

Helmikuu 2023

# PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA Kit (käsikirja) Käyttöohjeet



Versio 3 (V3)

IVD

In vitro -diagnostiikkaan



REF

762174



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

Tuottanut QIAGEN<sup>®</sup> GmbH PreAnalytiX GmbH -yhtiölle

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, SAKSA

R2

MAT

1130774FI

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

PreAnalytiX GmbH, 8634 Hombrechtikon, CH.

© 2023 PreAnalytiX GmbH. Ellei muutoin ole ilmoitettu, PreAnalytiX, PreAnalytiX-logo ja kaikki muut tavaramerkit ovat PreAnalytiX GmbH -yhtiön, Hombrechtikon, CH, omaisuutta.

### **PAXgene Blood RNA Kit -sarjan rajattu lisenssisopimus**

Tämän tuotteen käyttö tarkoittaa ostajan tai käyttäjän suostumusta noudattaa seuraavia ehtoja:

1. Tuotetta saa käyttää ainoastaan tuotteen mukana toimitettujen protokollien ja tämän käsikirjan mukaisesti sekä ainoastaan paneelin sisältämien osien kanssa. PreAnalytiX® ei myönnä immateriaaliomaisuutensa lisenssiä tarkoitukseen käyttää tai liittää tämän paneelin sisältämiä osia muiden sellaisten osien kanssa, jotka eivät sisälly tähän paneeliin lukuun ottamatta osia, jotka kuvataan tuotteen mukana toimitetuissa protokollissa, tässä käsikirjassa ja muissa protokollissa, jotka ovat saatavana osoitteessa [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ja [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).
2. PreAnalytiX ei takaa kuin nimenomaisissa lisensseissään, että tämä sarja ja/tai sen käyttäjä(t) eivät loukkaa minkään kolmannen tahon oikeuksia.
3. Tämä sarja on lisensoitu kertakäyttöön, eikä sitä saa käyttää uudelleen, kunnostaa tai myydä eteenpäin.
4. PreAnalytiX kiistää nimenomaisesti kaikki käyttöoikeudet, suorat tai epäsuorat, joita ei ole tässä nimenomaisesti ilmoitettu.
5. Sarjan ostaja ja käyttäjä suostuvat siihen, että he eivät ryhdy tai anna kenellekään toiselle lupaa ryhtyä toimenpiteisiin, jotka saattavat aiheuttaa tai edistää mitään yllä kiellettyä toimintaa.
6. PreAnalytiX voi kääntyä minkä tahansa tuomioistuimen puoleen pannakseen täytäntöön tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kiellon ja saadakseen hyvityksen kaikista valmistelu- ja oikeuskuluista (asianajopalkkiot mukaan lukien), kun tarkoituksena on tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sarjaan ja/tai sen komponentteihin liittyvien immateriaalioikeuksien täytäntöönpano.

Katso päivitetty käyttöoikeusehdot osoitteesta [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ja [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

HB-3009-002 BD-8945 1130774FI © 2023 PreAnalytiX GmbH, kaikki oikeudet pidätetään.

## **PreAnalytiX-jälleenmyyjät**

PreAnalytiX-tuotteet ovat QIAGENin ja BD:n PreAnalytiXille valmistamia ja jakelemia.

# Sisältö

Sisältö.....	3
Käyttötarkoitus .....	6
Käyttötarkoituksen mukainen käyttäjä.....	6
Kuvaus ja toimintaperiaate .....	7
Johdanto .....	7
Periaate ja toimenpide .....	7
Näytteen ottaminen ja stabilointi .....	8
RNA:n eristäminen .....	8
Manuaalinen RNA:n eristys.....	9
Automaattinen RNA:n eristäminen .....	11
Toimitetut materiaalit .....	14
Sarjan sisältö .....	14
Sarjan komponentit.....	15
Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen.....	16
Kaikkiin protokolliin .....	16
Manuaaliseen protokollaan.....	16
Automaattiseen protokollaan .....	17
Varoitukset ja varotoimet .....	18
Turvallisuustiedot .....	18
Tiedot hätätilanteeseen .....	18
Varotoimet.....	19
Reagenssien säilytys ja käsittely.....	22

Käyttöstabiilius.....	22
Näytteiden ottaminen, säilytys ja käsittely.....	23
Protokolla: Manuaalinen kokonais-RNA:n eristys ihmisen kokoverestä, joka on otettu PAXgene Blood RNA Tube -putkiin.....	24
Protokolla: Automaattinen kokonais-RNA:n eristys ihmisen kokoverestä, joka on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkiin.....	32
Tuotteen käytön rajoitukset .....	39
Laadunvalvonta.....	39
Suorituskykyominaisuudet .....	40
Näytteen ottaminen ja stabilointi .....	40
Manuaalinen RNA:n eristys.....	45
Automaattinen RNA:n eristäminen.....	54
Eristetyn RNA:n stabiilius.....	57
Tärkeitä ilmoituksia.....	58
QIAcube Connect MDx -laitteen käyttäminen .....	58
QIAcube Connect MDx -järjestelmän käynnistäminen.....	58
Protokollien asentaminen QIAcube Connect MDx -laitteeseen.....	60
QIAcube Connect MDx -laitteen täyttäminen.....	61
Pyörityskolonnit (PSC, PRC), mikrosentrifugiputki ja QIAcube Connect MDx -laitteen muovitarvikkeet.....	64
Hävittäminen .....	70
Lähdeviitteet .....	71
Vianmääritysopas.....	72
Symbolit.....	74
Yhteystiedot .....	76

Liite A: Yleisiä huomautuksia RNA:n käsittelystä .....	77
Liite B: Kokonais-RNA:n kvantifiointi ja laadun määrittäminen .....	78
Liite C: PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkien käsitteleminen .....	80
Tilaustiedot .....	82
Asiakirjan muutoshistoria .....	84

# Käyttötarkoitus

In vitro -diagnostiikkaan.

PAXgene Blood RNA System -järjestelmä koostuu verinäyteputkesta (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) ja nukleiinihappojen puhdistussarjasta (PAXgene Blood RNA Kit). Se on tarkoitettu verinäytteen ottamiseen, säilytykseen ja kuljetukseen sekä solunsisäisen RNA:n stabilointiin suljetussa putkessa ja myöhempään isäntä-RNA:n eristämiseen ja puhdistukseen kokoverestä molekyyli diagnostiikkatestauksessa käytettyä RT-PCR-käsittelyä varten.

PAXgene Blood RNA System -järjestelmän suorituskykyominaisuudet on määritetty vain FOS- ja IL1B-geenitranskriptien kanssa. Käyttäjä on vastuussa asianmukaisten PAXgene Blood RNA System -järjestelmän suorituskykyominaisuuksien määrittämisestä muille kohdetranskripteille.

## Käyttöaiheet

PAXgene Blood RNA Kit -sarja on tarkoitettu solunsisäisen RNA:n puhdistamiseen kokoverestä, joka on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen. Kun sarjaa käytetään yhdessä PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putken kanssa, järjestelmä tuottaa puhdistettua solunsisäistä RNA:ta kokoverestä molekyyli diagnostiikkatestauksessa käytettyä RT-PCR:ä varten.

## Käyttötarkoituksen mukainen käyttäjä

Tuote on tarkoitettu ammattihenkilöiden, kuten in vitro -diagnostiikkakoulutuksen saaneiden teknikoiden ja lääkäreiden, käyttöön.

Tämä sarja on tarkoitettu ammattikäyttöön.

# Kuvaus ja toimintaperiaate

## Johdanto

Kokoverinäytteen ottaminen on ensimmäinen vaihe useissa molekyylimäärytyksissä, joilla tutkitaan solun RNA:ta. Suuri ongelma näissä testeissä on kuitenkin solun RNA-profiilin epävakaas in vitro. PreAnalytiXin tutkimukset ovat osoittaneet, että yksittäisten mRNA-lajien kopiomäärät kokoveressä voivat vaihdella yli tuhatkertaisesti huoneenlämmössä tapahtuvan säilytyksen tai kuljetuksen aikana (Rainen et al., 2002). Tämän aiheuttaa sekä nopea RNA:n hajoaminen että tiettyjen geenien ekspressoituminen verinäytteen oton jälkeen. Tällaiset muutokset RNA:n ekspressioprofiilissa tekevät luotettavien geeniekspressiotutkimusten tekemisestä mahdotonta. Menetelmä, joka säilyttää RNA:n ekspressioprofiilin laskimopunktion aikana ja sen jälkeen, on siis erittäin tärkeää tarkan geeniekspression analysoimisessa ihmisen kokoverestä.

## Periaate ja toimenpide

PreAnalytiX on kehittänyt järjestelmän, joka mahdollistaa ihmisen kokoverinäytteiden ottamisen, stabiloinnin, säilytyksen ja kuljetuksen sekä nopean ja tehokkaan solunsisäisen RNA:n eristysprotokollan. Järjestelmä edellyttää PAXgene Blood RNA Tube -putkien (BRT) käyttämistä verinäytteen ottamiseen ja RNA:n stabilointiin, minkä jälkeen RNA eristetään manuaalisesti tai automaattisesti PAXgene Blood RNA Kit -sarjan avulla. Sekä manuaaliset että automaattiset protokollat mahdollistavat olennaisesti vastaavan suorituskyvyn RNA:n laadun ja tuoton osalta. Manuaalisen protokollan (alkaen sivulta 45) ja automaattisen protokollan (alkaen sivulta 54) suorituskykytiedot sisältyvät tähän käsikirjaan.

PAXgene Blood RNA System mahdollistaa analyysiä edeltävien toimien standardoinnin aina verinäytteen otosta solun RNA:n eristämiseen ISO 20186-1:2019 -standardin, molekulaariset in vitro -diagnostiset tutkimukset – laskimokokoverta koskevien tutkimusta edeltävien toimien tiedot – osa 1: eristetty solun RNA, mukaisesti.

## Näytteen ottaminen ja stabilointi

PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -verinäyteputket sisältävät tekijänoikeudella suojattua RNA:n stabilointireagenssia. Tämä lisäaine suojaa RNA-molekyylejä RNAasin hajottavalta vaikutukselta ja minimoi geeniekspression muutokset ex vivo. PAXgene Blood RNA System -järjestelmän suorituskyvyominaisuudet on määritetty vain FOS- ja IL1B-geenitranskriptien kanssa. Nämä on esitelty sivulta 40 alkaen.

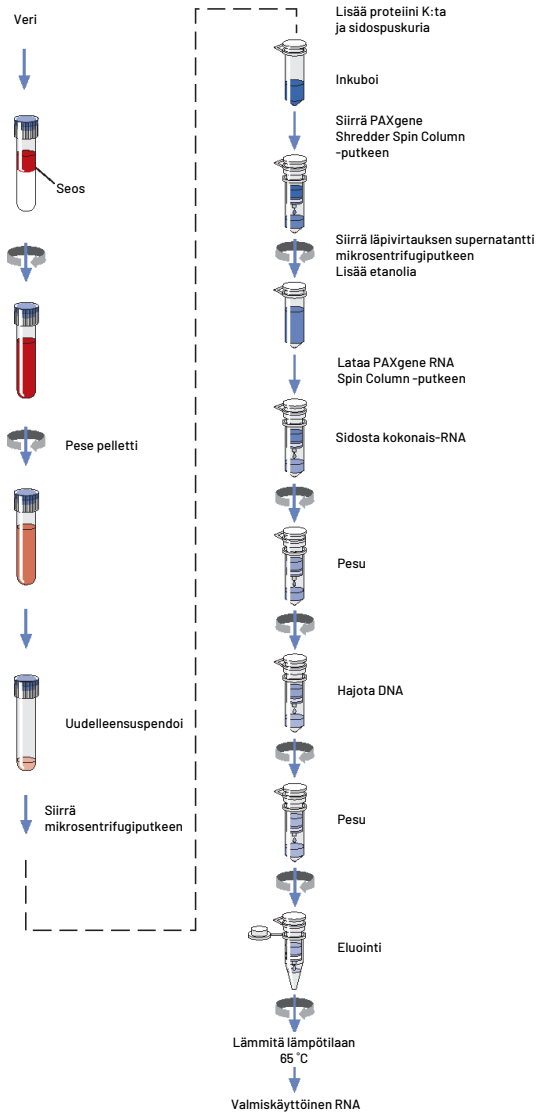
## RNA:n eristäminen

PAXgene Blood RNA Kit -sarja on tarkoitettu kokonais-RNA:n eristämiseen 2,5 ml:sta ihmisen kokoverta, joka on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen. Toimenpide on yksinkertainen ja voidaan tehdä manuaalisesti tai automaattisesti (katso kuvat 1 ja 3, sivuilla 10 ja 12). Molemmissa protokollissa eristäminen alkaa sentrifugoinnilla, jolla pelletoidaan nukleiinihapot PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkissa. Pelletti pestään ja uudelleensuspendoidaan, minkä jälkeen tehdään manuaalinen tai automaattinen RNA:n eristys. Periaatteessa molemmissa protokollissa on samat vaiheet ja niissä käytetään samoja sarjan osia.



