フロースルー画分の上清全体を、処理チューブ (PT) 内のペレットを乱さないように、新しい 1.5 mL マイクロ遠心チューブ (MCT) に慎重に移します。
8. 350  $\mu$ L のエタノール (96~100% v/v、純度 p.a.) を加えます。ボルテックスして混合し、短時間遠心分離して (500~1000  $\times$ g で 1~2 秒)、チューブの蓋の内側から滴を取り除きます。



遠心分離時間は 1~2 秒を超えてはなりません。超えると、核酸がペレット化し、トータル RNA の収量が減少する可能性があります。

9. 2 mL の処理チューブ (PT) にセットした PRC (赤色) にサンプル 700  $\mu$ L をピペットで移し、8000~20,000  $\times$ g で 1 分間遠心分離します。スピнкаラム (PRC) を新しい 2 mL 処理チューブ (PT) にセットし、フロースルーを含む古い処理チューブ (PT) を廃棄します。
10. ピペットで残りのサンプルを PRC に移し、8000~20,000  $\times$ g で 1 分間遠心分離します。スピнкаラム (PRC) を新しい 2 mL 処理チューブ (PT) にセットし、フロースルーを含む古い処理チューブ (PT) を廃棄します。



ピペットでサンプルを注意深くスピнкаラム (PRC) に移し、サンプルが完全にスピнкаラム (PRC) に移ったことを目視確認します。

11. ピペットで洗浄バッファー 1 (BR3) 350  $\mu$ L を PRC に移します。8000~20,000  $\times$ g で 1 分間遠心分離します。スピнкаラム (PRC) を新しい 2 mL 処理チューブ (PT) にセットし、フロースルーを含む古い処理チューブ (PT) を廃棄します。

12. 1.5 mL マイクロ遠心チューブ (MCT) 内の DNA 消化バッファー (RDD) 70  $\mu$ L に DNase I (RNFD) 保存液 10  $\mu$ L を加えます。チューブをさっと振って混合し、短時間遠心分離し、残留液をチューブ側面から回収します。

たとえば 10 サンプルを処理する場合は、DNase I (RNFD) 保存液 100  $\mu$ L を DNA 消化バッファー (RDD) 700  $\mu$ L に加えます。キットに付属の 1.5 mL マイクロ遠心チューブ (MCT) を使用します。



DNase I は物理的変性に特に敏感です。混和は、チューブをさっと振るだけで、やさしく行ってください。ボルテックスしないでください。

13. DNase I (RNFD) インキュベーションミックス (80  $\mu$ L) を PRC メンブレンに直接ピペットで移し、ベンチトップ (20~30°C) に 15 分間置きます。



DNase I (RNFD) インキュベーションミックスがメンブレンに直接セットされていることを確認します。混合物の一部が壁やスピнкаラム (PRC) の O リングに付いて残っていると、DNase 消化は不完全になります。

14. ピペットで洗浄バッファー-1 (BR3) 350  $\mu$ L を PRC に移し、8000~20,000  $\times g$  で 1 分間遠心分離します。スピнкаラム (PRC) を新しい 2 mL 処理チューブ (PT) にセットし、フロースルーを含む古い処理チューブ (PT) を廃棄します。

15. ピペットで洗浄バッファー-2 (BR4) 500  $\mu$ L を PRC に移し、8000~20,000  $\times g$  で 1 分間遠心分離します。スピнкаラム (PRC) を新しい 2 mL 処理チューブ (PT) にセットし、フロースルーを含む古い処理チューブ (PT) を廃棄します。



洗浄バッファー-2 (BR4) は、濃縮物として供給されます。使用する前に、エタノールが洗浄バッファー-2 (BR4) に追加されていることをご確認ください (26 ページの「開始する前に」参照)。

16. さらに洗浄バッファー2 (BR4) 500  $\mu$ L を PRC に追加します。8000~20,000  $\times g$  で3分間遠心分離します。
17. フロースルーを含む処理チューブ (PT) を廃棄し、PRC を新しい2 mL 処理チューブ (PT) にセットします。8000~20,000  $\times g$  で1分間遠心分離します。
18. フロースルーを含む処理チューブ (PT) を廃棄します。PRC を1.5 mL マイクロ遠心チューブ (MCT) にセットし、ピペットで溶出バッファー (BR5) 40  $\mu$ L を PRC メンブレンに直接移します。8000~20,000  $\times g$  で1分間遠心分離し、RNA を溶出します。

最大の溶出効率を達成するには、メンブレン全体を溶出バッファー (BR5) で湿らせることが重要です。

19. 溶出バッファー (BR5) 40  $\mu$ L と同じマイクロ遠心チューブ (MCT) を使用して、記載通りに溶出ステップ (ステップ 18) を繰り返します。
20. 溶出液をシェーカーインキュベーター (ステップ 5 から) で 65°C、5 分間、振とうせずにインキュベートします。インキュベーション後、すぐに氷上で冷却します。



このように 65°C でインキュベートすると、RNA が変性し、ダウンストリームアプリケーションに使用できます。ダウンストリームアプリケーションに熱変性ステップが含まれている場合でも、このステップを省略しないでください。ダウンストリームアプリケーションで最大の効率を達成するには、この段階で RNA を十分に変性させることが必要不可欠です。

インキュベーション時間または温度を超えないでください。




21. RNA サンプルをすぐに使用しない場合は、 $-20^{\circ}\text{C}$ または $-70^{\circ}\text{C}$ で保存します。

凍結融解を繰り返しても RNA は変性したままなので、 $65^{\circ}\text{C}$ でインキュベーションを繰り返す必要はありません。診断アッセイで RNA サンプルを使用する場合は、製造者の指示に従ってください。

260 nm の吸光度で RNA を正確に定量するには、サンプルを 10 mM Tris-HCl、pH 7.5 で希釈することをお勧めします。\*サンプルを RNase フリー水で希釈すると、値が不正確に低くなる可能性があります。

測定するサンプルと同じ比率の溶出バッファー (BR5) と Tris-HCl バッファーで構成されるブランクを使用して、分光光度計をゼロにします。溶出バッファー (BR5) は 220 nm で高い吸光度を示し、分光光度計を適切にゼロ調整していないと、バックグラウンド吸光度レベルが高くなる可能性があります。

 Tris HCl バッファーでの定量には、 $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g}/\text{mL}$  の関係を使用します。82 ページの付録 B 参照。

22. バッファーおよび RNase フリー水を含むボトル、酵素および酵素バッファーを含むバイアルおよびチューブ、本プロトコールに使用するキットのプラスチック製品が入った袋をすべて閉じます。キットの構成品の残りは、次回使用するまで「試薬の保管と取り扱い」(23 ページ) および「使用時の安定性」(23 ページ) に記載されているように保管します。

\* 薬品を取り扱う際には、必ず適切な白衣を着用し、使い捨ての手袋と保護メガネを装着してください。詳細については、製品の供給元が提供する適切な安全データシート (SDS) をご参照ください。

# プロトコール：PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) に採取したヒト全血からトータル RNA を自動単離

## 開始する前の重要な留意点

- キットボックスがインタクトで、損傷がないこと、バッファーが漏れていないことを確認します。破損したキットは使用しないでください。
- ピペットを使用するときは、ピペットが正しい容量に設定されていること、液体が注意深く完全に吸引され、分注されていることを確認してください。
- サンプルを間違ったチューブやプラスチック消耗品に移さないよう、すべての処理チューブ (PT)、マイクロ遠心チューブ (MCT)、ローターアダプターに、油性ペンを使用して適切なラベルを付けます。各マイクロ遠心チューブ (MCT) の蓋と本体、各処理チューブ (PT) の本体、各ローターアダプターの外壁にラベルを付けます。
- 手順中にサンプルやバッファーがこぼれると、RNA の収量と純度が低下する可能性があります。
- 特に明記されていない限り、遠心分離ステップを含むこのプロトコールのすべてのステップは、室温 (15~25°C) で実行する必要があります。

核酸増幅技術は感度が高いため、サンプルを取り扱う際には、クロスコンタミネーションを避けるために以下の予防措置が必要となります。

- チューブの縁を湿らせないように、ピペットでサンプルを慎重に処理チューブ (PT) の底部に移します。

- 液体を移すたびにピペットチップを交換します。エアロゾルバリアピペットチップを使用します。
- ピペットチップでスピнкаラム（PSC、PRC）メンブレンに触れないでください。
- マイクロ遠心チューブ（MCT）をボルテックスまたは加熱した後、短時間遠心分離して蓋の内側から滴を取り除きます。
- 手順全体にわたり手袋を着用します。手袋とサンプルが接触した場合は、すぐに手袋を交換します。

## 開始する前に

- *PAXgene Blood RNA Tube* ハンドブックの指示に従って、*PAXgene Blood RNA Tubes*（BRT）に血液を採取する必要があります。必要に応じて、*PAXgene Blood RNA Tubes*（BRT）の取り扱いに関する推奨事項について、付録 C（84 ページ）をご参照ください。
- 採血後、*PAXgene Blood RNA Tubes*（BRT）を室温で少なくとも 2 時間インキュベートして、確実に血球を完全に溶解させ、RNA を沈殿させます。*PAXgene Blood RNA Tube*（BRT）を夜間にわたりインキュベートすると、収量が増える可能性があります。採血後、*PAXgene Blood RNA Tube*（BRT）を 2～8°C、-20°C、または-70°C で保存した場合は、まず室温に平衡化し、次に室温で 2 時間保存してから、手順を開始します。
- 19 ページの安全情報をお読みください。
- 61 ページの「重要な注意」をお読みください。
- RNA の取り扱いに関するガイドラインをお読みください（81 ページの付録 A）。

- 安全情報に注意を払いながら、適切な QIAcube Connect MDx のユーザーマニュアルおよび機器に付属の追加情報をお読みください。
- ピペットや QIAcube Connect MDx などのデバイスと機器が、製造者の推奨事項に従って定期的に点検され、校正されていることをご確認ください。
- 結合緩衝液 (BR2) は、保存時に沈殿物を形成することがあります。必要に応じて、37°C に温めて溶解します。
- 洗浄バッファー 2 (BR4) は、濃縮物として供給されます。初回使用時は、ボトルの表示に従い、適切な量のエタノール (96~100% v/v、純度等級 p.a.) を加え、作業溶液を調製します。
- RNase フリー DNase セットを初めて使用する場合は、DNase I 保存液を調製します。固体 DNase I (RNFD; 1500 Kunitz ユニット) \*を、セットに付属の DNase 再懸濁バッファー (DRB) 550 µL に溶解します。バイアルを開けるときに DNase I (RNFD) が消失しないように注意します。再構成した DNase I (RNFD) をボルテックスしないでください。DNase I は物理的変性に特に敏感です。混和は、バイアルの反転でのみ、やさしく行ってください。
- 再構成した DNase I (RNFD) は、元のガラスバイアル (保存液) に入れて 2~8°C で、またはガラスバイアルから保存液を取り除き 1 回分の分量に分けると 20°C で保存できます (キットに付属の 1.5 mL マイクロ遠心チューブ (MCT) を使用、5 回分を十分に得られます)。解凍した 1 回分の保存液は 2~8°C で保存できます。解凍後は再度冷凍しないでください。

\* Kunitz ユニットは、DNase I 測定に一般的に使用される単位であり、基質として高度に重合した DNA を使用して、25°C、pH5.0 で、1 ミリリットル当たり毎分 0.001 の  $A_{260}$  増加を引き起こす DNase I の量と定義されます (Kunitz, M. (1950) J.Gen.Physiol. **33**, 349 および 363)。

- DNase I (RNFD) を再構成し、分取するときは、RNA の取り扱いに関するガイドライン (81 ページの付録 A) に必ず従います。
- 正しいシェーカーアダプター (QIAcube Connect MDx に付属。「2」のマークが付いた 2 mL セーフロックチューブ用のアダプターを使用) を取り付け、シェーカーラックをアダプターの上にセットします。
- 廃棄物ドロワーを点検し、必要に応じて空にします。
- 以前の実行でまだインストールされていない場合は、関連するプロトコールをすべてインストールします。QIAcube Connect MDx では、関連する zip ファイルにあるすべてのプロトコールをダウンロードする必要があります。63 ページの「QIAcube Connect MDx にプロトコールをインストール」を参照してください。