## Manuaalinen RNA:n eristys

Tarkemmin sanottuna uudelleensuspendoitu pelletti inkuboidaan optimoiduissa puskureissa yhdessä proteinaasi K:n (PK) kanssa, jotta saadaan aikaan proteiinin hajoaminen. Lisäsentrifugointi PAXgene Shredder -pyörityskolonniputkella (PSC) homogenoi solulysaatin ja irrottaa jääneen soluaineksen, ja läpivirtausfraktion supernatantti siirretään uuteen mikrosentrifugiputkeen (Microcentrifuge Tube, MCT). Sidontaolosuhteita säädetään lisäämällä etanolia ja lyaatti siirretään PAXgene RNA -pyörityskolonniputkeen (PRC). Lyhyen sentrifugoinnin aikana RNA sitoutuu selektiivisesti PAXgene-piiksidikalvoon, kun kontaminantit kulkevat sen läpi. Loput kontaminantit poistetaan useilla tehokkailla pesuvaiheilla. Ensimmäisen ja toisen pesuvaiheen välissä kalvoa käsitellään DNAasi I:llä (RNFD), jotta pienet sitoutuneet DNA:n hiukkaset saadaan poistettua. Pesuvaiheiden jälkeen RNA eluoidaan eluutiopuskuriin (BR5) ja denaturoidaan lämmöllä. Manuaalisen RNA:n eristämisen suorituskykyominaisuudet käytettäessä PAXgene Blood RNA System -järjestelmää on esitetty sivulla 45.



Kuva 1: Manuaalinen PAXgene Blood RNA -protokolla.

## Automaattinen RNA:n eristäminen

Veren RNA:n eristäminen on automaattista QIAGEN QIAcube Connect MDx -laitteella. Innovatiivinen laite käyttää edistynyttä tekniikkaa QIAGEN spin column -putkien käsittelyyn, mikä mahdollistaa automaattisen, alhaisen tuotantotehon näytteen valmistelun ottamisen osaksi laboratorion työnkulkua vaivattomasti. Näytteen valmistelu QIAcube Connect MDx -laitteella tapahtuu samoin kuin manuaalisesti (ts. lyysaus, sidonta, pesu ja eluointi), ja se voidaan tehdä samalla PAXgene Blood RNA Kit -sarjalla.

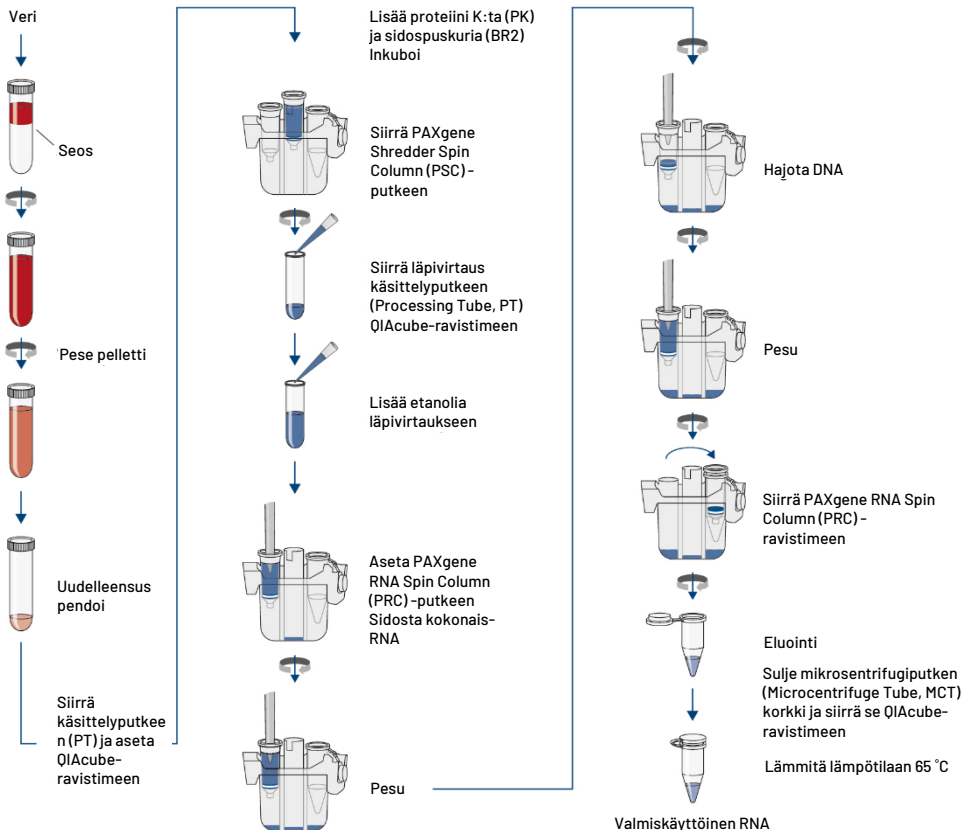


Kuva 2: QIAcube Connect MDx.



QIAGEN QIAcube Connect MDx ei ole saatavilla kaikissa maissa. Lisätietoja saat QIAGENIN tekniseltä palvelulta.

Automaattinen RNA:n eristysprotokolla sisältää kaksi osaa (tai protokollaa): PAXgene Blood RNA Part A -osan (eluoitavan PAXgene Blood RNA Tube -putken verestä) ja PAXgene Blood RNA Part B -osan (eluoimisen jälkeen valmiskäyttöiseksi RNA:ksi), ja näiden kahden osan välissä on lyhyt manuaalinen toimenpide (katso kuva 3).




Kuva 3: Automaattinen PAXgene Blood RNA -protokolla.

Sentrifugoitu, pesty ja uudelleensuspendoitu nukleinihappopelletti (katso RNA:n eristäminen, sivu 8) siirretään PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkesta käsittelyputkiin (Processing Tube, PT), jotka asetetaan lämpöravistimeen QIAcube Connect MDx -työpöydälle. Käyttäjä valitsee ja käynnistää PAXgene Blood RNA Part A -protokollan valikosta. QIAcube Connect MDx suorittaa protokollan vaiheet RNA:n eluutiopuskuriin (BR5) eluoimiseen asti. Käyttäjä siirtää puhdistetun RNA:n sisältävät mikrosentrifugiputket QIAcube Connect MDx -lämpöravistinyksikköön. Käyttäjä valitsee ja käynnistää PAXgene Blood RNA Part B -protokollan valikosta, ja QIAcube Connect MDx tekee lämpödenaturoinnin. Automaattisen RNA:n eristämisen suorituskykyominaisuudet käytettäessä PAXgene Blood RNA System -järjestelmää QIAcube Connect MDx -laitteessa on esitetty sivulla 54.

# Toimitetut materiaalit

## Sarjan sisältö

PAXgene Blood RNA Kit Tuotenumero Näytteenottolaitteiden määrä			(50) 762174 50
Komponentin nimi	Kuvaus	Symboli	Määrä
BR1	Resuspension Buffer (Resuspensiopuskuri)	<b>RES   BUF</b>	20 ml
BR2	Binding Buffer (Sidospuskuri)*	<b>BIND   BUF</b>	18 ml
BR3	Wash Buffer 1* (Pesupuskuri 1*)	<b>WASH   BUF   1</b>	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) (Pesupuskuri 2)(tiiviste)†	<b>WASH   BUF   2   CONC</b>	11 ml
BR5	Elution Buffer (Eluutiopuskuri)	<b>ELU   BUF</b>	6 ml
RNFW	RNase-free Water (bottle)(RNAasiton vesi [pullo])	<b>PEL   WASH</b>	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid)(Proteinaasi K) (vihreä korkki)	<b>PROTK</b>	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red)(PAXgene RNA Spin Column -putket)(punainen)‡	<b>PAXgene   RNA   COL</b>	5 × 10
PT	Processing Tubes (2 mL) (Käsittelyputket, 2 ml)§	<b>PROC   TUBE</b>	6 × 50
Hemogard™	Secondary BD Hemogard Closures (Secondary BD Hemogard -sulkimet)	<b>SEC   CLOS</b>	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (1.5 mL) (Mikrosentrifugiputket, 1,5 ml)§	<b>MIC   TUBE</b>	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophiliz) (DNAasi I, RNAasiton)(kylmäkuivattu)	<b>DNA   REM</b>	1500 Kunitz- yksikköä¶
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) -hajotuspuskuri (valkoinen korkki)	<b>DNA   DIG   BUF</b>	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) -uudelleensuspensiopuskuri (putki, violetti kansi)	<b>DNase   RES   BUF</b>	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (Spin Column -putket)(violetti)‡	<b>PAXgene   SHRED   COL</b>	5 × 10
Käsikirja	PAXgene Blood RNA Kit -sarjan käsikirja (versio 3)		1

\* Ei sovellu käytettäväksi yhdessä valkaisuaineita sisältävien desinfiointiaineiden kanssa. Sisältää guanidiiniisuolaa. Katso sivulta 18 Turvallisuustiedot.

† Pesupuskuri 2 (BR4) toimitetaan konsentraattina. Lisää ennen ensimmäistä käyttökertaa 4 tilavuutta etanolia (96–100 % v/v, puhtausluokka p.a.) pullon merkintöjen mukaan työskentelyliuosta varten.

‡ Jokainen putki on pakattu kertakäyttöiseen läpipainopakkaukseen. Katso hävitysohjeet turvallisuustiedoista.

§ Putket ovat saatavana muovipusseissa, ja jokainen putki on kertakäyttöinen. Katso hävitysohjeet turvallisuustiedoista.

¶ Kunitz-yksiköt ovat yleisesti käytettyjä yksiköitä DNAasi I:n mittaamiseen. Yksikön määritelmä on se DNAasi I:n määrä, joka aiheuttaa  $A_{260}$ :n nousun 0,001/minuutti/millilitra 25 °C:ssa, pH:ssa 5,0, käytettäessä erittäin polymeroitunutta DNA:ta substraattina (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* 33, 349 ja 363).