## 操作手順

1. QIAcube Connect MDx のフードを閉じ、電源スイッチで機器の電源を入れます (62 ページの図 15 参照)。

ビープ音が鳴り、スタートアップ画面が表示されます。初期化テストが自動で実行されます。

2. QIAcube Connect MDx のフードを開き、必要な試薬とプラスチック製品を機器にロードします。64 ページの「QIAcube Connect MDx をロード」を参照してください。

時間を節約するには、10 分間の遠心分離ステップ (ステップ 3 と 5) の一方または両方でロードできます。

3. スイングバケットローターを使用して、PAXgene Blood RNA Tube (BRT) を 3000~5000 x g で 10 分間遠心分離します。



血球を完全に溶解させて RNA を沈殿させるには、血液サンプルを PAXgene Blood RNA Tube (BRT) で室温 (15~25°C) にて確実に最低 2 時間インキュベートします。



ローターには、丸底チューブ用のチューブアダプターが含まれている必要があります。別のタイプのチューブアダプターを使用すると、遠心分離中にチューブが破損する可能性があります。

4. デカンテーションまたはピペット操作により上清を除去します。上清をデカンテーションする場合は、ペレットを乱さないように注意し、きれいなペーパータオルでチューブの縁を乾かします。ペレットに RNase フリー水 (RNFW) 4 mL を加え、新しい二次 BD Hemogard クロージャー (キットに付属) を使用してチューブを閉じます。

5. ペレットの溶解が目視できるまでボルテックスし、スイングバケットローターを使用して 3000~5000 x g で 10 分間遠心分離します。上清全体を取り除き、廃棄します。

ボルテックス後、遠心分離前に上清に残っている小さな破片は、手順に影響を与えません。



上清の除去が不完全な場合、溶解が阻害され、溶解物が希釈されるため、RNA が PAXgene メンブレンに結合する条件に影響を与えます。

6. 再懸濁バッファー (BR1) 350  $\mu$ L を加え、ペレットの溶解が目視できるまでボルテックスします。

7. ピペットでサンプルを 2 mL の処理チューブ (PT) に移します。



PAXgene Blood RNA Kit に付属の 2 mL 処理チューブ (PT) を使用します。

8. サンプルを含むオープン処理チューブ（PT）を QIAcube Connect MDx シェーカーにロードします（67 ページの図 18 参照）。サンプルの位置には、ロードしやすいように番号をふっています。シェーカーラックプラグ（QIAcube Connect MDx に付属）を、各処理チューブ（PT）の隣のシェーカーラックの端にあるスロットに挿入します。これにより、ロード点検中にサンプルを検出できます。



正しいシェーカーアダプター（シェーカーアダプター、2 mL、セーフロックチューブ、「2」のマーク付き、QIAcube Connect MDx に付属）が取り付けられていることを確認します。



処理するサンプルが 12 未満の場合は、71 ページの図 22 に示すように、必ずシェーカーラックをロードします。1 個または 11 個のサンプルは処理できません。シェーカーラックの位置番号は、遠心分離機の位置番号に対応しています。

9. QIAcube Connect MDx のフードを閉じます（62 ページの図 15 参照）。

10. 「PAXgene Blood RNA Part A」プロトコールを選択し、プロトコールを開始します。

QIAcube Connect MDx のタッチスクリーンに表示される指示に従います。



両方のプログラムパート（パート A とパート B）が QIAcube Connect MDx にインストールされていることを確認します（63 ページの「QIAcube Connect MDx にプロトコールをインストール」参照）。



機器は、サンプル、チップ、ローターアダプター、試薬ボトルのロードを点検します。

11. 「PAXgene Blood RNA Part A」 プロトコール終了後、QIAcube Connect MDx のフードを開きます（62 ページの図 15 参照）。ローターアダプターから PRC を取り外して廃棄し、シェーカーから空の処理チューブ（PT）を取り外して廃棄します。



実行中、スピncラムは機器によってローターアダプター位置 1（蓋位置 L1）からローターアダプター位置 3（蓋位置 L2）に移動します（69 ページの図 20 参照）。

12. ローターアダプター中の精製 RNA を含むすべての 1.5 mL マイクロ遠心チューブ（MCT）の蓋を閉じます（位置 3、蓋位置 L3、69 ページの図 20 参照）。1.5 mL マイクロ遠心チューブ（MCT）を QIAcube Connect MDx シェーカーアダプターに移します（67 ページの図 18 参照）。
13. QIAcube Connect MDx のフードを閉じます（62 ページの図 15 参照）。
14. 「PAXgene Blood RNA Part B」 プロトコールを選択し、プロトコールを開始します。

QIAcube Connect MDx のタッチスクリーンに表示される指示に従います。



このプログラムは、サンプルを 65°C でインキュベートし、ダウンストリームアプリケーション用に RNA を変性させます。ダウンストリームアプリケーションに熱変性ステップが含まれている場合でも、このステップを省略しないでください。ダウンストリームアプリケーションで最大の効率を達成するには、この段階で RNA を十分に変性させることが必要不可欠です。



15. 「PAXgene Blood RNA Part B」 プロトコール終了後、QIAcube Connect MDx のフードを開きます（62 ページの図 15 参照）。精製した RNA が入ったマイクロ遠心チューブ（MCT）を直ちに氷上にセットします。



警告：高温表面。シェーカーの温度は最高 70°C (158°F) に達することがあります。高温になっている場合は、触れないでください。



精製した RNA を QIAcube Connect MDx に残さないでください。サンプルを冷却していないので、精製した RNA が分解する可能性があります。したがって、夜間にわたるの無人サンプル調製はお勧めしません。

16. RNA サンプルをすぐに使用しない場合は、-20°Cまたは-70°Cで保存します。凍結融解を繰り返しても RNA は変性したままなので、ヒートインキュベーションプロトコール（「PAXgene Blood RNA Part B」）を繰り返す必要はありません。診断アッセイで RNA サンプルを使用する場合は、製造者が提供する指示に従います。

260 nm の吸光度で RNA を正確に定量するには、サンプルを 10 mM Tris-HCl、pH 7.5 で希釈することをお勧めします。\*サンプルを RNase フリー水で希釈すると、値が不正確に低くなる可能性があります。

測定するサンプルと同じ比率の溶出バッファー（BR5）と Tris-HCl バッファーで構成されるブランクを使用して、分光光度計をゼロにします。溶出バッファー（BR5）は 220 nm で高い吸光度を示し、分光光度計を適切にゼロ調整していないと、バックグラウンド吸光度レベルが高くなる可能性があります。

\* 薬品を取り扱う際には、必ず適切な白衣を着用し、使い捨ての手袋と保護メガネを装着してください。詳細については、製品の供給元が提供する適切な安全データシート（SDS）をご参照ください。



Tris-HCl バッファーでの定量には、次の関係を使用します。

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/mL}$ . 82 ページの付録 B 参照。

17. QIAcube Connect MDx のワークテーブルから試薬ボトルラックを取り外し（67 ページの図 18 参照）、適切にラベル付けした蓋ですべての試薬ボトルを閉じます。バッファーおよび RNase フリー水を含むボトル、酵素および酵素バッファーを含むバイアルおよびチューブ、本プロトコールに使用するキットのプラスチック製品が入った袋をすべて閉じます。キットおよび試薬ボトル中の残りは、次回使用するまで「試薬の保管と取り扱い」（23 ページ）および「使用時の安定性」（23 ページ）に記載されているように保管します。

QIAcube Connect MDx マイクロ遠心チューブスロットの処理チューブ（PT）に残っている試薬を取り除き、廃棄します。遠心分離機からローターアダプターを取り外して廃棄します。QIAcube Connect MDx 廃棄物ドロワーを空にします（62 ページ図 15 参照）。機器フードを閉じ、電源スイッチで機器の電源を切ります。

## 製品の使用に関する制限事項

PAXgene Blood RNA Kit は、体外診断アプリケーション用に、ヒト全血 ( $4.8 \times 10^6 \sim 1.1 \times 10^7$  白血球/mL) から細胞内 RNA を単離することを目的としています。ヒト全血からのゲノム DNA やウイルス核酸の単離を目的としません。安定化に関する仕様に向けて検証されている転写産物 (FOS および IL1B 遺伝子転写産物) の数が限られているため、すべての転写産物について性能特性が確立されているわけではありません。ユーザーは、製造者のデータと自身のデータを確認し、他の転写産物に向けて検証が必要か否かを判断する必要があります。本キットのコンポーネントは、本製品説明書に記載されている手動プロトコールおよび自動プロトコールでのみ使用できます。

PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) の使用に関する情報は、*PAXgene Blood RNA Tube* ハンドブックに記載されています。

## 品質管理

QIAGEN の ISO 認定品質管理システムに従い、既定の仕様に照らし合わせて PAXgene Blood RNA Kit の各ロットの検査が行われ、製品の一貫した品質が保証されています。

# 性能特性

## サンプル採取と安定化

PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) には、特許取得済みの RNA 安定化試薬が含まれています。この添加物は、RNA 分子を RNase による分解から保護し、遺伝子発現の ex vivo での変化を最小限に抑えます。PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) は、ヒト全血の採取および、18~25°Cで最大 3 日間（45 および 46 ページの図 4 および図 5）または 2~8°Cで最大 5 日間（47 および 48 ページの図 6 および図 7 参照）の細胞 RNA の安定化を目的としています。また、安定化させた血液は凍結保存が可能です。現在入手可能なデータは、-20°Cまたは-70°C\*で少なくとも 11 年間、細胞 RNA が安定していることを示しています。長期安定性を評価する進行中の試験の詳細については、[www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) をご覧いただくか、QIAGEN テクニカルサービスにお問い合わせください。

実際の RNA 安定化期間は、細胞 RNA の種類と使用するダウンストリームアプリケーションにより異なる場合があります。安定化に関する仕様に向けて検証されている転写産物（FOS および IL1B 遺伝子転写産物）の数が限られているため、すべての転写産物について性能特性が確立されているわけではありません。ユーザーは、製造者のデータと自身のデータを確認し、他の転写産物に向けて検証が必要か否かを判断する必要があります。

\* PAXgene Blood RNA Tube での血液保存の長期試験が進行中です。

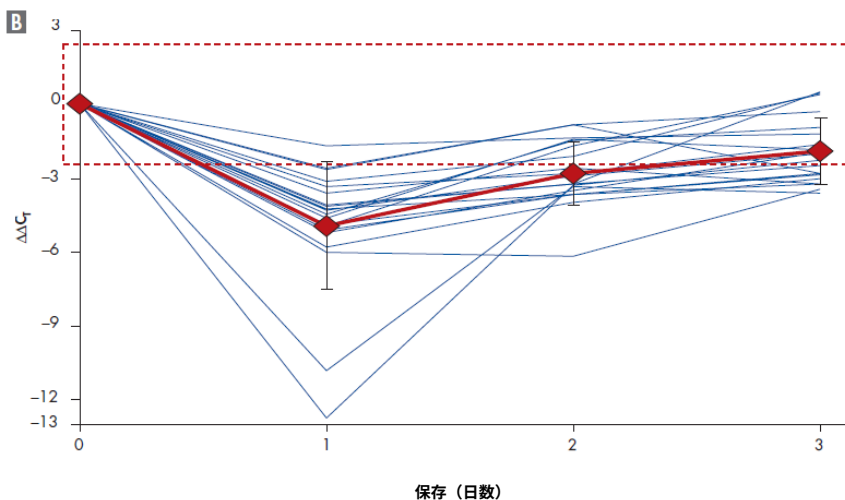
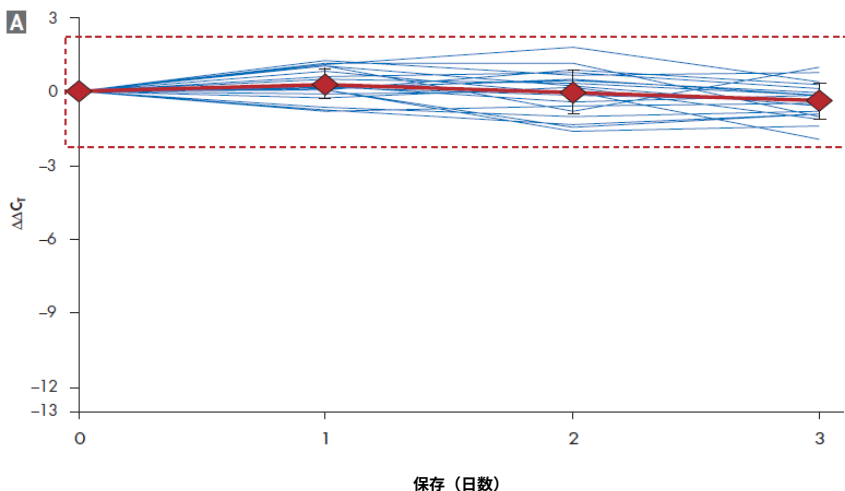
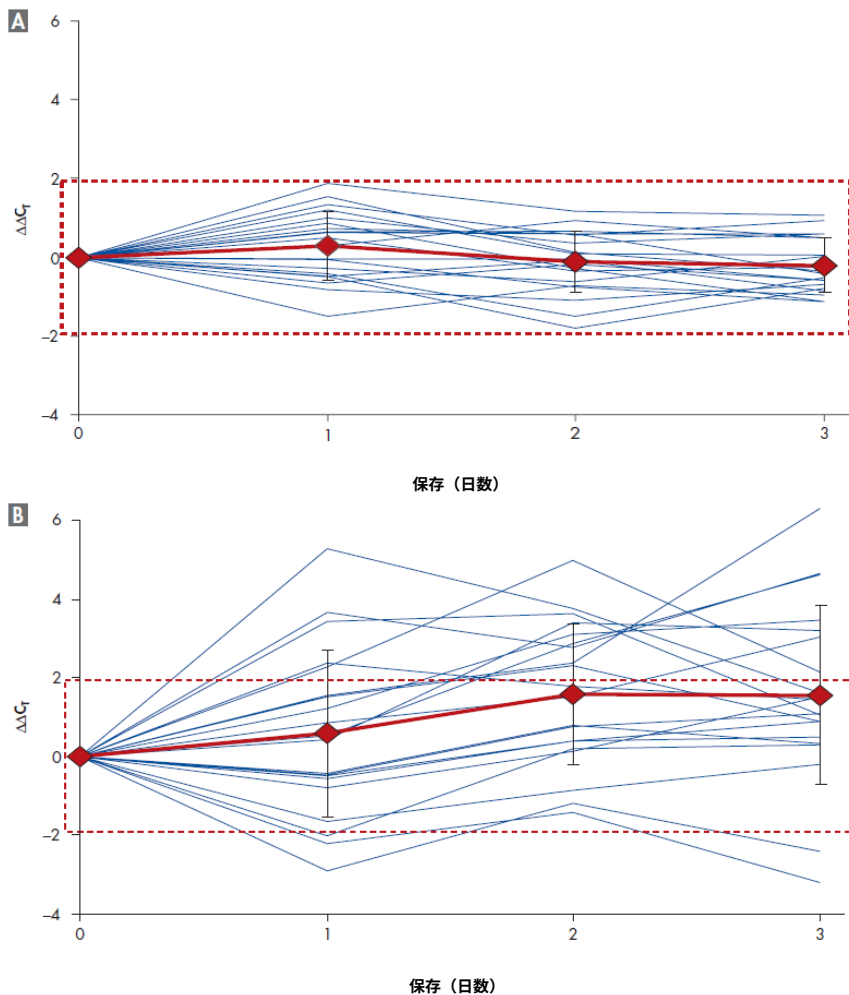
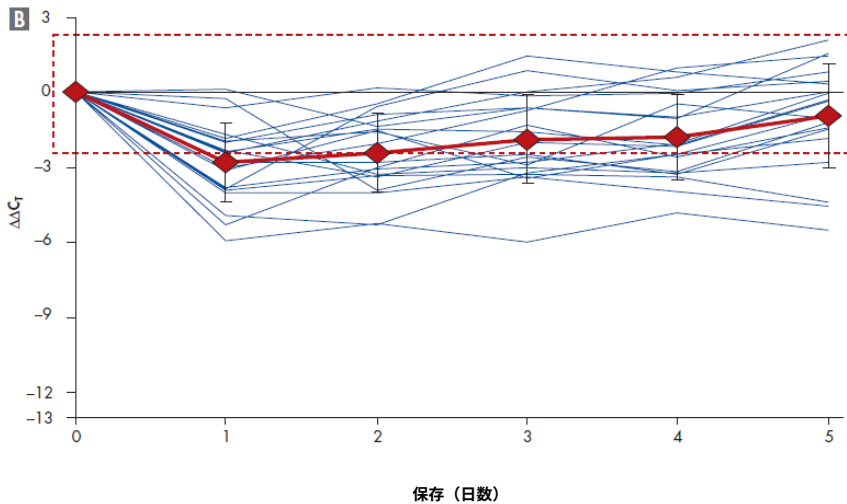
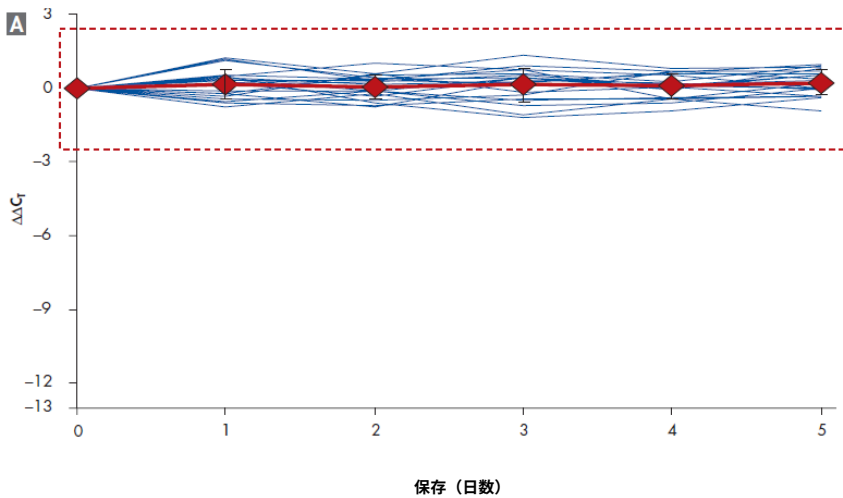


図 4：18～25°Cでの血液サンプルの RNA 安定性：FOS。健康と思われるドナー10 人から採血。二重サンプルを 18～25°Cで、指定された日数にわたり保存した後、トータル RNA を単離。[A]採血し、PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) に保存し、PAXgene Blood RNA Kit を使用してトータル RNA を精製。[B]採血し、抗凝固剤として EDTA を使用して標準採血管に保存し、シリカ膜ベース RNA クリーンアップを用いる標準有機単離メソッドを使用してトータル RNA を精製。FOS の相対転写産物レベルは、内部標準として 18S rRNA を使用して、real-time duplex RT-PCR によって測定。全サンプルの値をプロットし、全サンプルの平均値と標準偏差を示す。破線は、アッセイの合計精度の  $\pm 3$  倍 ( $2.34 C_T$ ) を示す。



**図 5 : 18~25°C での血液サンプルの RNA 安定性 : IL1B。** 図 4 に示すように、採血し、18~25°C で保存後にトータル RNA を精製。IL1B の相対転写産物レベルは、内部標準として 18S rRNA を使用して、real-time duplex RT-PCR によって測定。全サンプルの値をプロットし、全サンプルの平均値と標準偏差を示す。破線は、アッセイの合計精度の±3 倍 (1.93  $C_t$ ) を示す。



**図 6：2～8°Cでの血液サンプルの RNA 安定性：FOS。**ドナー10 人から採血。二重サンプルを2～8°Cで、指定された日数にわたり保存した後、トータル RNA を単離。**[A]**採血し、PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) に保存し、PAXgene Blood RNA Kit を使用してトータル RNA を精製。**[B]**採血し、抗凝固剤として EDTA を使用して標準採血管に保存し、シリカ膜ベース RNA クリーンアップを用いる標準有機単離メソッドを使用してトータル RNA を精製。FOS の相対転写産物レベルは、内部標準として 18S rRNA を使用して、real-time duplex RT-PCR によって測定。全サンプルの値をプロットし、全サンプルの平均値と標準偏差を示す。破線は、アッセイの合計精度の $\pm 3$ 倍 ( $2.34 C_t$ )を示す。

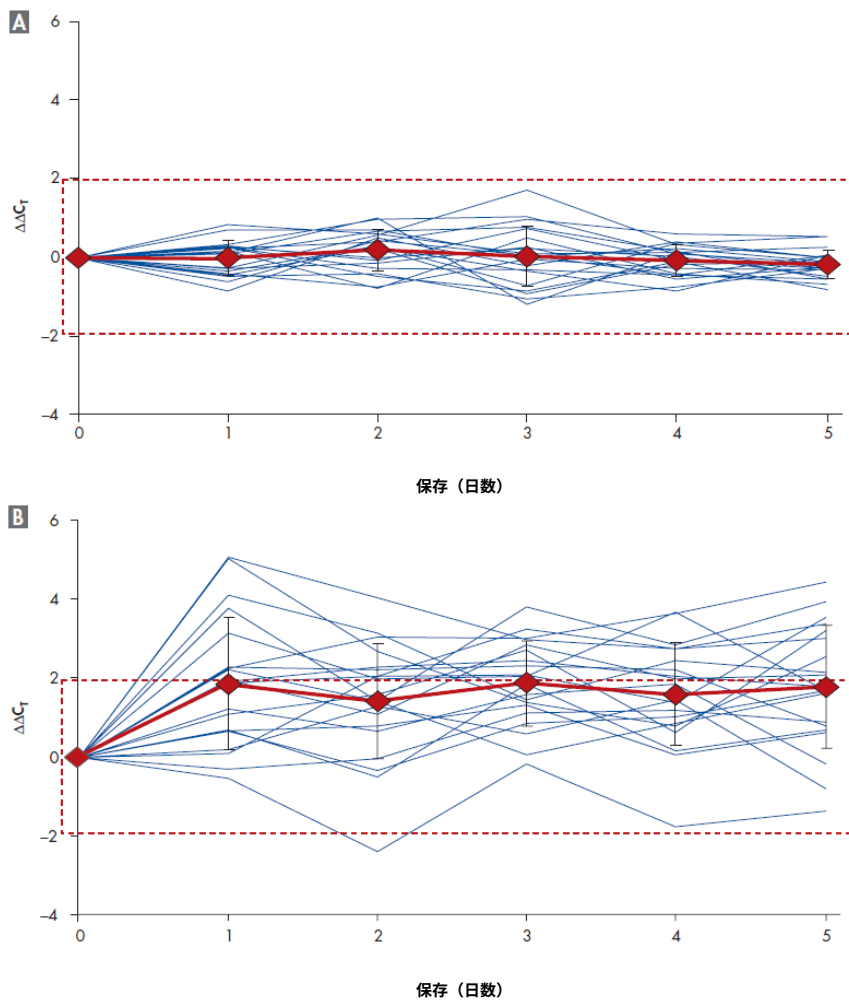


図7：2~8°Cでの血液サンプルのRNA安定性：IL1B。図6に示すように、採血し、2~8°Cで保存後にトータルRNAを精製。IL1Bの相対転写産物レベルは、内部標準として18S rRNAを使用して、real-time duplex RT-PCRによって測定。全サンプルの値をプロットし、全サンプルの平均値と標準偏差を示す。破線は、アッセイの合計精度の $\pm 3$ 倍 ( $1.93 C_i$ )を示す。