## Sarjan komponentit

Komponentin nimi	Kuvaus	Vaikuttava ainesosa	Pitoisuus
BR1	Resuspension Buffer (Resuspensiopuskuri)	None (Ei mitään)	-
BR2	Binding Buffer (Sidospuskuri)	Guanidiiniitiosyanaatti	≥ 30 - < 50 % w/w
BR3	Wash Buffer 1* (Pesupuskuri 1*)	Guanidiiniitiosyanaatti Etanoli	≥ 10 - < 20 % w/w ≥ 3 - < 10 % w/w
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) (Pesupuskuri 2) (tiiviste)	None (Ei mitään)	-
BR5	Elution Buffer (Eluutiopuskuri)	None (Ei mitään)	-
RNFW	RNase-free Water (bottle) (RNAasiton vesi [pullo])	None (Ei mitään)	-
PK	Proteinase K (green lid) (Proteinaasi K) (vihreä korkki)	Proteinase K (Proteinaasi K)	≥ 1 - < 3 % w/w
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNAasi I, RNAasiton) (kylmäkuivattu)	DNase (DNAasi)	≥ 90 - ≤ 100 % w/w
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) -hajotuspuskuri (valkoinen korkki)	None (Ei mitään)	-
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) -uudelleensuspensiopuskuri (putki, violetti kansi)	None (Ei mitään)	-

# Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

Kun käsittelet kemikaaleja, käytä aina asianmukaista suojavaatetusta, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja on tuotekohtaisissa käyttöturvatiedotteissa (Safety Data Sheet, SDS), joita saa tuotteen toimittajalta.

## Kaikkiin protokoliin

- PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putket, PreAnalytiX, (tuotenro 762165)
- Etanoli (96–100 % v/v, puhtausaste p.a.)
- Pipetit\* (10–4 ml)
- Steriilit, aerosoliesteen sisältävät, RNAasittomat pipetin kärjet<sup>†</sup>
- Asteikollinen mittalasi<sup>‡</sup>
- Sentrifugi\*, joka saavuttaa nopeuden 3 000–5 000 × g ja jossa on ulos kääntyvä koteloroottori PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkille
- Vortex-sekoitin\*
- Jäämurskaa
- Tussi etikettejä varten

## Manuaaliseen protokollaan

- Vaihtelevanopeuksinen mikrosentrifugi\*, joka saavuttaa vähintään nopeuden 1 000–8 000 × g, vaikka pienemmät ja suuremmat g-voimat ovat sovellettavia (katso protokollan vaiheista lisätietoja), ja jossa on roottori 2 ml:n mikrosentrifugiputkille

\* Varmista, että laitteet on tarkastettu, huollettu ja kalibroitu säännöllisesti valmistajan suositusten mukaan.

<sup>†</sup> Varmista, että olet tutustunut RNA:n käsittelyohjeisiin (liite A, sivu 75).

<sup>‡</sup> Etanolin lisäämiseen BR4-puskuritiivisteeseen.



- Ravistininkubaattori,\* joka voi inkuboida lämpötilassa 55 ja 65 °C ja ravistaa nopeudella  $\geq 400$  r/min, mutta ei yli 1 400 r/min (esim. Eppendorf® Thermomixer Compact tai vastaava)

## Automaattiseen protokollaan

- Sakset
- QIAcube Connect MDx\*(QIAGEN, tuotenro 9003070)

### QIAcube Connect MDx -järjestelmän tarvikkeet:

- Filter-Tips, 1 000  $\mu$ l (1 024)(QIAGEN, tuotenro 990352)†
- Reagent Bottles, 30 ml (6)(QIAGEN, tuotenro 990393)†
- Rotor Adapters (10  $\times$  24)(QIAGEN, tuotenro 990394)†

### QIAcube Connect MDx -järjestelmän lisävarusteet:

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, tuotenro 990392)†

### QIAcube Connect MDx -palvelupaketit:

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

\* Varmista, että laitteet on tarkastettu, huollettu ja kalibroitu säännöllisesti valmistajan suositusten mukaan.

† Sisältyvät myös pakkaukseen Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, tuotenro 990395).

# Varoitukset ja varotoimet

Jos olet Euroopan unionissa sijaitseva asiakas, huomaa, että sinun voi olla tarpeen raportoida laitteeseen liittyvistä vakavista vaaratilanteista valmistajalle ja käyttäjän ja/tai potilaan oleskelumaan toimivaltaiselle viranomaiselle.

Euroopan unionin ulkopuoliset asiakkaat: huomaa, että saatat joutua tarkistamaan paikalliset määräykset laitteeseen liittyvien vakavien vaaratilanteiden raportoinnista valmistajalle ja/tai sen valtuutetulle edustajalle ja käyttäjän ja/tai potilaan oleskelumaan toimivaltaiselle viranomaiselle.

## Turvallisuustiedot

Kemikaalien ja biovaarallisten materiaalien kanssa työskennellessä on aina käytettävä laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvatiedoista (Safety Data Sheet, SDS). Ne ovat saatavana PDF-tiedostoina osoitteessa [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Voit hakea, lukea ja tulostaa kaikkien QIAGEN-sarjojen ja niiden osien käyttöturvallisuustiedotteet.

- Kaikki kemikaalit ja biologiset aineet ovat mahdollisesti vaarallisia. Verinäytteet ovat mahdollisesti tartuntavaarallisia ja niitä on kohdeltava biovaarallisina materiaaleina.
- Hävitä biovaarallinen jäte ja sarjan jäte paikallisten turvallisuuskäytäntöjen mukaisesti.

## Tiedot hätätilanteeseen

CHEMTREC

Yhdysvaltojen ja Kanadan ulkopuolella +1 703-527-3887

## Varotoimet

Verta käsiteltäessä on noudatettava yleisiä varotoimia veren kautta kulkeutuville patogeeneille (esim. HIV, hepatiitti B ja muut veressä kulkeutuvat virukset) altistumisen vaaran välttämiseksi. Käytä käsineitä, vaatteita, silmien suojusta, muita henkilösuojaimia ja teknistä torjuntaa suojaksi verialtistukselta. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvatieotteista (Safety Data Sheet, SDS). Ne ovat saatavilla kätevässä ja kompaktissa PDF-muodossa osoitteessa [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com), jossa voidaan tarkastella tämän sarjan käyttöturvallisuustiedotetta ja tulostaa se.

### HUOMIO



ÄLÄ lisää valkaisuainetta tai happamia liuoksia suoraan näytteen preparointijätteeseen.

Sidontapuskuri (BR2) ja pesupuskuri 1 (BR3) sisältävät guanidiinitiosyanaattia, joka valkaisuaineeseen yhdistettynä voi muodostaa herkästi reagoivia aineita. Jos sidontapuskuri (BR2) tai pesupuskuri 1 (BR3) läikkyvät, puhdista läikynnät sopivalla laboratoripuhdistusaineella ja vedellä. Jos läikkinyt neste sisältää mahdollisia tartunnanaiheuttajia, puhdista alue ensin laboriokäyttöön sopivalla puhdistusaineella ja vedellä ja sen jälkeen 1 %:n (v/v) natriumhypokloriitilla (valkaisuaine).

RNA:n stabilointiliuoksen ja veren seos PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkesta voidaan desinfioida käyttämällä 1 osa valkaisuainetta (5-prosenttinen natriumhypokloriitti) kohti 9 osaa RNA:n stabilointiliuoksen ja veren seosta.

Näytteen valmistelujäte, kuten RNA:n eristystoimenpiteen sentrifugointivaiheen tuottamat supernatantit, on katsottava mahdollisesti tartuntavaaralliseksi. Hävitä biologiset materiaalit biovaarasäiliöihin. Hävitys on tehtävä paikallisten säädösten ja laitoksen menettelytapojen mukaisesti.

PAXgene Blood RNA Kit -sarjan tietyt komponentit on tarkoitettu vain kertakäyttöisiksi. Katso tietoa yksittäisistä komponenteista kohdasta Sarjan sisältö sivulta 14.

Seuraavat varoitukset ja varotoimet koskevat PAXgene Blood RNA Kit -sarjan osia. Katso *PAXgene Blood RNA Tube -käsikirjasta* turvallisuustietoja PAXgene Blood RNA Tube (BRT)-putkista.

#### Buffer BR2



Sisältää: guanidiiniytiosyanaattia. Vaara! Terveydelle haitallista nieltynä. Voi olla haitallista ihokosketuksessa tai hengitettynä. Aiheuttaa vakavaa silmien vahingoittumista. Haitallista vesieliöille, pitkäaikaisia haittavaikutuksia. Kosketus happoihin vapauttaa erittäin myrkyllistä kaasua. Vältettävä päästämistä ympäristöön. Käytä suojakäsineitä/ suojavaatetusta/ silmäsuojainta/kasvosuojainta. JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuho huolellisesti vedellä useiden minuuttien ajan. Poista mahdolliset piilolinssit, jos ne ovat helposti poistettavissa. Jatka huuhtelua. Altistumistapauksissa tai epävarmoissa tilanteissa: Soita heti MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkärille. Hävitä sisältö tai säiliö toimittamalla se hyväksytyyn jätelaitokseen.

### Buffer BR3



Sisältää: etanolia, guanidiinitiosyanaattia. Vaara! Tulenarka neste ja höyry. Aiheuttaa vakavaa silmien vahingoittumista. Kosketus happoihin vapauttaa erittäin myrkyllistä kaasua. Pidettävä poissa lämmönlähteistä/kipinöistä/avotulesta/kuumista pinoista. Ei tupakointia. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmäsuojainta/kasvosuojainta. JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhto huolellisesti vedellä useiden minuuttien ajan. Poista mahdolliset piilolinssit, jos ne ovat helposti poistettavissa. Jatka huuhtelua. Soita heti MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkärille.

### DNaasi I



Sisältää: DNaasia. Vaara! Voi aiheuttaa allergisen ihoreaktion. Voi aiheuttaa hengitettynä allergia- tai astmaoireita tai hengitysvaikeuksia. Vältä pölyn hengittämistä. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmäsuojainta/kasvosuojainta. Käytä hengityksensuojainta. Altistumistapauksissa tai epävarmoissa tilanteissa: Ota yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkäriin. Vie altistunut henkilö raittiiseen ilmaan ja pidä hänet hengityksen kannalta mukavassa asennossa. Pese saastunut vaatetus ennen uudelleenkäyttöä.

# Reagenssien säilytys ja käsittely

PAXgene RNA -pyörityskolonniputkia (PRC), PAXgene Shredder -pyörityskolonniputkia (PSC), proteinaasi K (PK)-liuosta ja puskureita (BR1, BR2, BR3, BR4 ja BR5) on säilytettävä kuivina sarjan etiketissä ilmoitetussa lämpötilassa.

RNase-Free DNase Set -sarja, joka sisältää DNAasi I:tä (RNFD), DNA:n hajotuspuskuri (RDD) ja DNAasi-resuspensiopuskuri (DRB) kuljetetaan ympäristönlämpötilassa. RNase-Free DNase Set -sarjan kaikki osat on säilytettävä heti vastaanoton jälkeen etiketissä ilmoitetussa lämpötilassa. Kun sarjaa säilytetään ohjeiden mukaisesti, se on vakaa laatikossa mainittuun viimeiseen käyttöpäivään asti.

Kaikki kaikkien osien pakkauksiin ja etiketteihin painetut viimeistä käyttöpäivämäärää ja säilytystä koskevat ohjeet on huomioitava. Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.

## Käyttöstabiilius

Sarjan ensimmäisen käyttökerran jälkeen reagenssit ovat stabiileja alkuperäisissä pulloissa sarjan pakkauksen etiketissä ilmoitetussa lämpötilassa ja ilmoitettuun viimeiseen käyttöpäivään asti.

QIAcube Connect MDx -laitteen reagenssipulloihin täytetyt reagenssit ovat stabiileja 3 kuukauden säilytyksen ajan huoneenlämmössä (15–25 °C).

Käyttövalmiiksi saatettu DNAasi I (RNFD) on stabiili 2–8 °C:ssa kuuden (6) viikon ajan alkuperäisessä ampullissa (varastoliuos).