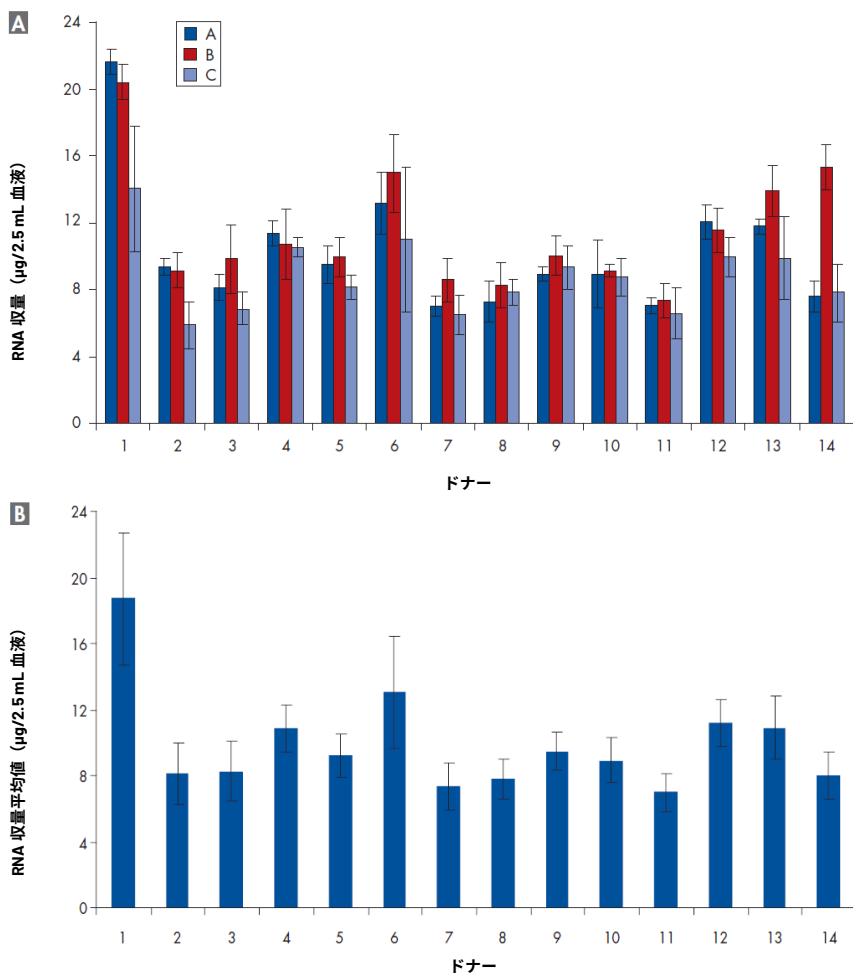
## 手動 RNA 単離

PAXgene Blood RNA System を使用して分離したトータル RNA は純粋です。手動プロトコールを使用すると、 $A_{260}/A_{280}$  値は 1.8~2.2 であり、ベータアクチン遺伝子配列の定量 real-time PCR で測定すると、全サンプルの 95%以上に 1% (w/w) 以下のゲノム DNA が存在します。RT-PCR 反応液量の最大 30%に溶出液を使用すると、サンプルの少なくとも 95%は RT-PCR で阻害を示しません。

手動プロトコールを使用すると、平均サンプル調製時間（サンプル調製 12 回のデータに基づく）は約 90 分であり\*、実際の操作時間はわずか 40 分です。健康なヒト全血 2.5 mL からの RNA 収量は、処理したサンプルの 95%以上で 3  $\mu$ g 以上です。収量はドナーに大きく依存するため、個々の収量は異なる場合があります。個々のドナーに対して、PAXgene Blood RNA System では、再現性と反復性の高い収量(50 および 51 ページの図 8 および図 9)と再現性と反復性のある RT-PCR (55 ページおよび 56 ページの図 10 および図 11) が得られ、臨床診断検査に非常にロバストになります。

図 8 (50 ページ) は、PAXgene Blood RNA System の全体的な反復性と再現性を示します。RNA 収量の再現性とリアルタイム RT-PCR 性能に対するさまざまな PAXgene Blood RNA キットロットとさまざまなオペレーターの影響を示すために、追加試験を行いました。このような試験では、個々の PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) の代わりにプールした血液サンプルを使用したため、結果は、個々の採血間の変動を含むシステム変服性を反映しておらず、サンプル調製の反復性のみを反映しています (51 ページの図 9 参照)。

\* PAXgene Blood RNA Tubes の事前処理（遠心分離、ペレット洗浄、ペレット再懸濁）を含むプロトコールの総実行時間。



**図 8：再現性と反復性のある RNA 単離。**ドナー14 人の 4 重血液サンプルを、技師 3 人 (A、B、C) の各々が手動で処理。機器 3 セットを使用。技師 1 人が全サンプルを調製し、同じ機器を使用して処理。[A]同じドナーと異なる技師由来の複製サンプルあたりの RNA 収量の平均値と標準偏差を示す。[B]ドナー14 人各々由来の 12 複製血液サンプルを、異なる技師 3 人が処理。同じドナーと全技師由来のサンプルあたりの RNA 収量の平均値と標準偏差。全 RNA サンプルで、 $A_{280}/A_{260}$  比の範囲は 1.8~2.2。

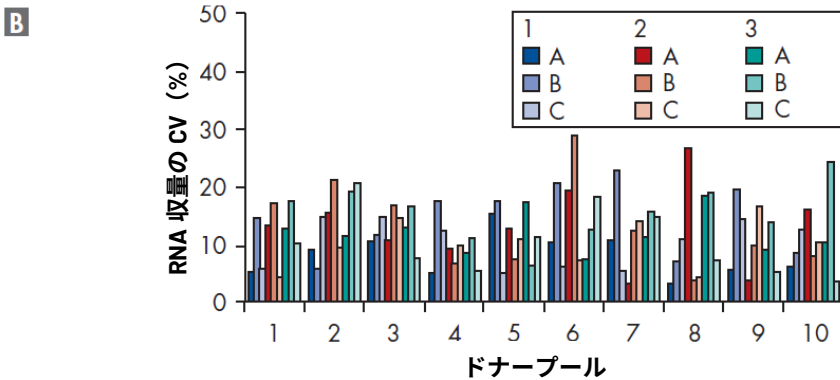
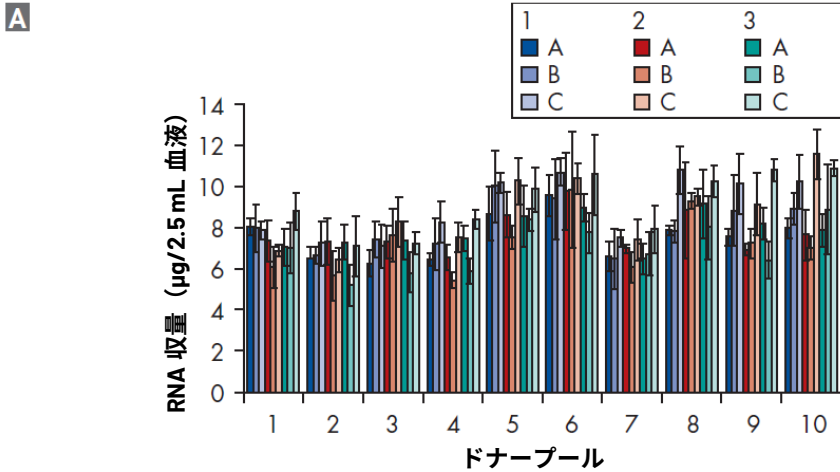


図 9： プールした血液サンプルを使用したときの、異なるオペレーターと PAXgene Blood RNA Kit ロットに対する RNA 収量の再現性と反復性。異なるドナー 30 人の血液サンプルを、PAXgene Blood RNA Tube (BRT、ドナーあたり 12 チューブ、合計 360 チューブ) に採取。ドナー 3 人のチューブの内容物をプールしてから、36 サンプルに再分注。3 ドナープールあたりこの 36 サンプルを、異なるオペレーター 3 人が手動で処理。各オペレーターは、RNA 単離に 3 つの異なる PAXgene Blood RNA Kit ロットを使用し、10 ドナープール各々から 4 重サンプルを処理。[A] オペレーターとロットのすべての組み合わせの RNA 収量と標準偏差。10 ドナープールの 4 重血液サンプルを、3 つのキットロット (1、2、3) 各々を用いて、異なるオペレーター 3 人 (A、B、C) が処理。異なるオペレーターおよび異なるキットロットに対する同じドナープールの 4 重サンプルあたりの平均収量 (列) と標準偏差 (エラーバー) を表示。[B] 図 9A に示す平均収量と収量の標準偏差から計算した、オペレーターとロットの全組み合わせ (A、B、C; 1、2、3) についてのドナープールあたりの RNA 収量の CV。

表 1A： 選択したドナープール（1、6、9、10）の各ロット内および各ユーザー内の再現性

データの組み合わせ	ドナープール 1 ( $5.1 \times 10^6$ 細胞/mL)			ドナープール 6 ( $6.5 \times 10^6$ 細胞/mL)		
	平均収量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	平均収量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
ロット 1、ユーザー A	8.03	0.42	5	9.55	0.99	10
ロット 1、ユーザー B	7.98	1.17	15	9.38	1.94	21
ロット 1、ユーザー C	7.87	0.45	6	10.71	0.65	6
ロット 2、ユーザー A	7.32	0.98	13	9.78	1.89	19
ロット 2、ユーザー B	6.09	1.04	17	9.82	2.83	29
ロット 2、ユーザー C	6.87	0.31	4	10.37	0.74	7
ロット 3、ユーザー A	7.04	0.90	13	8.96	0.68	8
ロット 3、ユーザー B	6.98	1.22	17	7.73	0.97	13
ロット 3、ユーザー C	8.78	0.89	10	10.59	1.94	18
	ドナープール 9 ( $8.4 \times 10^6$ 細胞/mL)			ドナープール 10 ( $10.2 \times 10^6$ 細胞/mL)		
	平均収量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	平均収量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
ロット 1、ユーザー A	7.52	0.41	6	7.96	0.49	6
ロット 1、ユーザー B	8.82	1.72	19	8.90	0.76	9
ロット 1、ユーザー C	10.14	1.46	14	10.22	1.29	13
ロット 2、ユーザー A	6.92	0.27	4	7.63	1.23	16
ロット 2、ユーザー B	7.20	0.71	10	7.00	0.56	8
ロット 2、ユーザー C	9.14	1.52	17	11.56	1.21	10
ロット 3、ユーザー A	8.18	0.76	9	7.85	0.82	10
ロット 3、ユーザー B	6.41	0.88	14	8.88	2.17	24
ロット 3、ユーザー C	10.78	0.56	5	10.88	0.37	3

表 1B：選択したドナープール（1、6、9、10）の各ユーザー内および全ロット間の再現性

データの組み合わせ	ドナープール 1 ( $5.1 \times 10^6$ 細胞/mL)			ドナープール 6 ( $6.5 \times 10^6$ 細胞/mL)		
	平均収量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	平均収量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
ユーザーA、全ロット	7.46	0.85	11	9.43	1.22	13
ユーザーB、全ロット	7.02	1.31	19	8.98	2.09	23
ユーザーC、全ロット	7.84	0.98	13	10.56	1.15	11
	ドナープール 9 ( $8.4 \times 10^6$ 細胞/mL)			ドナープール 10 ( $10.2 \times 10^6$ 細胞/mL)		
	平均収量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	平均収量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
ユーザーA、全ロット	7.54	0.72	10	7.81	0.82	11
ユーザーB、全ロット	7.48	1.50	20	8.26	1.54	19
ユーザーC、全ロット	10.02	1.34	13	10.89	1.10	10

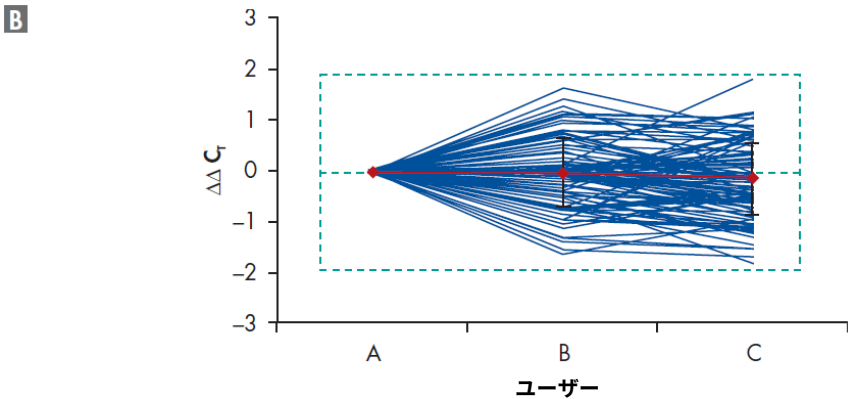
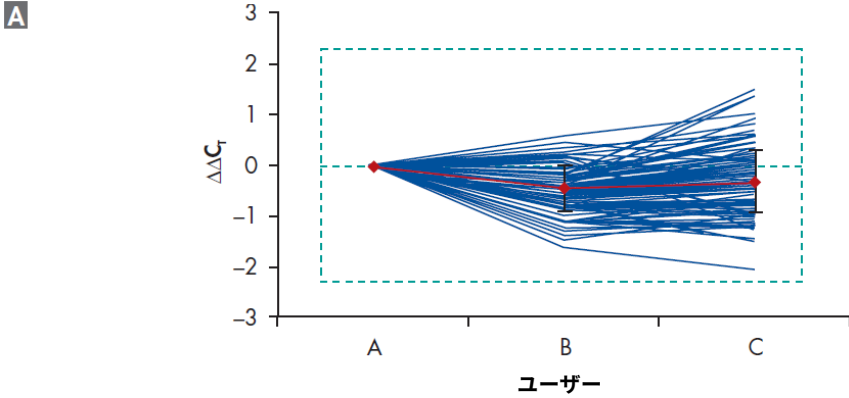
表 1C：選択したドナープール（1、6、9、10）の各ロット内および全ユーザー間の再現性