Varastoliuoksen kertakäyttöiset alikvootit 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkissa (toimitetaan sarjan mukana) ovat stabiileja 9 kuukautta säilytettynä lämpötilassa –20 °C. Sulatuksen jälkeen kertakäyttöiset alikvootit ovat stabiileja 6 viikkoa säilytettynä lämpötilassa 2–8 °C.

# Näytteiden ottaminen, säilytys ja käsittely

PAXgene Blood RNA Kit -sarja on tarkoitettu PAXgene Blood RNA Tube -putkeen otetun verinäytteen kanssa käytettäväksi. Verinäyte on otettava PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen PAXgene Blood RNA Tube -putken käsikirjan ohjeiden mukaisesti. Katso tarvittaessa liitteestä C (sivu 80) suosituksia PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkien käsittelemisestä. Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti vaarallisina. PAXgene Blood RNA System -järjestelmän suorituskykyominaisuudet on määritetty vain FOS- ja IL1B-geenitranskriptien kanssa. Nämä on esitelty sivuilla 41-44.

# Protokolla: Manuaalinen kokonais-RNA:n eristys ihmisen kokoverestä, joka on otettu PAXgene Blood RNA Tube -putkiin

## Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Varmista, että pakkauksen laatikko on ehjä ja vahingoittumaton ja että puskurit eivät ole vuotaneet. Älä käytä sarjaa, joka on vahingoittunut.
- Kun käytät pipettiä, varmista, että se on asetettu oikeaan määrään ja että neste aspiroidaan ja tiputetaan varovasti ja kokonaisuudessaan.
- Jotta näytteitä ei siirretä väärään putkeen tai pyörityskolonniputkeen, on varmistettava, että kaikki putket ja pyörityskolonniputket on merkitty asianmukaisesti tussilla. Merkitse kunkin putken korkki ja runko (PT, MCT). Merkitse pyörityskolonniputken käsittelyputken runko. Sulje jokainen putki tai pyörityskolonniputki sen jälkeen, kun siihen on siirretty nestettä.
- Näytteiden ja puskurien läikkyminen toimenpiteen aikana voi vähentää RNA:n tuottoa ja puhtautta.
- Ellei muutoin ilmoiteta, kaikki tämän protokollan vaiheet, mukaan lukien sentrifugointivaiheet, on suoritettava huoneenlämmössä (15–25 °C).

Nukleinihappojen monistustekniikoiden herkkyuden takia seuraavia varotoimia tarvitaan käsiteltäessä näytteitä ristikontaminaation välttämiseksi:

- Pipetoi näyte varovasti pyörityskolonniputkeen (PSC, PRC) reunaan kastelematta.
- Vaihda pipetin kärki aina liuoksen siirtojen välillä. Käytä aerosolinestopipettikärkiä.
- Älä kosketa pyörityskolonniputken (PSC, PRC) kalvoa pipetin kärjellä.
- Kun olet vorteksoinut tai lämmittänyt mikrosentrifugiputken, sentrifugoi sitä lyhyesti, jotta korkin sisäpuolella olevat pisarat lähtevät pois.



- Käytä käsineitä koko toimenpiteen ajan. Jos käsineet ja näyte joutuvat kosketuksiin toistensa kanssa, vaihda käsineet välittömästi.
- Sulje pyörityskolonniputki (PSC, PRC), ennen kuin asetat sen mikrosentrifugiin. Sentrifugoi toimenpiteen kuvauksen mukaisesti.
- Avaa vain yksi pyörityskolonniputki (PSC, PRC) kerrallaan ja varo huolellisesti tuottamasta aerosoleja.
- Jotta useita näytteitä voidaan käsitellä yhtä aikaa tehokkaasti, täytä teline käsittelyputkilla, joihin pyörityskolonniputket (PSC, PRC) voidaan siirtää sentrifugikäsitelyn jälkeen. Hävitä käytetyt käsittelyputket, joissa on läpivirtausnestettä, ja aseta pyörityskolonniputket (PSC, PRC) uusiin käsittelyputkiin ennen niiden siirtämistä takaisin mikrosentrifugiin.

## Ennen kuin aloitat

- Verinäyte on otettava PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen *PAXgene Blood RNA Tube -putken käsikirjan* ohjeiden mukaisesti. Katso tarvittaessa liitteestä C (sivu 80) suosituksia PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkien käsittelemisestä.
- Varmista, että PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkia inkuboidaan vähintään 2 h verinäytteen ottamisen jälkeen, jotta verisolut lysoituvat täydellisesti ja RNA saostuu. PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putken inkubointi yön yli voi suurentaa tuottoa. Jos veren alkuinkubaatiota huoneenlämmössä kahden tunnin ajan ei tehty ennen asettamista säilytykseen lämpötilaan 2–8 °C, –20°C tai –70°C, anna PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putken ensin tasapainottua huoneenlämpötilaan ja inkuboi sitä sen jälkeen huoneenlämmössä kaksi tuntia ennen toimenpiteen aloittamista.
- Lue turvallisuustiedot sivulta 18.
- Lue RNA:n käsittelyohjeet (liite A, sivu 77).
- Varmista, että välineet, kuten pipetit ja ravistininkubaattori, on tarkastettu ja kalibroitu säännöllisesti valmistajan ohjeiden mukaan.

- Ravistininkubaattori tarvitaan vaiheissa 5 ja 20. Aseta ravistininkubaattorin lämpötilaksi 55 °C.
- Sidospuskuriin (BR2) voi muodostua saostuma säilytyksen aikana. Lämmitä puskuria tarvittaessa 37 °C:seen, jotta se liukenee.
- Pesupuskuri 2 (BR4) toimitetaan konsentraattina. Lisää ennen ensimmäistä käyttökertaa 4 tilavuutta etanolia (96–100 % v/v, puhtausluokka p.a.) pullon merkintöjen mukaan työskentelyliuosta varten.
- Jos käytät RNase-Free DNase Set -sarjaa ensimmäistä kertaa, valmista DNAasi I -varastoliuos. Liuota kiinteä DNAasi I (RNFD; 1 500 Kunitz-yksikköä)\* 550 µl:aan DNAasi-resuspensiopuskuria (DRB), joka sisältyy sarjaan. Varmista, että DNAasi I:tä (RNFD) ei häviä, kun avaat pullon. Älä vorteksoi käyttövalmiiksi saatettua DNAasi I (RNFD)-liuosta. DNAasi I on erittäin herkkä fyysiselle denaturoitumiselle. Sekoittaminen on tehtävä vain kääntelemällä pulloa varovasti ylösalaisin.
- Käyttövalmiiksi saatettu DNAasi I (RNFD) voidaan säilyttää 2–8 °C:ssa alkuperäisessä lasiampullissa (varastoliuos) tai –20 °C:ssa, kun varastoliuos on poistettu lasiampullista ja jaettu kertakäyttöisiksi alikvooteiksi (käytä sarjan mukana tulevaa 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkea; liuosta riittää viiteen alikvoottiin). Sulatettuja alikvootteja voi säilyttää 2–8 °C:ssa. Älä pakasta alikvootteja uudelleen sulatuksen jälkeen.
- DNAasi I (RNFD)-liuoksen käyttövalmiiksi saattamisessa ja alikvootteihin jakamisessa on varmistettava, että noudatetaan RNA:n käsittelyohjeita (liite A, sivu 77).

\* Kunitz-yksiköt ovat yleisesti käytettyjä yksiköitä DNAasi I:n mittaamiseen. Yksikön määritelmä on se DNAasi I:n määrä, joka aiheuttaa  $A_{260}$ :n nousun 0,001/ minuutti/millilitra 25 °C:ssa, pH:ssa 5,0, käytettäessä erittäin polymeroitunutta DNA:ta substraattina (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 ja 363).

## Menetelmä

1. Sentrifugoi PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 10 minuuttia nopeudella 3 000–5 000 × g laitteella, jossa on ulos heilahtava roottori.



Varmista, että verinäytettä on inkuboitu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkessa vähintään 2 h (15–25 °C), jotta verisolut lysoituvat täydellisesti ja RNA saostuu.



Roottorin täytyy sisältää putkiadapterit pyöreäpohjaisille putkille. Jos muuntyyppisiä putkiadaptoreita käytetään, putket voivat hajota sentrifugoinnin aikana.

2. Poista supernatantti dekanttoimalla tai pipetoimalla. Lisää 4 ml RNAasitonta vettä (RNFW) pellettiin ja sulje putki uudella toissijaisella BD Hemogard -sulkimella (sisältyy sarjaan).

Jos supernatantti dekantoidaan, älä koske pellettiin ja kuivaa putken reuna puhtaalla paperipyyhkeellä.

3. Vorteksoi, kunnes pelletti liukenee näkyvästi, ja sentrifugoi 10 minuuttia nopeudella 3 000–5 000 × g laitteella, jossa on ulos heilahtava koteloroottori. Poista ja hävitä supernatantti kokonaisuudessaan.

Supernatanttiin vorteksoinnin jälkeen ennen sentrifugointia jääneet pienet epäpuhtaudet eivät vaikuta toimenpiteeseen.



Jos supernatanttia ei poisteta kokonaan, se estää lyyssausta ja laimentaa lyaattia, mikä vaikuttaa RNA:n PAXgene-kalvoon kiinnittymisen olosuhteisiin.

4. Lisää 350 µl resuspensiopuskuria (BR1) ja vorteksoi, kunnes pelletti liukenee näkyvästi.
5. Pipetoi näyte 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen. Lisää 300 µl sidospuskuria (BR2) ja 40 µl proteinaasi K:ta (PK). Sekoita vorteksoimalla 5 sekunnin ajan ja inkuboi 10 minuuttia 55 °C:ssa käyttämällä ravistininkubaattoria nopeudella 400–1 400 r/min. Aseta inkubaation jälkeen ravistininkubaattorin lämpötilaksi 65 °C (vaihetta 20 varten).



Älä sekoita sidospuskuria (BR2) ja proteinaasi K:ta (PK) yhteen ennen niiden lisäämistä näytteeseen.

6. Pipetoi lyaattia suoraan pyörityskolonniputkeen (PSC, violetti), joka on asetettu 2 ml:n käsittelyputkeen (PT), ja sentrifugoi 3 minuuttia maksiminopeudella (mutta ei yli  $20\,000 \times g$ ).



Pipetoi lyaatti varovasti pyörityskolonniputkeen (PSC) ja tarkista visuaalisesti, että lyaatti on täysin siirtynyt pyörityskolonniputkeen (PSC).

Jotta PSC- ja PT-putket eivät vahingoitu, älä ylitä nopeutta  $20\,000 \times g$ .



Jotkin näytteet voivat virrata pyörityskolonniputken (PSC) läpi sentrifugoimatta. Tämä johtuu joidenkin näytteiden vähäisestä viskositeetista, eikä sitä pitäisi katsoa tuotteen toimimattomuuden merkiksi.

7. Siirrä läpivirtausfraktion koko supernatantti uuteen 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen (MCT) koskematta käsittelyputkessa (PT) olevaa pellettä.
8. Lisää 350 µl etanolia (puhtausaste p.a., 96–100 %). Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi lyhyesti (1–2 sekuntia nopeudella  $500\text{--}1\,000 \times g$ ), jotta pisarat putken korkin sisäpuolelta lähtevät pois.



Sentrifugoinnin kesto ei saa olla yli 1–2 sekuntia, koska se voi aiheuttaa nukleiinihappojen pelletöitymistä ja vähentää kokonais-RNA:n tuottoa.