データの組み合わせ	ドナープール 1 ( $5.1 \times 10^6$ 細胞/mL)			ドナープール 6 ( $6.5 \times 10^6$ 細胞/mL)		
	平均収量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	平均収量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
ロット1、全ユーザー	7.96	0.69	9	9.88	1.34	14
ロット2、全ユーザー	6.76	0.93	14	9.99	1.84	18
ロット3、全ユーザー	7.60	1.27	17	9.09	1.71	19
	ドナープール 9 ( $8.4 \times 10^6$ 細胞/mL)			ドナープール 10 ( $10.2 \times 10^6$ 細胞/mL)		
	平均収量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	平均収量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
ロット1、全ユーザー	8.83	1.63	19	9.02	1.27	14
ロット2、全ユーザー	7.75	1.36	18	8.73	2.31	26
ロット3、全ユーザー	8.46	1.99	24	9.20	1.80	20

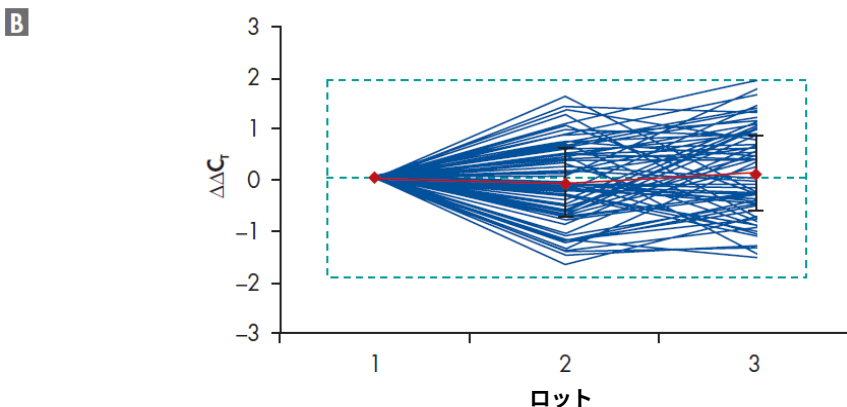
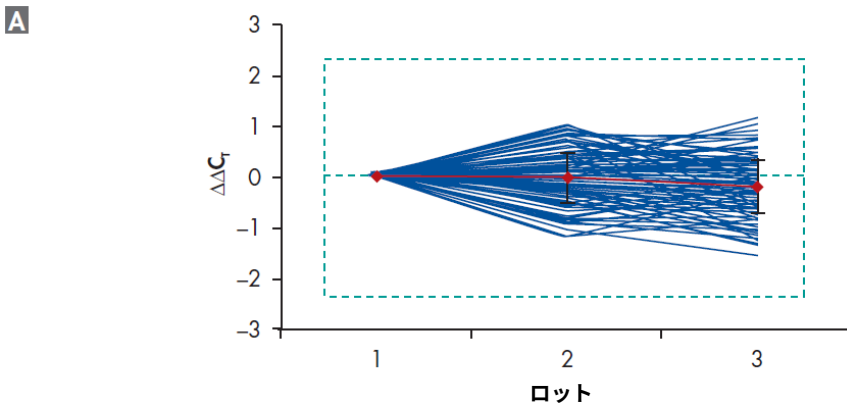
表 1D：選択したドナープール（1、6、9、10）の全ロット間および全ユーザー間の再現性

データの組み合わせ	ドナープール 1 ( $5.1 \times 10^6$ 細胞/mL)			ドナープール 6 ( $6.5 \times 10^6$ 細胞/mL)		
	平均収量 (μg)	SD (μg)	CV (%)	平均収量 (μg)	SD (μg)	CV (%)
ロット 1、全ユーザー	7.44	1.09	15	9.66	1.65	17
	ドナープール 9 ( $8.4 \times 10^6$ 細胞/mL)			ドナープール 10 ( $10.2 \times 10^6$ 細胞/mL)		
	平均収量 (μg)	SD (μg)	CV (%)	平均収量 (μg)	SD (μg)	CV (%)
ロット 1、全ユーザー	8.35	1.70	20	8.99	1.80	20

4 つの代表的なドナープールの詳細な分析です。白血球数に応じてプールを選択しました。プールは、白血球数の正常範囲 ( $4.8 \times 10^6 \sim 1.1 \times 10^7$  白血球/mL) の上限値、中央値、下限値を反映しています。白血球数は、ドナープールあたりドナー3人の3つの白血球数の平均値を表します。



**図 10：RT-PCR の再現性 — ユーザー間。** 図 9 に示す実験で精製した RNA を、リアルタイム RT-PCR に使用。[A] FOS および [B] IL1B の相対転写産物レベルを、内部標準として 18S rRNA を使用する real-time duplex RT-PCR により測定。ユーザー A の値（10 ドナープール × 3 キットロット × 4 複製 = 各遺伝子に対し 120 データセット）と比較して全サンプルの値をプロットし、全サンプルの平均値（赤線）と標準偏差（黒いバー）を示す。破線は、アッセイの合計精度の ±3 倍を示す（FOS：2.34  $C_T$ ；IL1B：1.93  $C_T$ ）。



**図 11：RT-PCR の再現性**—キットロット間図 9 に示す実験で精製した RNA を、リアルタイム RT-PCR に使用。[A] FOS および [B] IL1B の相対転写産物レベルを、内部標準として 18S rRNA を使用する real-time duplex RT-PCR により測定。キットロット 1 の値 (10 ドナープール  $\times$  3 ユーザー  $\times$  4 複製 = 各遺伝子に対し 120 データセット) と比較して全サンプルの値をプロットし、全サンプルの平均値 (赤線) と標準偏差 (黒いバー) を示す。破線は、アッセイの合計精度の  $\pm 3$  倍を示す (FOS :  $2.34 C_T$ ; IL1B:  $1.93 C_T$ )。



表 2：図 10 および図 11 の RT-PCR データの要約

テストシステム	FOS/18S rRNA アッセイ		IL1B/18S rRNA アッセイ	
	平均値 ( $\Delta \Delta C_T$ )	± SD ( $\Delta \Delta C_T$ )	平均値 ( $\Delta \Delta C_T$ )	± SD ( $\Delta \Delta C_T$ )
<b>各ユーザー内および全ロット間の再現性</b>				
全ユーザー、ロット 1-ロット 1	0.00	0.00	0.00	0.00
全ユーザー、ロット 1-ロット 2	-0.03	0.48	-0.07	0.66
全ユーザー、ロット 1-ロット 3	-0.21	0.52	0.11	0.71
<b>各ユーザー内および全ロット間の再現性</b>				
全ロット、ユーザーA-ユーザーA	0.00	0.00	0.00	0.00
全ロット、ユーザーA-ユーザーB	-0.46	0.44	-0.06	0.69
全ロット、ユーザーA-ユーザーC	-0.31	0.60	-0.15	0.71

ユーザー：技師、試験を実施

ロット：本試験に使用したキットロット数

SD：標準偏差。

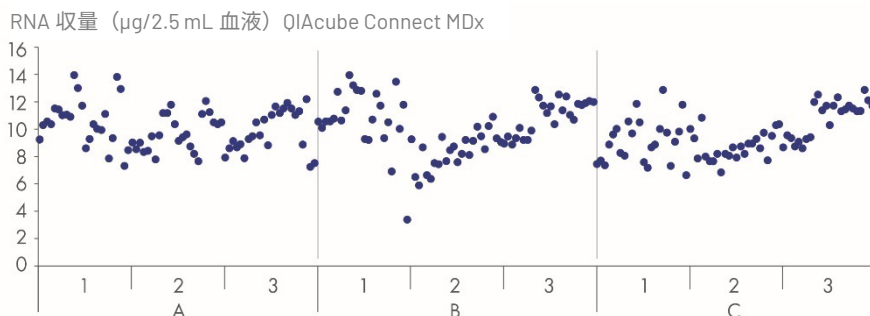
図 10 および図 11 に提示するデータの平均  $\Delta \Delta C_T$  値 (N=120) および標準偏差を示す。

## 自動 RNA 単離

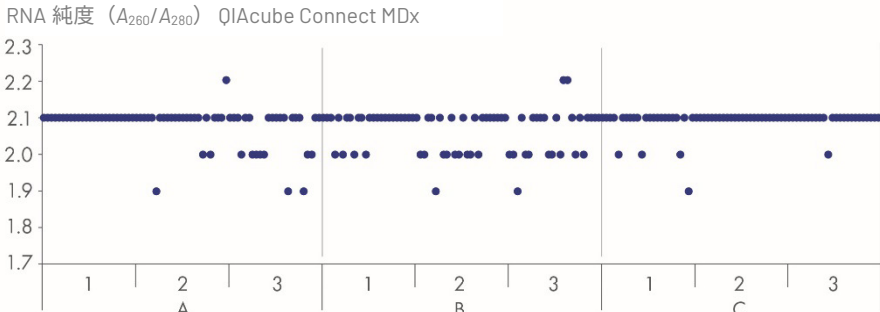
健康なヒト全血 2.5 mL からの RNA 収量は、処理したサンプルの 95%以上で 3  $\mu$ g 以上です。図 12 (58 ページ) は、オペレーター3 人が 3 キットロットで自動プロトコールを使用して調製した合計 216 サンプルからの RNA 収量を示します。このような試験では、個々の PAXgene Blood RNA Tube s (BRT) の代わりにプールした血液サンプルを使用したので、結果は個々の採血の単一サンプルで期待される RNA 収量を反映していません。収量はドナーに大きく依存するため、個々の収量は異なる場合があります (58 ページの図 12)。

RT-PCR 反応液量の最大 30%に溶出液を使用すると、サンプルの少なくとも 95% は RT-PCR で阻害を示しません。自動プロトコールを使用し、RNA 陽性サンプル（ヒト全血）と RNA 陰性サンプル（水）をペアにして同じ実行時に、ABL1 と FOS 転写産物の配列の定量リアルタイム RT-PCR で測定すると、サンプル間のクロスコンタミネーションは検出できません。

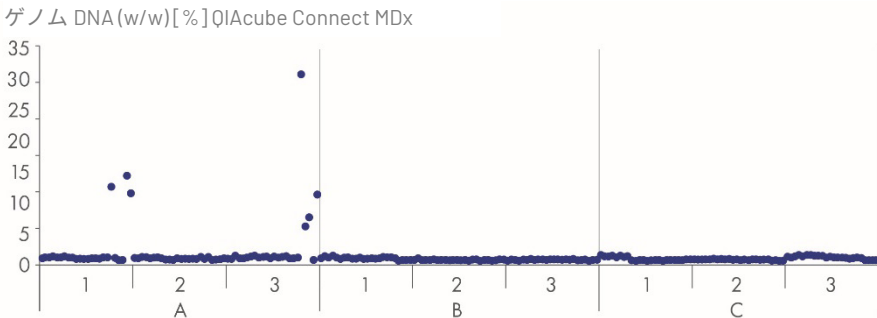
RT-PCR 阻害がなく、 $A_{260}/A_{280}$  の値が 1.8~2.2 であることからわかるように、PAXgene Blood RNA System と自動プロトコールで分離した RNA は純粋です。ゲノム DNA は、ベータアクチン遺伝子配列の定量 real-time PCR で測定した場合、全サンプルの 95%以上に 1%以下 (w/w) 存在します。図 13 および図 14 (59 ページ) は、オペレーター3人が3キットロットを用いて自動プロトコールを使用して調製した合計 216 サンプルの  $A_{260}/A_{280}$  値および相対ゲノム DNA を示します。



**図 12：RNA 収量 — QIAcube Connect MDx による自動処理。** 個々のドナーの血液サンプルを、PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) に採取。チューブの内容物を 6 つのドナープールにプールしてから、再分注。合計 216 チューブ（プールあたり、36）を異なるオペレーター3人（A、B、C）が処理。各オペレーターは、PAXgene Blood RNA Kit の 3 つの異なるロット（1、2、3）を使用して、QIAcube Connect MDx で自動単離し、6 つのドナープールの各々から 4 重サンプルを処理。オペレーターとロットの全組み合わせに対して、すべての個々のサンプルの RNA 収量を示す。



**図 13：RNA 純度 ( $A_{260}/A_{280}$  値) — QIAcube Connect MDx による自動処理。** RNA は、図 12 に示す実験で、QIAcube Connect MDx を用いて、PAXgene Blood RNA Kit の 3 つの異なるロット (1、2、3) を使用して、異なるオペレーター 3 人 (A、B、C) が精製。すべてのオペレーターとロットの組み合わせに対して、個々のサンプルすべての  $A_{260}/A_{280}$  値を示す。



**図 14：RNA 純度 (%ゲノム DNA 汚染) — QIAcube Connect MDx による自動処理。** RNA は、図 12 に示す実験で、QIAcube Connect MDx を用いて、PAXgene Blood RNA Kit の 3 つの異なるロット (1、2、3) を使用して、異なるオペレーター 3 人 (A、B、C) が精製。すべてのオペレーターとロットの組み合わせに対して、個々のサンプルすべてのゲノム DNA 量 (w/w) を示す。

PAXgene Blood RNA System を使用する RNA 単離の自動プロトコールでは、再現性と反復性の高い RT-PCR 結果が得られ、臨床診断検査に非常にロバストになります。

## 単離 RNA の安定性

PAXgene Blood RNA Kit で PAXgene Blood RNA Tubes に採取した血液から単離した RNA サンプルは、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した場合は 5 年間、 $-70^{\circ}\text{C}$ で保存した場合は 7 年間安定した状態を保ちます（本試験のエンドポイント）。

# 重要な注意

## QIAcube Connect MDx の使用

QIAcube Connect MDx の操作に精通していることをご確認ください。自動 PAXgene Blood RNA プロトコールを開始する前に、安全情報に細心の注意を払いながら、機器ユーザーマニュアルおよび機器に付属の追加情報をお読みください。

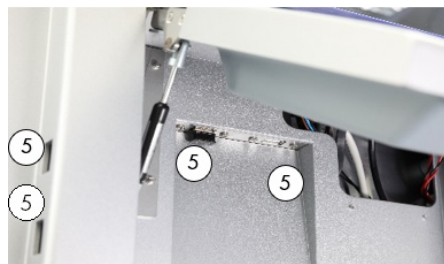
## QIAcube Connect MDx の起動

QIAcube Connect MDx のフードを閉じ、電源スイッチで機器の電源を入れます（62 ページの図 15 参照）。

ブープ音が鳴り、スタートアップ画面が表示されます。初期化テストが自動で実行されます。



QIAcube Connect MDx の前面図



引き出したタッチスクリーン



QIAcube Connect MDx の背面図 (左側)



QIAcube Connect MDx の背面図 (右側)

図 15 : QIAcube Connect MDx の外部機能

- |   |  |
|---|--|
| <p>① タッチスクリーン</p> <p>② フード</p> <p>③ 廃棄物ドロワー</p> <p>④ 電源スイッチ</p> | <p>⑤ タッチスクリーンの左側に 2 個の USB ポート、タッチスクリーンの裏に 2 個の USB ポート (1 個の USB ポートに Wi-Fi モジュールのプラグを接続)</p> <p>⑥ RJ-45 イーサネットポート</p> <p>⑦ 電源コードソケット</p> <p>⑧ 冷却空気出口</p> |
|---|--|

## タッチスクリーン

QIAcube Connect MDx はタッチスクリーンを使用して制御します。タッチスクリーンにより、ユーザーは機器を操作し、ワークテーブルをセットアップできます。サンプル処理中のタッチスクリーンにはプロトコールの状況と残り時間が表示されます。





図 16：引き出した QIAcube Connect MDx のタッチスクリーン

## QIAcube Connect MDx にプロトコールをインストール

QIAcube Connect MDx で初めて RNA 調製を行う前に、初期プロトコールをインストールしなければならない可能性があります。「PAXgene Blood RNA Part A」と「PAXgene Blood RNA Part B」の両プロトコールをインストールします。

QIAcube Connect MDx のプロトコールは、[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) で提供しています。機器に付属の USB スティックにダウンロードする必要があります。このプロトコールは、USB ポートを介して機器に転送されます。

USB ポート（タッチスクリーンの側面にあります。62 ページの図 15 参照）を使用すると、QIAcube Connect MDx を機器付属の USB スティックに接続できます。ログファイルやレポートファイルなどのデータファイルも、USB ポート経由で、機器から USB スティックに転送できます。

-  この USB ポートは、QIAGEN が提供する USB スティックでしか使用できません。他のデバイスをこのポートに接続しないでください。
-  プロトコールダウンロード中やデータファイル転送中、またはプロトコール実行中は、USB スティックを取り外さないでください。


QIAcube Connect MDx にプロトコールをアップロードするプロセスの詳細については、使用する機器のユーザーマニュアルをご参照ください。

## QIAcube Connect MDx をロード

時間を節約するには、34 ページの「プロトコール:PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)」に採取したヒト全血からトータル RNA を自動単離」に示す 10 分間の遠心分離ステップ（ステップ 3 と 5）の一方または両方でロードできます。

### 試薬ボトル

QIAcube Connect MDx で実行する前に毎回、4 つの試薬ボトルに表 3（65 ページ）に記載する試薬を、最大インジケータレベルまで、またはそれが不可能な場合は PAXgene Blood RNA Kit が提供するバッファー量で可能なレベルまで、慎重に充填します。ボトルと蓋にバッファー名を明確にラベル表示し、充填した試薬ボトルを試薬ボトルラックの適切な位置にセットします。ラックを機器のワークテーブルにロードします（66 および 67 ページの図 17 および図 18 参照）。

-  供給されているバッファーBR2 の量では、試薬ボトルのインジケータレベルまで満たすことができません。バッファーBR3 と BR4 は、前の実行で複数のサンプルを処理した後では、ボトルをインジケータレベルまで満たさない場合があります。





-  ワークテーブルにセットする前に、必ずボトルから蓋を外してください。
-  PAXgene Blood RNA Kit (50) が提供するバッファー量は、QIAcube Connect MDx で最大 7 回の RNA 調製を実行するのに十分であり、1 回実行あたりのサンプル数は 2~12 です。一般に、キットあたり合計 50 サンプルを処理するには、サンプル数が少ない実行は避ける必要があります。7 回を超える RNA 調製実行では、最後のサンプル処理に必要なバッファー量が不足する可能性があります。

表 3：試薬ボトルラック内の位置

ポジション	試薬
1	結合バッファー (BR2)
2	エタノール (96~100% v/v)
3	洗浄バッファー1 (BR3)
4	洗浄バッファー2 (BR4) *
5	- (空のままにする)
6	- (空のままにする)

\* 洗浄バッファー2 (BR4) は、濃縮物として供給されます。初めて使用するときは事前に、ボトルの表示に従って、4 倍量のエタノール (96~100% v/v、純度等級 p.a.) を加えて作業溶液を調製します。

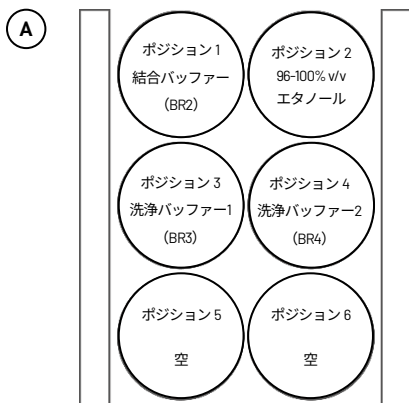


図 17：試薬ボトルラックをロード[A] 試薬ボトルラック内のボトルの位置と内容の概略図。[B] ラックを QIAcube Connect MDx にロード。

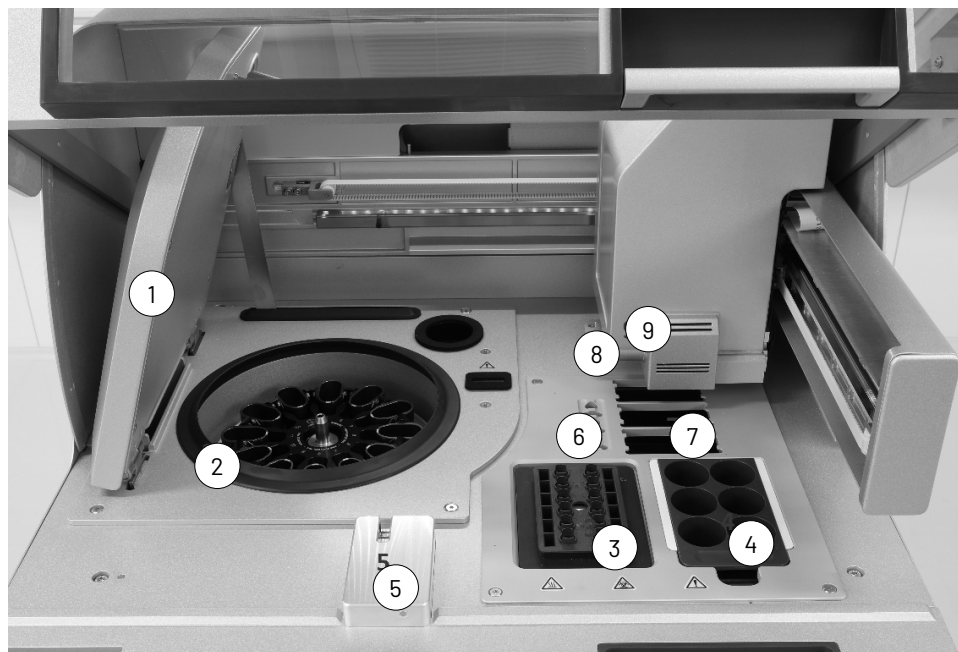


図 18：QIAcube Connect MDx の内部図

- |   |                  |   |  |
|---|------------------|---|--|
| ① | 遠心分離機の蓋          | ⑥ | マイクロ遠心チューブスロット                                     |
| ② | 遠心分離機            | ⑦ | チップラック用の3つのスロット                                    |
| ③ | シェーカー            | ⑧ | チップおよびカラム用廃棄スロット                                   |
| ④ | 試薬ボトルラック         | ⑨ | ロボットアーム（1個のチャネルピペッター、グリッパ、超音波および光学センサー、UV LED を含む） |
| ⑤ | チップセンサーおよびフードロック |   |  |

## スピнкаラム (PSC、PRC) 、マイクロ遠心チューブ (MCT) 、および QIAcube Connect MDx プラスチック製品

フィルターチップ 1000  $\mu$ L を充填した 2 つのチップラックを QIAcube Connect Mdx にセットします (67 ページの図 18 参照)。必要に応じて、ラックにチップを補充します。

**i** QIAcube Connect MDx 用に設計された 1000  $\mu$ L フィルターチップ以外、使用できません。

油性ペンを使用して、各サンプルのローターアダプターとマイクロ遠心チューブ (MCT) にラベルを付けます。使用する PAXgene Shredder スピнкаラム (PSC) を開き、ハサミで蓋を完全に切り取ります (図 19 参照)。

**i** QIAcube Connect MDx のロボットグリッパーを適切に操作するには、蓋と、蓋と PAXgene Shredder スピнкаラム (PSC) を接続するすべてのプラスチック部品を完全に切り取ります (切り取ります) (図 19 参照)。そうしないと、ロボットグリッパーがスピнкаラム (PSC) を適切にグリップできません。

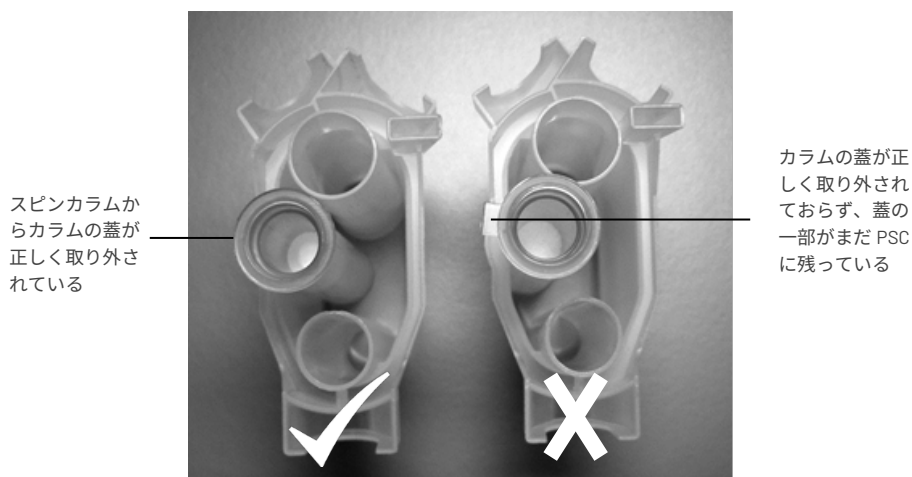


図 19 : PSC をロード PAXgene Shredder スピнкаラム (PSC) を、ローターアダプターの中央の位置にロード。カラムをロードする前に PSC の蓋を切り取る。