9. Pipetoi 700 µl näytettä pyörityskolonniputkeen (PRC, punainen), joka on asetettu 2 ml:n käsittelyputkeen (PT), ja sentrifugoi 1 minuutin ajan nopeudella  $8\,000\text{--}20\,000 \times g$ . Aseta pyörityskolonniputki (PRC) uuteen 2 ml:n käsittelyputkeen (PT) ja heitä pois vanha läpivirtausta sisältävä käsittelyputki (PT).
10. Pipetoi jäljelle jäänyt näyte pyörityskolonniputkeen (PRC) ja sentrifugoi 1 minuutin ajan nopeudella  $8\,000\text{--}20\,000 \times g$ . Aseta pyörityskolonniputki (PRC) uuteen 2 ml:n käsittelyputkeen (PT) ja heitä pois vanha läpivirtausta sisältävä käsittelyputki (PT).



Pipetoi näyte varovasti pyörityskolonniputkeen (PRC) ja tarkista visuaalisesti, että näyte on täysin siirtynyt pyörityskolonniputkeen (PRC).

11. Pipetoi 350 µl pesupuskuria 1 (BR3) pyörityskolonniputkeen (PRC). Sentrifugoi 1 minuutin ajan nopeudella 8 000–20 000 × g. Aseta pyörityskolonniputki (PRC) uuteen 2 ml:n käsittelyputkeen (PT) ja heitä pois vanha läpivirtausta sisältävä käsittelyputki (PT).
12. Lisää 10 µl DNAasi I (RNFD) -varastoliuosta 70 µl:aan DNA:n hajotuspuskuria (RDD), joka on 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkessa (MCT). Sekoita kääntämällä putkea varovasti ja sentrifugoi lyhyesti kerätäksesi jäännösnesteen putken reunoilta.

Jos käsittelet esimerkiksi 10 näytettä, lisää 100 µl DNAasi I (RNFD) -varastoliuosta 700 µl:aan DNA:n hajotuspuskuria (RDD). Käytä sarjan mukana tulleita 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkia (MCT).



DNAasi I on erittäin herkkä fyysiselle denaturoitumiselle. Sekoittaminen on tehtävä vain kääntelemällä putkea varovasti. Älä vorteksoi.

13. Pipetoi DNAasi I (RNFD) -inkubaatioseos (80 µl) suoraan pyörityskolonniputken (PRC) kalvolle ja aseta se työpöydälle (20–30 °C) 15 minuutin ajaksi.



Varmista, että DNAasi I (RNFD) -inkubaatioseos asetetaan suoraan kalvolle. DNAasin hajotus on epätäydellistä, jos osa seoksesta lisätään pyörityskolonniputken (PRC) seinämille tai O-renkaalle ja se pysyy siellä.

14. Pipetoi 350 µl pesupuskuria 1 (BR3) pyörityskolonniputkeen (PRC) ja sentrifugoi 1 minuutin ajan nopeudella 8 000–20 000 × g. Aseta pyörityskolonniputki (PRC) uuteen 2 ml:n käsittelyputkeen (PT) ja heitä pois vanha läpivirtausta sisältävä käsittelyputki (PT).
15. Pipetoi 500 µl pesupuskuria 2 (BR4) pyörityskolonniputkeen (PRC) ja sentrifugoi 1 minuutin ajan nopeudella 8 000–20 000 × g. Aseta pyörityskolonniputki (PRC) uuteen 2 ml:n käsittelyputkeen (PT) ja heitä pois vanha läpivirtausta sisältävä käsittelyputki (PT).



Pesupuskuri 2 (BR4) toimitetaan konsentraattina. Varmista, että etanoli on lisätty pesupuskuriin 2 (BR4) ennen käyttöä (katso Ennen kuin aloitat, sivu 25).

16. Lisää toiset 500 µl pesupuskuria 2 (BR4) pyörityskolonniputkeen (PRC). Käytä sentrifugissa 3 minuuttia nopeudella 8 000–20 000 × g.
17. Heitä pois läpivirtausta sisältävä käsittelyputki (PT) ja aseta pyörityskolonniputki (PRC) uuteen 2 ml:n käsittelyputkeen (PT). Käytä sentrifugissa 1 minuutti nopeudella 8 000–20 000 × g.
18. Heitä pois läpivirtauksen sisältävä käsittelyputki (PT). Aseta pyörityskolonniputki (PRC) 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen (MCT) ja pipetoi 40 µl eluutiopuskuria (BR5) suoraan pyörityskolonniputken kalvolle. Käytä sentrifugissa 1 minuutti nopeudella 8 000–20 000 × g RNA:n eluoimista varten.  
On tärkeää kastella koko kalvo eluutiopuskurilla (BR5), jotta saavutetaan maksimi eluutiotehokkuus.
19. Toista eluutiovaihe (vaihe 18) kuvauksen mukaisesti käyttämällä 40 µl eluutiopuskuria (BR5) ja samaa mikrosentrifugiputkea (MCT).

20. Inkuboi 5 minuuttia 65 °C:ssa ravistininkubaattorissa (vaiheesta 5) ravistamatta. Inkuboinnin jälkeen jäähdytä välittömästi jään avulla.



Tämä näytteiden inkubaatio 65 °C:ssa denaturoi RNA:n myöhempiä sovelluksia varten. Vaikka myöhempi sovellus sisältäisi lämpödenaturointivaiheen, älä jätä tätä vaihetta tekemättä. Riittävä RNA:n denaturointi tässä vaiheessa on tärkeää, jotta myöhemmät sovellukset ovat mahdollisimman tehokkaita.

Älä ylitä inkubaatioaikaa tai lämpötilaa.

21. Jos RNA-näytteitä ei käytetä välittömästi, säilytä niitä –20°C:ssa tai –70°C:ssa.

Koska RNA pysyy denaturoituneena toistuvan pakastuksen ja sulatuksen jälkeen, inkubointia 65 °C:ssa ei ole tarpeen toistaa. Jos käytät RNA-näytteitä diagnostisessa määrityksessä, noudata valmistajan antamia ohjeita.

Tarkkaa RNA:n kvantifiointia varten 260 nm:n absorbanssilla on suositeltavaa laimentaa näytteet 10 mM:n Tris-HCl:llä, pH 7,5.\* Näytteen laimentaminen RNAasittomalla vedellä voi johtaa epätarkan alhaisiin arvoihin.

Nollaa spektrofotometri käyttämällä nollanäytettä, joka on valmistettu samasta määrästä eluutiopuskuria (BR5) ja Tris-HCl-puskuria kuin mitattavissa näytteissä. Eluutiopuskurilla (BR5) on korkea absorbanssi 220 nm, mikä voi johtaa korkeisiin tausta-absorbanssitasoihin, jos spektrofotometriä ei ole asianmukaisesti nollattu.



Tris-HCl-puskurissa kvantifiointiin on käytettävä suhdetta  $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ . Katso liite B, sivu 78.

22. Sulje uudelleen protokollassa käytetystä sarjasta peräisin olevat kaikki puskureita ja RNAasitonta vettä sisältävät pullot, entsyymejä ja entsyymipuskureita sisältävät ampullit ja putket sekä muovimateriaaleja sisältävät pussit. Säilytä sarjan loppusisältöä kohtien Reagenssien säilytys ja käsittely (sivu 22) ja Käyttöstabiilius (sivu 22) mukaisesti seuraavaan käyttökertaan asti.

\* Kun käsittelet kemikaaleja, käytä aina asianmukaista suojavaatetusta, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja on tuotekohtaisissa käyttöturvatiedotteissa (Safety Data Sheet, SDS), joita saa tuotteen toimittajalta.

# Protokolla: Automaattinen kokonais-RNA:n eristys ihmisen kokoverestä, joka on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkiin

## Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Varmista, että pakkauksen laatikko on ehjä ja vahingoittumaton ja että puskurit eivät ole vuotaneet. Älä käytä sarjaa, joka on vahingoittunut.
- Kun käytät pipettiä, varmista, että se on asetettu oikeaan määrään ja että neste aspiroidaan ja tiputetaan varovasti ja kokonaisuudessaan.
- Jotta näytteitä ei siirretä väärään putkeen tai muovitarvikkeeseen, on varmistettava, että kaikki käsittelyputket (PT), mikrosentrifugiputket (MCT) ja roottoriadapterit on merkitty asianmukaisesti tussilla. Merkitse kunkin mikrosentrifugiputken (MCT) korkki ja runko, kunkin käsittelyputken (PT) runko ja kunkin roottoriadapterin ulkoseinämä.
- Näytteiden ja puskurien läikkyminen toimenpiteen aikana voi vähentää RNA:n tuottoa ja puhtautta.
- Ellei muutoin ilmoiteta, kaikki tämän protokollan vaiheet, mukaan lukien sentrifugointivaiheet, on suoritettava huoneenlämmössä (15–25 °C).

Nukleiinihappojen monistustekniikoiden herkkyyden takia seuraavia varotoimia tarvitaan käsiteltäessä näytteitä ristikontaminaation välttämiseksi:

- Pipetoi käsittelyputken (PT) pohjalle kastelematta putken reunaa.
- Vaihda pipetin kärki aina liuoksen siirtojen välillä. Käytä aerosolinestopipetikärkiä.
- Älä kosketa pyörityskolonniputken (PSC, PRC) kalvoa pipetin kärjellä.
- Kun olet vorteksoinut tai lämmittänyt mikrosentrifugiputken, sentrifugoi sitä lyhyesti, jotta korkin sisäpuolella olevat pisarat lähtevät pois.
- Käytä käsineitä koko toimenpiteen ajan. Jos käsineet ja näyte joutuvat kosketuksiin toistensa kanssa, vaihda käsineet välittömästi.



## Ennen kuin aloitat

- Verinäyte on otettava PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen *PAXgene Blood RNA Tube -putken käsikirjan* ohjeiden mukaisesti. Katso tarvittaessa liitteestä C (sivu 80) suosituksia PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkien käsittelemisestä.
- Varmista, että PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkia inkuboidaan vähintään 2 h verinäytteen ottamisen jälkeen, jotta verisolut lysoituvat täydellisesti ja RNA saostuu. PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putken inkubointi yön yli voi suurentaa tuottoa. Jos PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkea säilytettiin lämpötilassa 2–8 °C, –20 °C tai –70 °C verinäytteen oton jälkeen, tasapainota se ensin huoneenlämpöön ja säilytä sitä sitten huoneenlämmössä kaksi (2) tuntia ennen toimenpiteen aloittamista.
- Lue turvallisuustiedot sivulta 18.
- Katso Tärkeitä ilmoituksia, sivu 58.
- Lue RNA:n käsittelyohjeet (liite A, sivu 77).
- Lue asianomaisen QIAcube Connect MDx -laitteen käyttöopas ja sen mukana tulleet lisätiedot ja kiinnitä erityistä huomiota turvallisuustietoihin.
- Varmista, että laitteet ja välineet, kuten pipetit ja QIAcube Connect MDx -laite, on tarkastettu ja kalibroitu säännöllisesti valmistajan ohjeiden mukaan.
- Sidospuskuriin (BR2) voi muodostua saostuma säilytyksen aikana. Lämmitä puskurit tarvittaessa 37 °C:seen, jotta se liukenee.
- Pesupuskurit (BR4) toimitetaan konsentraattina. Lisää ennen ensimmäistä käyttökertaa sopiva määrä etanolia (96–100 % v/v, puhtausluokka p.a.) pullon merkintöjen mukaan työskentelyliuosta varten.
- Jos käytät RNase-Free DNase Set -sarjaa ensimmäistä kertaa, valmista DNAasi I -varastoliuos. Liuota kiinteä DNAasi I (RNFD; 1 500 Kunitz-yksikköä)\* 550 µl:aan DNAasi-resuspensiopuskuria (DRB), joka sisältyy sarjaan. Varmista, että DNAasi

\* Kunitz-yksiköt ovat yleisesti käytettyjä yksiköitä DNAasi I:n mittaamiseen. Yksikön määritelmä on se DNAasi I:n määrä, joka aiheuttaa  $A_{260}$ :n nousun 0,001/minuutti/millilitra 25 °C:ssa, pH:ssa 5,0, käytettäessä erittäin polymeroitunutta DNA:ta substraattina (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* **33**, 349 ja 363).