表 4 と図 20 に示すように、PSC（蓋なし、68 ページの図 19 参照）、PRC、およびラベル付きマイクロ遠心チューブ（MCT）を各ラベル付きローターアダプターの適切な位置にロードします。

**i** スピнкаラム（PRC）とマイクロ遠心チューブ（MCT）の蓋が、ローターアダプターの端にあるスロットの底まで完全に押し込まれていることを確認してください。そうしないと、遠心分離中に蓋が壊れます。

表 4：ローターアダプターのプラスチック製消耗品

ポジション	試薬	蓋の位置
1	PAXgene RNA スピнкаラム（赤色、PRC）	L1
2	PAXgene Shredder スピнкаラム（紫色、PSC）（ローターアダプターにセットする前に蓋を切り取る）	-
3	マイクロ遠心チューブ（MCT）*	L3

\* PAXgene Blood RNA Kit に付属のマイクロ遠心チューブ（MCT、1.5 mL）を使用する。

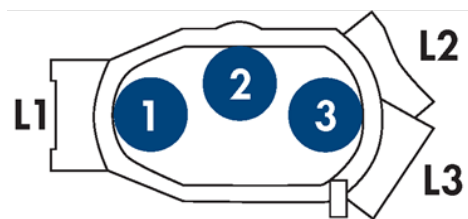


図 20：ローターアダプター内の位置ローターアダプターのチューブの位置は3つ（1～3）、蓋の位置も3つ（L1～L3）です。

## 遠心分離機のロード

図 21 に示すように、組み立てたローターアダプターを QIAcube Connect MDx の遠心分離機バケットにロードします。

- i** 処理するサンプルの数が 12 未満の場合は、必ず放射状にバランスを取って遠心ローターをロードします (71 ページの図 22 参照)。処理するサンプルの数が 12 未満であっても、プロトコールの実行を開始する前にすべての遠心分離機バケットを取り付ける必要があります。単一 (1) サンプルまたは 11 サンプルは処理できません。

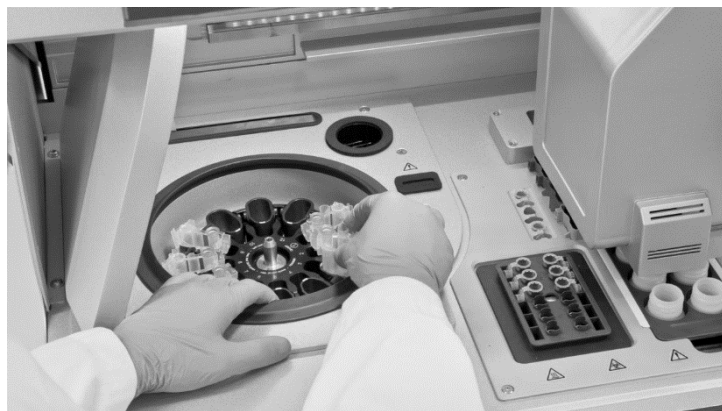


図 21 : QIAcube Connect MDx に遠心分離機をロード組み立てたローターアダプターを遠心分離機バケットにロードします。

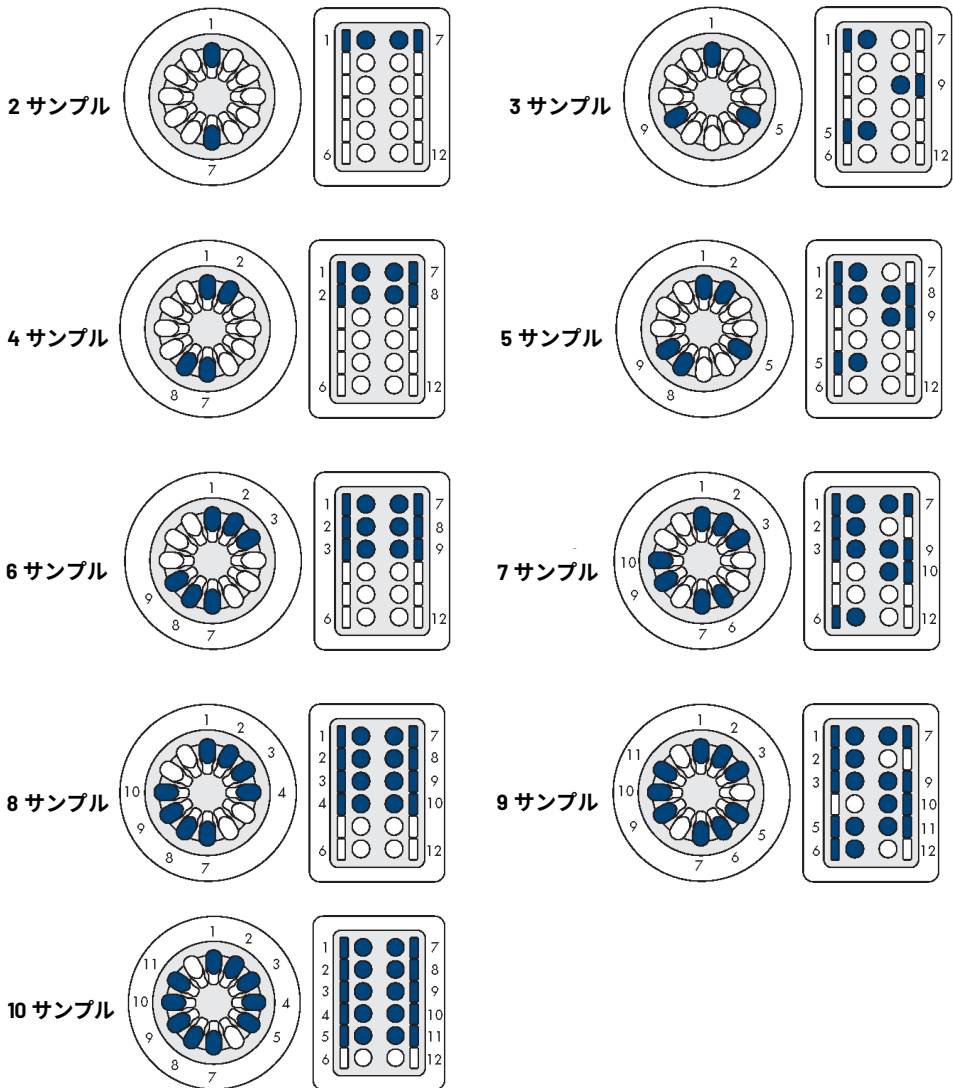




図 22：遠心分離機とシェーカーをロード 2～10 個のサンプルを処理する遠心分離機とシェーカーの位置を示す。1 個または 11 個のサンプルは処理できない。12 個のサンプルを処理するには、すべての遠心分離機とシェーカーの位置をロードする（画像非表示）。

## 処理チューブ

マイクロ遠心チューブスロットに残っている処理チューブ（PT）をすべて取り出します（67 ページの図 18 参照）。実行中のサンプル数に応じて、3 つの処理チューブ（PT）に表 5 に示す量の試薬を充填します。

DNase I インキュベーションミックスでは、指示された量の DNA 消化バッファー（RDD）を処理チューブ（PT）にピペットで移し、指示された量の DNase I（RNFD）保存溶液を加えます。1000  $\mu$ L ピペットチップを使用して、混合物全体を 3 回上下に静かにピペット操作して混合します。

-  PAXgene Blood RNA Kit に付属の 2 mL 処理チューブ（PT）を使用します。表 6（73 ページ）に示すように、チューブに試薬名を明確にラベル付けし、マイクロ遠心チューブ（MCT）スロットの適切な位置にセットします。
-  DNase I（RNFD）は、物理的変性に特に敏感です。ワイドボアピペットチップを使用するピペット操作のみで混合し、せん断を減らします。ボルテックスしないでください。

下の表 5 に示すように、必ず必要な量だけをピペットで移してください。



表 5：マイクロ遠心チューブスロット用処理チューブに必要な試薬量

サンプル数	指定サンプル数に対する試薬量 (μL)		
	プロテイナーゼ K (PK)	DNase I インキュベーションミックス	溶出バッファー (BR5)
2	126	187 (23 DNase I + 164 バッファー-RDD)	313
3	170	261 (33 DNase I + 228 バッファー-RDD)	399
4	213	334 (42 DNase I + 292 バッファー-RDD)	486
5	256	407 (51 DNase I + 356 バッファー-RDD)	572
6	299	481 (60 DNase I + 421 バッファー-RDD)	658
7	342	554 (69 DNase I + 485 バッファー-RDD)	745
8	386	627 (78 DNase I + 549 バッファー-RDD)	831
9	429	701 (88 DNase I + 613 バッファー-RDD)	918
10	472	775 (97 DNase I + 678 バッファー-RDD)	1004
12	558	921 (115 DNase I + 806 バッファー-RDD)	1177

表 6：マイクロ遠心チューブスロット

	ポジション		
	A	B	C
内容	プロテイナーゼ K	DNase I インキュベーションミックス	溶出バッファー (BR5)
容器	処理チューブ*	処理チューブ*	処理チューブ*

\* PAXgene Blood RNA Kit に付属の 2 mL 処理チューブ (PT) を使用する。

# 廃棄

検体の採取および手動 RNA 単離後の安全な廃棄については、19 および 20 ページの安全情報および注意をご参照ください。

また、QIAcube Connect MDx を使用した自動 RNA 単離については、70 ページおよび 71 ページの図 21 および図 22 に、使用済みチップおよびカラムの専用廃棄スロットを示しています。

## 参考文献

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.

# トラブルシューティングガイド

このトラブルシューティングガイドは何らかの問題が発生した際にお役にたててください。詳細については、当社のテクニカルサポートセンターの「よくある質問」をご参照ください。[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx) を参照してください。本ハンドブックの内容やプロトコール、またはサンプルやアッセイの技術についてご不明な点は、QIAGEN テクニカルサービスの専門チームにお問い合わせください（お問い合わせ先については、本書の最終ページまたは弊社ウェブサイト [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) をご参照ください）。

コメントと推奨事項	
<b>分解した RNA</b>	
a) RNase コンタミネーション	 手順中またはその後の取り扱い中に、試薬に RNase を導入しないようにご注意ください（81 ページの付録 A 参照）。
<b>RNA 収量が少ない</b>	
b) PAXgene Blood RNA Tube (BRT) に採取した血液が 2.5 mL 未満	 血液 2.5 mL が PAXgene Blood RNA Tube (BRT; PAXgene Blood RNA Tube / ハンドブック参照) に採取されていることを確認します。
c) 水中で測定した RNA 濃度	 正確に定量するには、RNA を 10 mM Tris-HCl、pH 7.5* で希釈する必要があります（82 ページの付録 B 参照）。
d) 手動プロトコールのステップ 9 および 10 で PAXgene RNA スピンカラム (PRC) に移した細胞破片	 手動プロトコールのステップ 7 で上清をピペットで移すときは、大きな粒子を移さないでください（小さな破片の移動は手順に影響を与えません）。




\* 薬品を取り扱う際には、必ず適切な白衣を着用し、使い捨ての手袋と保護メガネを装着してください。詳細については、製品の供給元が提供する適切な安全データシート (SDS) をご参照ください。

コメントと推奨事項	
e) ステップ3で上清が完全に除去されていない	 <p>上清がすべて除去されていることを確認します。上清をデカントする場合は、ペーパータオルを軽く当てて PAXgene Blood RNA Tube (BRT) の縁から滴を取り除きます。クロスコンタミネーションを防ぐために適切な予防措置を講じてください。</p>
f) PAXgene Blood RNA Tube (BRT) に採取後、血液を2時間未満インキュベート	 <p>採取後、PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 中で少なくとも2時間血液をインキュベートします。</p>
A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> 値が低い	
g) A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> 測定用に RNA を希釈する水	 <p>純度測定前に、10 mM Tris-HCl、pH 7.5 を使用して RNA を希釈します * (82 ページの付録 B 参照)。</p>
h) 分光光度計が適切にゼロ調整されていない	 <p>測定するサンプルと同じ比率の溶出バッファー (BR5) と 10 mM Tris-HCl、pH 7.5 で構成されるブランクを使用して、分光光度計をゼロ調整します。溶出バッファー (BR5) は 220 nm で高い吸光度を示し、分光光度計を適切にゼロ調整していないと、バックグラウンド吸光度レベルが高くなる可能性があります。</p>
機器の誤動作	
i) QIAcube Connect MDx が正しく動作しなかった	<p>トラブルシューティングのセクションに注意しながら、QIAcube Connect MDx ユーザーマニュアルをお読みください。ユーザーマニュアルに記載されているように、機器が適切にメンテナンスされていることをご確認ください。</p>

\* 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.

# 図記号

製品説明書やパッケージとラベルには、次の図記号が表示されます。その他の記号はキットの内容（6 ページ）で説明しています。

図記号	図記号の定義
V<N1>	バージョン<N1>の製品です
 <N2>	<N2>回の試験に必要な試薬を含みます
	使用説明書を参照
	使用者
<b>IVD</b>	体外診断用医療機器
<b>REF</b>	カタログ番号
<b>LOT</b>	ロット番号
<b>MAT</b>	マテリアル番号
<b>COMP</b>	コンポーネント
<b>NUM</b>	番号
<b>KU</b>	Kunitz ユニット
<b>ADD</b>	追加
<b>CONT</b>	含有物質
<b>RCNS</b>	再構成

DNase

デオキシリボヌクレアーゼ I

EtOH

エタノール

GITC

グアニジンイソチオシアン酸塩

RNase-Free DNase Set

RNase フリーDNase セット

GTIN

グローバルトレードアイテム番号



温度制限



温度上限



製造者

EC REP

規則(EU)2017/746 に準拠した欧州法廷代理人



重要な注意



エタノールを追加



CE マーク。本製品は体外診断用医療機器規則(EU) 2017/746 の要求事項に準拠しています。

UDI

機器固有識別子



注意



警告：高温の表面

# お問い合わせ先

QIAGEN は、質の高いテクニカルサポートとその優れた有用性を誇っています。弊社のテクニカルサービス部門には、分子生物学および PreAnalytiX 製品の使用について幅広い実務的および理論的な専門知識を持つ経験豊かな研究者が配属されています。PAXgene Blood RNA Kit についてご不明な点がございましたら、お気軽にお問い合わせください。

テクニカルサポートおよび詳細については、弊社のテクニカルサポートセンター ([www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support)) をご覧ください。お電話 (00800-22-44-6000) でもお問い合わせいただくことができます。または QIAGEN テクニカルサービス部門もしくは最寄りの販売代理店までお問い合わせください (お問い合わせ先については、本書の裏表紙または弊社ウェブサイト ([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)) をご覧ください)。



# 付録 A：RNA 取り扱いの一般的注意事項

## RNA の取り扱い



リボヌクレアーゼ (RNases) は非常に安定した、活性の高い酵素で、通常補因子なしで機能します。RNases の不活性化は困難で、微量でも RNA を破壊します。そのため、プラスチックやガラス器具は RNase コンタミネーションを取り除いてから使用してください。単離の手順の最中とその後で、RNases が RNA に不意に混入しないよう、細心の注意を払ってください。RNase フリーな環境を作り維持するため、RNA の取り扱い中に容器類（使い捨てかどうかを問わず）と溶液の前準備および使用にあたって、ご注意ください。

## 取り扱い全般



RNA の取り扱いでは、適切な微生物学的無菌技術を常に行います。手やほこりの粒子が細菌やカビを運ぶことがあります。これは RNase コンタミネーションの最も多くみられる原因です。試薬と RNA サンプルを取り扱う際には、皮膚表面や機器のほこりによる RNase コンタミネーションを防止するため、常にゴムまたはビニール手袋を使用してください。手袋は頻繁に交換し、チューブの蓋はできる限り閉じるようにします。精製した RNA をダウンストリームで使用するためにピペットで操作する場合、氷で冷却します。

ガラス製品および溶液から RNase コンタミネーションを除去するためのプロトコールは、Sambrook, J. および Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press などの一般的な分子生物学ガイドに記載されています。

## 付録 B: トータル RNA の品質の定量と測定

### RNA の定量

RNA の濃度は、分光光度計で 260 nm ( $A_{260}$ ) の吸光度を測定して決定する必要があります。有意性を確保するには、読み取り値が分光光度計の線形範囲内にある必要があります。260 nm での 1 ユニットの吸光度は、1 mL あたりの RNA 量 44  $\mu\text{g}$  に相当します ( $A_{260}=1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ )。この関係は、10 mM Tris-HCl、pH 7.5 で測定した場合にのみ有効です\*。したがって、RNA サンプルを希釈する必要がある時は、10 mM Tris-HCl で希釈する必要があります。以下で説明するように (83 ページの「RNA の純度」参照)、260 nm と 280 nm の吸光度値の比率から RNA 純度を推定します。RNA サンプルを測定するときは、キュベットが RNase フリーであることをご確認ください。測定するサンプルと同じ比率の溶出バッファー (BR5) と Tris-HCl バッファーで構成されるブランクを使用して、分光光度計をゼロにします。溶出バッファー (BR5) は 220 nm で高い吸光度を示し、分光光度計を適切にゼロ調整していないと、バックグラウンド吸光度レベルが高くなる可能性があります。RNA の定量に関連する計算例を以下に示します。

RNA サンプル量	=	80 $\mu\text{L}$
希釈 (1/15)	=	RNA サンプル 10 $\mu\text{L}$ + 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 140 $\mu\text{L}$
キュベット (RNase フリー)		で希釈したサンプルの吸光度を測定
$A_{260}$	=	0.3
サンプル濃度	=	$44 \times A_{260} \times \text{希釈係数}$
	=	$44 \times 0.3 \times 15$
	=	198 $\mu\text{g/mL}$

\* 薬品を取り扱う際には、必ず適切な白衣を着用し、使い捨ての手袋と保護メガネを装着してください。詳細については、製品の供給元が提供する適切な安全データシート (SDS) をご参照ください。

$$\begin{aligned} \text{総収量} &= \text{濃度} \times \text{サンプル量 (mL)} \\ &= 198 \mu\text{g/mL} \times 0.08 \text{ mL} \\ &= 15.8 \mu\text{g RNA} \end{aligned}$$

## RNA の純度

260 nm と 280 nm の読み取り値の比率 ( $A_{260}/A_{280}$ ) から、タンパク質などの UV を吸収する汚染物質に関する RNA 純度推定値が得られます。しかし、 $A_{260}/A_{280}$  比は pH の影響を大きく受けます。pH が低いと、 $A_{260}/A_{280}$  比が低くなり、タンパク質汚染に対する感度が低下します。\*正確な値を得るには、10 mM Tris-HCl、pH 7.5 で吸光度を測定することをお勧めします。純粋な RNA の  $A_{260}/A_{280}$  比は、10 mM Tris-HCl、pH 7.5 で 1.8~2.2 です。測定するサンプルと同じ比率の溶出バッファー (BR5) と Tris-HCl バッファーで構成されるブランクを使用して、分光光度計をゼロにします。溶出バッファー (BR5) は 220 nm で高い吸光度を示し、分光光度計を適切にゼロ調整していないと、バックグラウンド吸光度レベルが高くなる可能性があります。

\* 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.

# 付録 C : PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) の取り扱い



BD からの以下の勧告は、PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) を取り扱う際に役立つ場合があります。PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) の詳細については、*PAXgene Blood RNA Tube* ハンドブックをご覧ください。

## BD Hemogard クロージャーの取り外し手順

1. 片手で PAXgene Blood RNA Tube (BRT) をつかみ、親指を BD Hemogard クロージャーの下に置きます。(安定性を高めるために、アームを固体表面にセットします。) もう一方の手で、BD Hemogard クロージャーを回転させながら、その手の親指で同時に押し上げます。チューブストッパーが緩むまで行います。
2. クロージャーを持ち上げる前に親指を離します。PAXgene Blood RNA Tube (BRT) からクロージャーを親指で押し出してはいけません。注意：PAXgene Blood RNA Tube (BRT) に血液が含まれていると、曝露されるリスクがあります。クロージャー取り外し中の負傷を防ぐには、BD Hemogard クロージャーが緩むとすぐに、クロージャーを押し上げるのに使用していた親指を PAXgene Blood RNA Tube (BRT) から離すことが重要です。
3. PAXgene Blood RNA Tube (BRT) からクロージャーを持ち上げます。万が一、プラスチックシールドがラバーストッパーから外れても、決してクロージャーを再度組み立てないでください。PAXgene Blood RNA Tube (BRT) からラバーストッパーを慎重に取り外します。

## 二次 BD Hemogard クロージャーの挿入手順

1. PAXgene Blood RNA Tube (BRT) の上のクロージャーを交換します。
2. ストッパーが完全に再度取り付けられるまで、回転させ、しっかりと押し下げます。取り扱い中にクロージャーを PAXgene Blood RNA Tube (BRT) にしっかりと固定するには、ストッパーを完全に再挿入する必要があります。

# 発注情報

製品	内容	カタログ番号
PAXgene Blood RNA Kit (50)	PAXgene スピんカラム 50 個、Shredder スピんカラム 50 個、処理チューブ、RNase フリーDNase I、RNase フリー試薬およびバッファー。PAXgene Blood RNA Tube と併用	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	採血チューブ 100 本	762165
<b>QIAGEN に発注できる QIAcube での RNA 自動単離に必要な関連製品</b>		
Starter Pack, QIAcube	パック内容: 試薬ボトルラック (3)、ラックラベル (8)、200 $\mu$ L フィルターチップ (1024)、1000 $\mu$ L フィルターチップ (1024)、1000 $\mu$ L フィルターチップ、ワイドボア (1024)、30 mL 試薬ボトル (18)、ローターアダプター (240)、ローターアダプターホルダー	990395
Filter-Tips, 1000 $\mu$ L (1024)	滅菌使い捨てフィルターチップ、ラック入り	990352
Reagent Bottles, 30 mL (6)	蓋付き試薬ボトル (30 mL)、6 個入り、QIAcube 試薬ボトルラックで使用	990393
Rotor Adapters (10 $\times$ 24)	調製 240 回分: 使い捨てローターアダプター 240 個、QIAcube で使用	990394
Reagent Bottle Rack	QIAcube ワークテーブル上で 6 $\times$ 30 mL 試薬ボトルを入れるラック	9026197

製品	内容	カタログ番号
Rotor Adapter Holder	12 個の使い捨てローターアダプター用ホルダー、QIAcube で使用	990392
<b>BD に発注できる PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) での採血に必要な関連製品*</b>		
BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set	21G、0.75 インチ (0.8×19 mm) 針、ルアーアダプター付き 12 インチ (305 mm) チューブ、ボックスあたり 50 個、ケースあたり 200 個	367286/ 367281
BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set	21G 0.8 × 19 mm 針、ルアーアダプター付き 305 mm チューブ 50/箱、200/ケース	367344
BD Vacutainer One-Use Holder	ケースは直径 13 mm および 16 mm のみ。 1000 /ケース	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 × 75 mm 4.0 mL ドロー、赤色 BD Hemogard クロージャーとペーパーラベル付き。100 /箱、1000 /ケース	368975/ 367812
BD Vacutainer EST Tube	13 × 75 mm 3.0 mL ドロー、透明 BD Hemogard クロージャーとシースルーラベル付き。100 /箱、1000 /ケース	362725
BD Vacutainer No Additive (Z) Tube	13 × 75 mm 3.0 mL ドロー、透明 BD Hemogard クロージャーとペーパーラベル付き。100 /箱、1000 /ケース	366703

\* このような採血アクセサリは、PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) で使用できる典型的な製品です。発注方法など、このようなアクセサリの詳細については、[www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) にアクセスしてください。

# 文書改訂履歴

日付	変更
[R1]2022 年 4 月	体外診断用医療機器規則初版
[R2]2023 年 2 月	Street address of PreAnalytiX GmbH の所在地住所を「Feldbachstrasse」から「Garstligweg 8」に変更。注文情報に BD 製品を追加。安全情報を更新。



## 注意



ライセンスに関する最新情報や商品に固有の免責事項については、それぞれの PreAnalytiX または QIAGEN キットハンドブックまたはユーザーマニュアルをご覧ください。PreAnalytiX および QIAGEN のキットハンドブックとユーザーマニュアルは、[www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) および [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) から入手できます。また、QIAGEN テクニカルサービスや最寄りの代理店で請求できます。

**Better samples**  
**More to explore**



詳細はこちらをご覧ください。 [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)

HB-3009-002 2023/02

注文 [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | テクニカルサポート [www.support.qiagen.com](http://www.support.qiagen.com) | ウェブサイト [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) または [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)