I:tä (RNFD) ei häviä, kun avaat pullon. Älä vorteksoi käyttövalmiiksi saatettua DNAasi I (RNFD)-liuosta. DNAasi I on erittäin herkkä fyysiselle denaturoitumiselle. Sekoittaminen on tehtävä vain kääntelemällä pulloa varovasti ylösalaisin.

- Käyttövalmiiksi saatettu DNAasi I (RNFD) voidaan säilyttää 2–8 °C:ssa alkuperäisessä lasiampullissa (varastoliuos) tai –20 °C:ssa, kun varastoliuos on poistettu lasiampullista ja jaettu kertakäyttöisiksi alikvooteiksi (käytä sarjan mukana tulevaa 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkea; liuosta riittää viiteen alikvoottiin). Sulatettuja alikvootteja voi säilyttää 2–8 °C:ssa. Älä pakasta alikvootteja uudelleen sulatuksen jälkeen.
- DNAasi I (RNFD)-liuoksen käyttövalmiiksi saattamisessa ja alikvootteihin jakamisessa on varmistettava, että noudatetaan RNA:n käsittelyohjeita (liite A, sivu 77).
- Asenna oikea ravistinadapteri (tulee QIAcube Connect MDx -laitteen mukana; käytä adapteria 2 ml:n turvalukitusputkille, joissa on merkintä 2) ja aseta ravistinteline adapterin päälle.
- Tarkista jätelokero ja tyhjennä se tarvittaessa.
- Asenna liittyvät protokollat, jos sitä ei ole jo tehty edellisten ajojen yhteydessä. QIAcube Connect MDx edellyttää kaikkien asianomaisessa zip-tiedostossa olevien protokollien lataamista. Katso Protokollien asentaminen QIAcube Connect MDx -laitteeseen, sivu 60.

## Menetelmä

1. Sulje QIAcube Connect MDx -laitteen suojus ja kytke laitteeseen virta virtakytkimestä (katso kuva 15, sivu 59).

Äänimerkki kuuluu ja käynnistysnäyttö tulee näkyviin. Laite tekee käynnistykseen liittyvät testit automaattisesti.

2. Avaa QIAcube Connect MDx -laitteen suojus ja aseta tarvittavat reagenssit ja muovitarvikkeet laitteeseen. Katso QIAcube Connect MDx -laitteen täyttämisen, sivu 61.

Ajan säästämiseksi täyttö voidaan tehdä yhden tai molempien 10 minuutin sentrifugointivaiheen (vaiheet 3 ja 5) aikana.

3. Sentrifugoi PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 10 minuuttia nopeudella  $3\ 000\text{--}5\ 000 \times g$  laitteella, jossa on ulos heilahtava roottori.



Varmista, että verinäytettä on inkuboitu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkessa vähintään 2 h (15–25 °C), jotta verisolut lysoituvat täydellisesti ja RNA saostuu.



Roottorin täytyy sisältää putkiadapterit pyöreäpohjaisille putkille. Jos muuntyyppisiä putkiadaptoreita käytetään, putket voivat hajota sentrifugoinnin aikana.

4. Poista supernatantti dekanttoimalla tai pipetoimalla. Jos supernatantti dekantoidaan, älä koske pellettiin ja kuivaa putken reuna puhtaalla paperipyyhkeellä. Lisää 4 ml RNAasitonta vettä (RNFW) pellettiin ja sulje putki uudella toissijaisella BD Hemogard -sulkimella (sisältyy sarjaan).

5. Vorteksoi, kunnes pelletti liukenee näkyvästi, ja sentrifugoi 10 minuuttia nopeudella  $3\ 000\text{--}5\ 000 \times g$  laitteella, jossa on ulos heilahtava koteloroottori. Poista ja hävitä supernatantti kokonaisuudessaan.

Supernatanttiin vorteksoinnin jälkeen ennen sentrifugointia jääneet pienet epäpuhtaudet eivät vaikuta toimenpiteeseen.



Jos supernatanttia ei poisteta kokonaan, se estää lyyssausta ja laimentaa lyyssaattia, mikä vaikuttaa RNA:n PAXgene-kalvoon kiinnittymisen olosuhteisiin.

6. Lisää 350 µl resuspensiopuskuria (BR1) ja vorteksoi, kunnes pelletti liukenee näkyvästi.

7. Pipetoi näyte 2 ml:n käsittelyputkeen (PT).



Käytä PAXgene Blood RNA Kit -sarjan sisältämiä 2 ml:n käsittelyputkia (PT).

8. Lataa avoimet, näytettä sisältävät käsittelyputket (PT) QIAcube Connect MDx -ravistimeen (katso kuva 18, sivu 63). Näytepaikat on numeroitu asettamisen helpottamiseksi. Aseta ravistintelineen tulpat (tulevat QIAcube Connect MDx) ravistintelineen reunoilla oleviin aukkoihin kunkin käsittelyputken (PT) viereen. Tämä mahdollistaa näytteiden tunnistuksen asetustarkistuksen aikana.



Varmista, että oikea ravistinadapteri (Shaker Adapter, 2 ml, turvalukitusputket, merkitty numerolla 2, tulee QIAcube Connect MDx -laitteen mukana) on asennettu.



Jos käsittelet alle 12 näytettä, aseta ravistinteline kuvan 22, sivu 67, mukaisesti. Yhtä tai 11 näytettä ei voi käsitellä. Ravistintelineen paikkanumerot vastaavat sentrifugin paikkanumeroita.

9. Sulje QIAcube Connect MDx -laitteen suojus (katso kuva 15, sivu 59).

10. Valitse PAXgene Blood RNA Part A -protokolla ja käynnistä se.

Noudata QIAcube Connect MDx -laitteen kosketusnäytössä annettuja ohjeita.



Varmista, että molemmat ohjelman osat (A ja B) on asennettu QIAcube Connect MDx -laitteeseen (katso Protokollien asentaminen QIAcube Connect MDx -laitteeseen, sivu 60).



Laite tekee asetustarkistukset näytteille, kärjille, roottoriadaptereille ja reagenssipulloille.

11. Kun PAXgene Blood RNA Part A -protokolla on valmis, avaa QIAcube Connect MDx -laitteen suojus (katso kuva 15, sivu 59). Poista ja heitä pois pyörityskolonniputki (PRC) roottoriadaptereista ja tyhjät käsittelyputket (PT) ravistimesta.



Ajon aikana laite siirtää pyörityskolonniputket roottoriadapterin paikasta 1 (kannen paikka L1) roottoriadapterin paikkaan 3 (kannen paikka L2) (katso kuva 20, sivu 65).

12. Sulje kaikkien puhdistettua RNA:ta sisältävien, roottoriadaptoreissa olevien 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkien korkit (paikka 3, kannen paikka L3, katso kuva 20, sivu 65). Siirrä 1,5 ml:n mikrosentrifugiputket (MCT) QIAcube Connect MDx -ravistinadapteriin (katso kuva 18, sivu 63).
13. Sulje QIAcube Connect MDx -laitteen suojus (katso kuva 15, sivu 59).
14. Valitse PAXgene Blood RNA Part B -protokolla ja käynnistä se.

Noudata QIAcube Connect MDx -laitteen kosketusnäyttöön tulevia ohjeita.



Tämä ohjelma inkuboi näytteitä 65 °C:ssa ja denaturoi RNA:n myöhempiä sovelluksia varten. Vaikka myöhempi sovellus sisältäisi lämpödenaturointivaiheen, älä jätä tätä vaihetta tekemättä. Riittävä RNA:n denaturointi tässä vaiheessa on tärkeää, jotta myöhemmät sovellukset ovat mahdollisimman tehokkaita.

15. Kun PAXgene Blood RNA Part B -ohjelma on valmis, avaa QIAcube Connect MDx -laitteen suojus (katso kuva 15, sivu 59). Aseta puhdistetun RNA:n sisältävät mikrosentrifugiputket (MCT) välittömästi jäähän.



**VAROITUS:** Kuuma pinta. Ravistin voi lämmetä jopa 70 °C: n lämpötiloihin. Vältä koskemasta sitä, kun se on kuuma.



Älä anna puhdistetun RNA:n jäädä QIAcube Connect MDx -laitteeseen. Koska näytteitä ei ole jäähdytetty, puhdistettu RNA voi hajota. Valvomattomia yöllä tapahtuvia näytteen valmisteluajoja ei tämän vuoksi suositella.

16. Jos RNA-näytteitä ei käytetä välittömästi, säilytä niitä -20 °C:ssa tai -70 °C:ssa. Koska RNA pysyy denaturoituneena toistuvan pakastuksen ja sulatuksen jälkeen, ei ole tarpeen toistaa lämpöinkubointiprotokollaa (PAXgene Blood RNA Part B). Jos RNA-näytteitä käytetään diagnostisessa määrittäyksessä, on noudatettava valmistajan antamia ohjeita.

Tarkkaa RNA:n kvantifiointia varten 260 nm:n absorbanssilla on suositeltavaa laimentaa näytteet 10 mM:n Tris-HCl:llä, pH 7,5.\* Näytteen laimentaminen RNAasittomalla vedellä voi johtaa epätarkan alhaisiin arvoihin.

Nollaa spektrofotometri käyttämällä nollanäytettä, joka on valmistettu samasta määrästä eluutiopuskuria (BR5) ja Tris-HCl-puskuria kuin mitattavissa näytteissä. Eluutiopuskurilla (BR5) on korkea absorbanssi 220 nm, mikä voi johtaa korkeisiin tausta-absorbanssitasoihin, jos spektrofotometriä ei ole asianmukaisesti nollattu.



Tris-HCl-puskurissa kvantifiointiin on käytettävä suhdetta

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ . Katso liite B, sivu 78.

17. Poista reagenssipulloteline QIAcube Connect MDx -työpöydältä (katso kuva 18, sivu 63) ja sulje kaikki pullot asianmukaisesti merkityillä korkeilla. Sulje uudelleen protokollassa käytetystä sarjasta peräisin olevat kaikki puskureita ja RNAasitonta vettä sisältävät pullot, entsyymejä ja entsyymipuskureita sisältävät ampullit ja putket sekä muovimateriaaleja sisältävät pussit. Säilytä sarjan jäljelle jäänyttä sisältöä ja reagenssipulloja kohdissa Reagenssien säilytys ja käsittely (sivu 22) ja Käyttöstabiilius (sivu 22) kuvatusti seuraavaan käyttökertaan asti. Poista ja hävitä QIAcube Connect MDx -laitteen mikrosentrifugiputkien (MCT) aukoissa oleviin käsittelyputkiin (PT) jääneet reagenssit. Poista ja hävitä roottoriadapterit sentrifugista. Tyhjennä QIAcube Connect MDx -laitteen Waste (Jäte)-lokero (katso kuva 15, sivu 59). Sulje laitteen suojus ja katkaise laitteen virta virtakytkimestä.

\* Kun käsittelet kemikaaleja, käytä aina asianmukaista suojavaatetusta, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja on tuotekohtaisissa käyttöturvatiedotteissa (Safety Data Sheet, SDS), joita saa tuotteen toimittajalta.

# Tuotteen käytön rajoitukset

PAXgene Blood RNA Kit -sarja on tarkoitettu solunsisäisen RNA:n eristämiseen ihmisen kokoverestä ( $4,8 \times 10^6$ –  $1,1 \times 10^7$  leukosyyttiä/ml) in vitro -diagnoosiin varten. Sitä ei ole tarkoitettu genomisen DNA:n tai virusten nukleiinihappojen eristämiseen ihmisen kokoverestä. Koska stabilointimäärityksiä varten on validoitu vain muutama transkripti (FOS- ja IL1B-geenitranskriptit), suorituskykyominaisuuksia ei ole määritetty kaikille transkripteille. Käyttäjien on käytävä läpi valmistajan tiedot ja heidän omat tietonsa, kun he määrittävät, onko muiden transkriptien validointi tarpeen. Sarjan komponentit on tarkoitettu käytettäväksi vain käyttöoppaan ja käyttöohjeissa kuvatun automaattisen protokollan mukaisesti.

Katso *PAXgene Blood RNA Tube* -käsikirjasta lisätietoa PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)-putkien käytöstä.

## Laadunvalvonta

QIAGENin ISO-sertifioidun laadunhallintajärjestelmän mukaisesti jokainen PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erä testataan määritettyjen spesifikaatioiden mukaisesti tuotteiden yhdenmukaisen laadun takaamiseksi.

# Suorituskykyominaisuudet

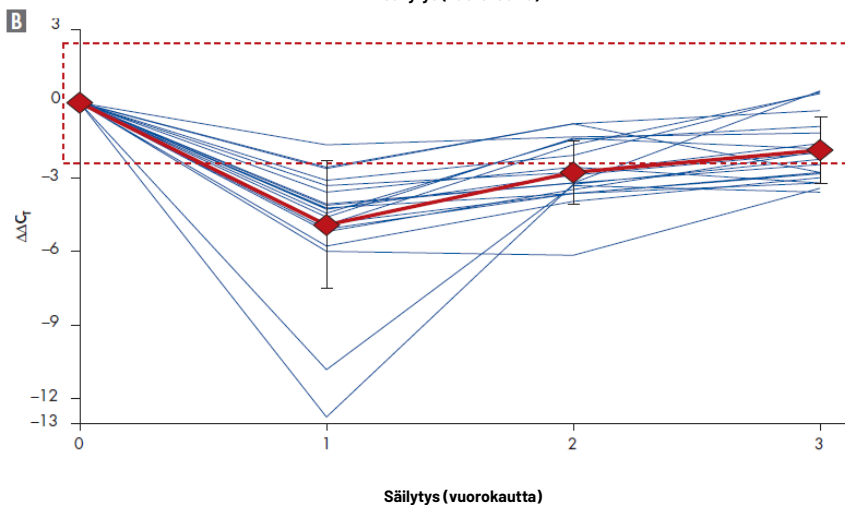
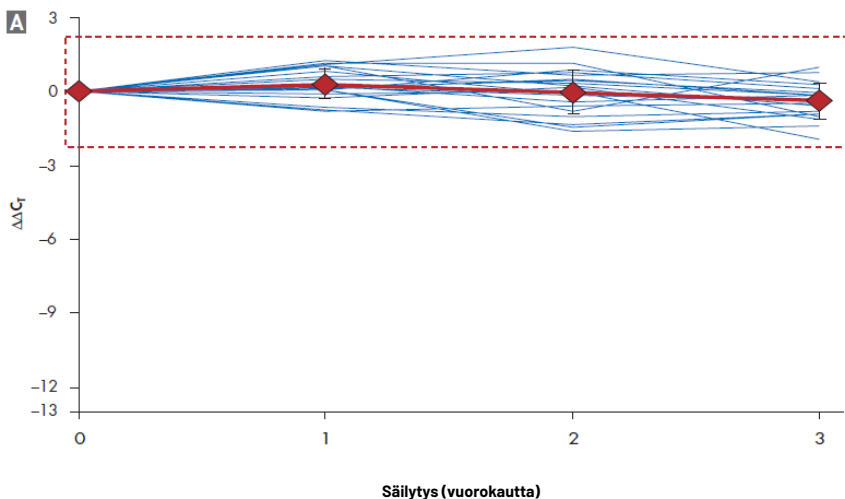
## Näytteen ottaminen ja stabilointi

PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -verinäyteputket sisältävät tekijänoikeudella suojattua RNA:n stabilointireagenssia. Tämä lisäaine suojaa RNA-molekyyliä RNAasin hajottavalta vaikutukselta ja minimoi geeniekspression muutokset ex vivo. PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putket on tarkoitettu ihmisen kokoverinäytteiden ottamiseen ja solun RNA:n stabiloimiseen enintään kolmen (3) vuorokauden ajan 18-25 °C:ssa (kuvat 4 ja 5, sivut 41 ja 42) tai enintään viiden (5) vuorokauden ajan 2-8 °C:ssa (kuvat 6 ja 7, sivut 43 ja 44). Lisäksi stabiloitua verta voi säilyttää pakastettuna. Saatavilla olevat tiedot osoittavat, että solujen RNA pysyy stabiilina vähintään 11 vuotta -20 °C:ssa tai -70 °C:ssa\*. Lisätietoja meneillään olevista tutkimuksista, joissa arvioidaan stabiiliutta pidemmällä ajanjaksoilla, saat osoitteesta [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) tai ottamalla yhteyden QIAGENin tekniseen palveluun.

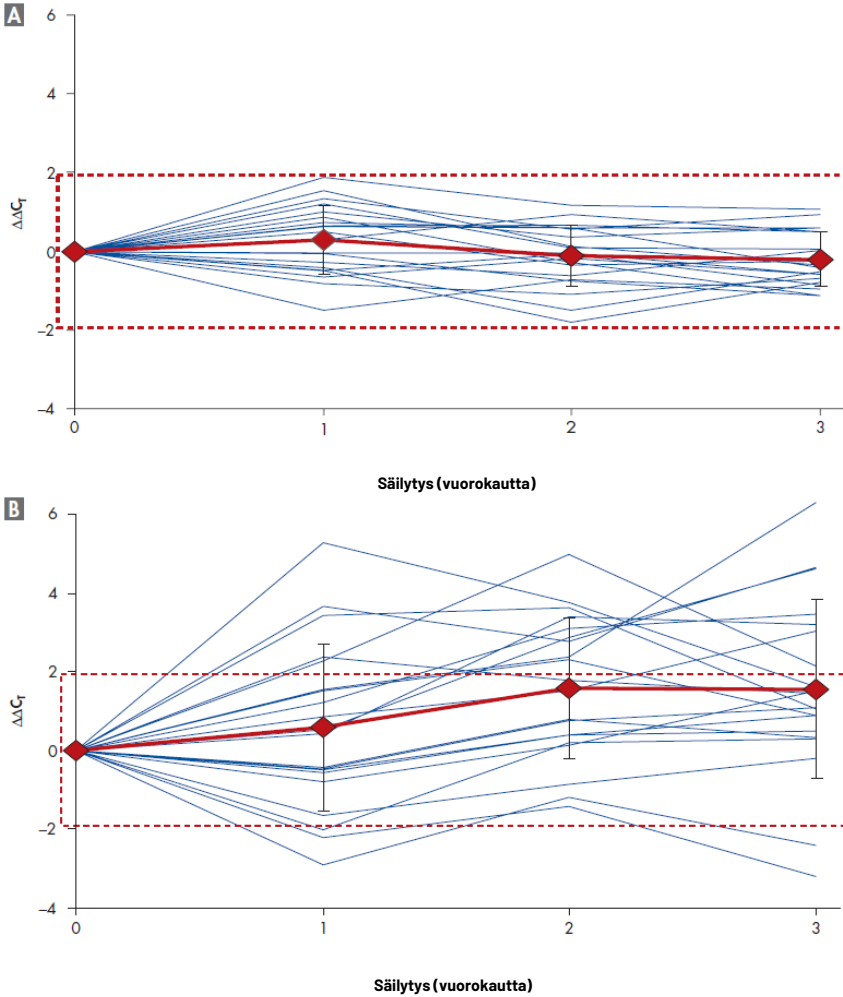
RNA:n stabiiliuden todellinen kesto voi vaihdella solun RNA:n lajin ja käytetyn myöhemmän sovelluksen mukaan. Koska stabilointimäärityksiä varten on validoitu vain muutama transkripti (FOS- ja IL1B-geenitranskriptit), suorituskykyominaisuuksia ei ole määritetty kaikille transkripteille. Käyttäjien on käytävä läpi valmistajan tiedot ja heidän omat tietonsa, kun he määrittävät, onko muiden transkriptien validointi tarpeen.

\* Käynnissä on pitkäkestoinen tutkimus veren säilyttämisestä PAXgene Blood RNA Tube -putkissa.

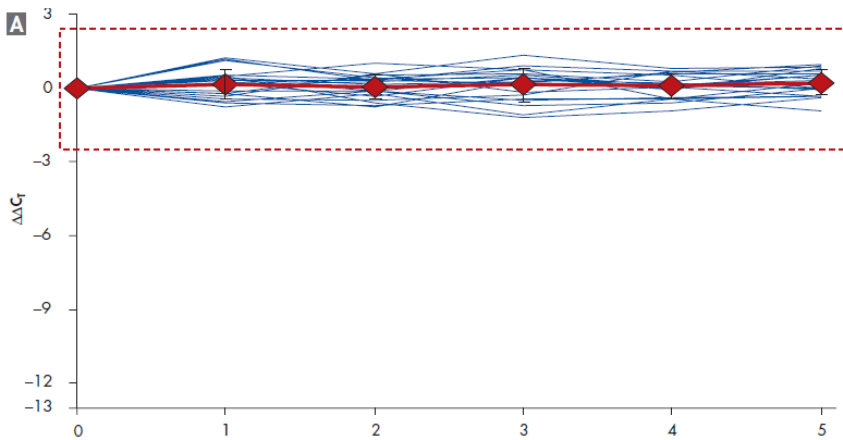




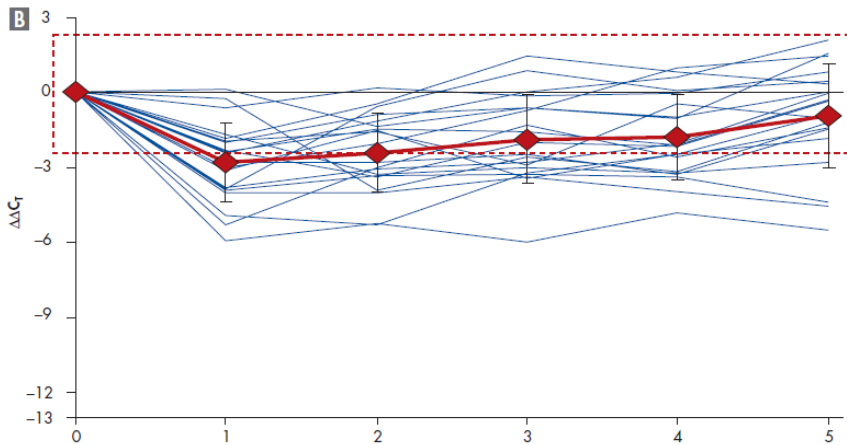
**Kuva 4: RNA:n stabiilius verinäytteissä 18–25 °C:ssa: FOS. Verta otettiin 10 näennäisen terveeltä luovuttajalta tuplanäytteinä, ja sitä säilytettiin 18–25 °C:ssa ilmoitettu määrä päiviä, minkä jälkeen tehtiin kokonais-RNA:n eristys. [A] Verinäytteet otettiin ja säilytettiin PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkissa ja kokonais-RNA puhdistettiin PAXgene Blood RNA Kit -sarjan avulla. [B] Verinäytteet otettiin ja säilytettiin standardeissa verinäyteputkissa, joissa oli EDTA:ta antikoagulanttina, ja kokonais-RNA puhdistettiin käyttämällä standardia orgaanista eristysmenetelmää ja piioksidikalvopohjaista RNA:n puhdistusta. Suhteelliset FOS-transkriptitasot määritettiin reaaliaikaisesti duplex-RT-PCR:llä käyttämällä 18S rRNA:ta sisäisenä standardina. Kaikkien näytteiden arvot on otettu mukaan kaavioon, kuten myös keskiarvot ja keskihajonnat kaikista näytteistä. Katkoviivat osoittavat määrittymisen  $\pm 3\times$  kokonaistarkkuuden (2,34  $C_t$ ).**



**Kuva 5: RNA:n stabiilius verinäytteissä 18–25 °C:ssa: IL1B.** Verinäyte otettiin ja kokonais-RNA puhdistettiin 18–25°C:ssa säilyttämisen jälkeen, kuten kuvassa 4 on kuvattu. IL1B-transkriptin suhteelliset tasot määritettiin reaaliajassa duplex-RT-PCR:llä käyttämällä 18S rRNA:ta sisäisenä standardina. Kaikkien näytteiden arvot on otettu mukaan kaavioon, kuten myös keskiarvot ja keskihajonnat kaikista näytteistä. Katkoviivat osoittavat määrittelyn  $\pm 3\times$  kokonaistarkkuuden (1,93  $C_T$ ).

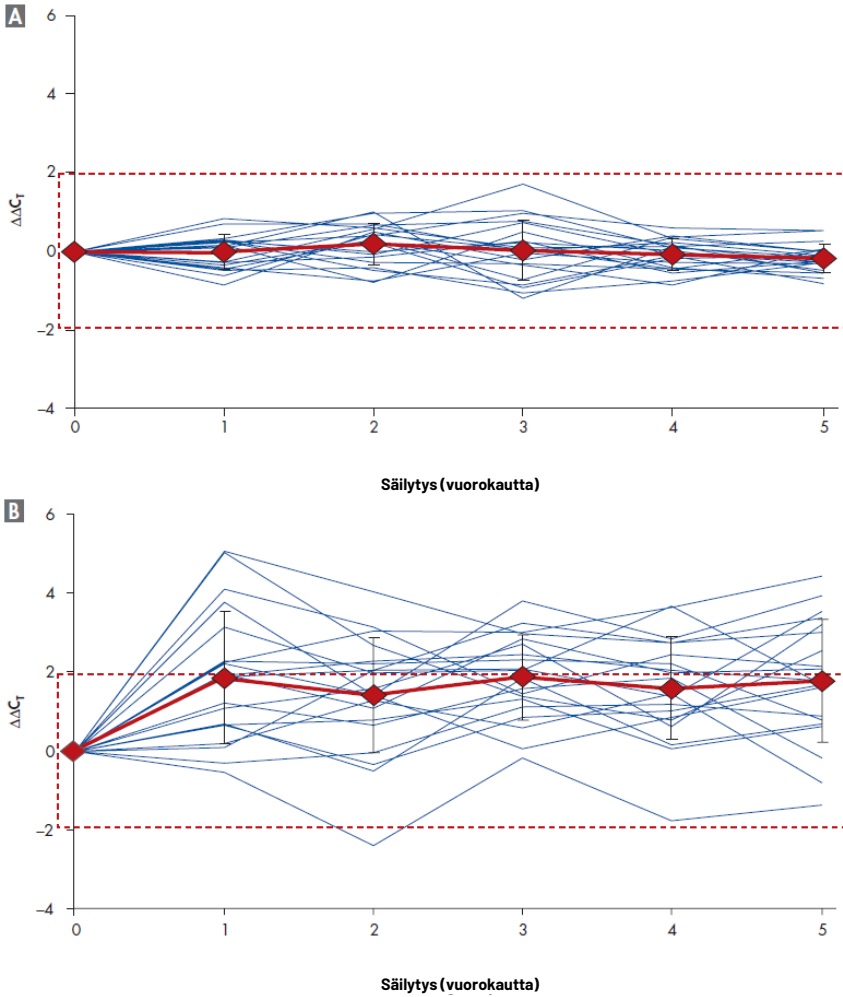


Säilytys (vuorokautta)



Säilytys (vuorokautta)

**Kuva 6: RNA:n stabiilius verinäytteissä 2–8 °C:ssa: FOS.** Verta otettiin 10 luovuttajalta tuplanäytteinä, ja sitä säilytettiin 2–8 °C:ssa ilmoitettu määrä päiviä, minkä jälkeen tehtiin kokonais-RNA:n eristys. **[A]** Verinäytteet otettiin ja säilytettiin PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkissa ja kokonais-RNA puhdistettiin PAXgene Blood RNA Kit -sarjan avulla. **[B]** Verinäytteet otettiin ja säilytettiin standardeissa verinäyteputkissa, joissa oli EDTA:ta antikoagulanttina, ja kokonais-RNA puhdistettiin käyttämällä standardia orgaanista eristysmenetelmää ja piioksidikalvopohjaista RNA:n puhdistusta. Suhteelliset FOS-transkriptitasot määritettiin reaaliaikaisesti duplex-RT-PCR:llä käyttämällä 18S rRNA:ta sisäisenä standardina. Kaikkien näytteiden arvot on otettu mukaan kaavioon, kuten myös keskiarvot ja keskihajonnat kaikista näytteistä. Katkoviivat osoittavat määrittämisen  $\pm 3 \times$  kokonaistarkkuuden ( $2,34 C_T$ ).



**Kuva 7: RNA:n stabiilius verinäytteissä 2–8 °C:ssa: IL1B.** Verinäyte otettiin ja kokonais-RNA puhdistettiin 2–8 °C:ssa säilyttämisen jälkeen, kuten kuvassa 6 on kuvattu. IL1B-transkriptin suhteelliset tasot määritettiin reaaliajassa duplex-RT-PCR:llä käyttämällä 18S rRNA:ta sisäisenä standardina. Kaikkien näytteiden arvot on otettu mukaan kaavioon, kuten myös keskiarvot ja keskihajonnat kaikista näytteistä. Katkoviivat osoittavat määrityksen  $\pm 3\times$  kokonaistarkkuuden (1,93  $C_T$ ).

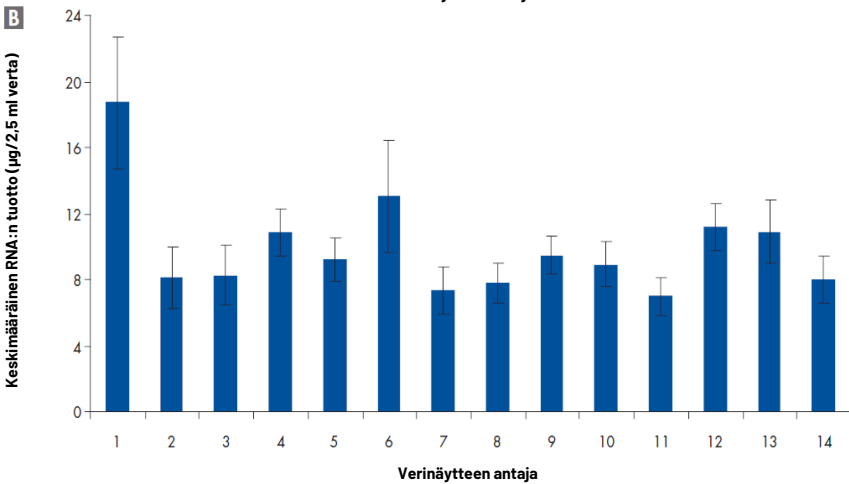
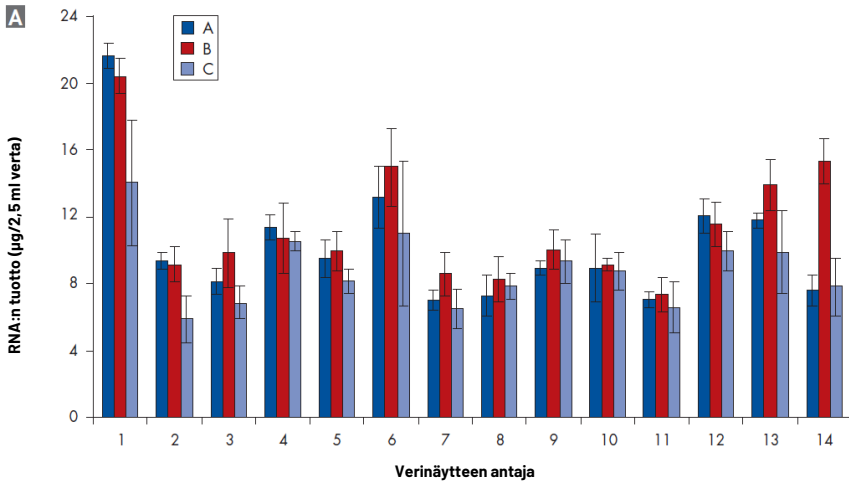
## Manuaalinen RNA:n eristys

PAXgene Blood RNA System -järjestelmällä eristetty kokonais-RNA on puhdasta. Käytettäessä manuaalista protokollaa  $A_{260}/A_{280}$ -arvot ovat välillä 1,8-2,2 ja  $\leq 1\%$ :n (w/w) genomista DNA:ta on läsnä  $\geq 95\%$ :ssa kaikista näytteistä mitattuna beeta-aktiini geenisekvenssin kvantitatiivisella real-time PCR:llä. Vähintään  $95\%$ :ssa näytteistä ei näy inhibitiota RT-PCR:ssä kun eluaatin osuus RT-PCR-reaktiosta on enintään  $30\%$ .

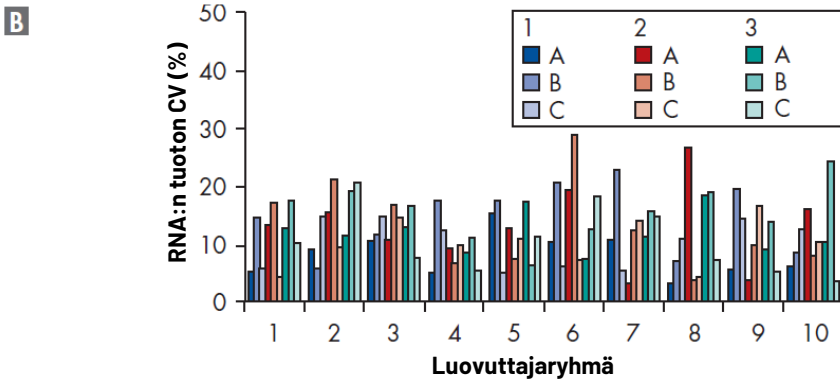
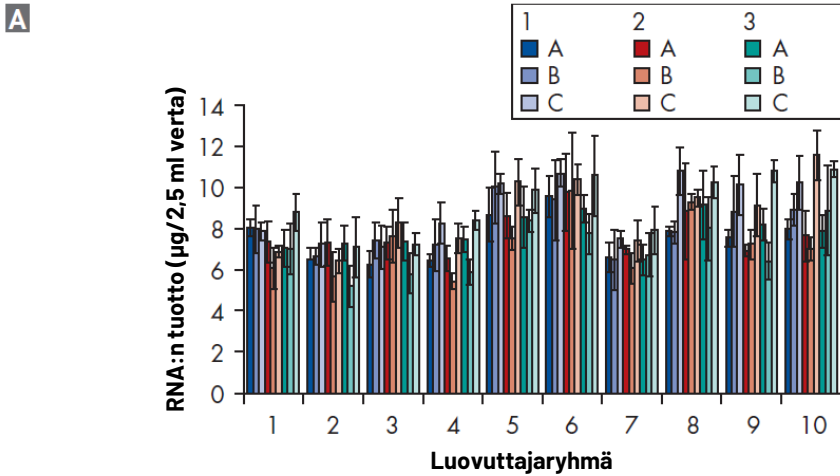
Käytettäessä manuaalista protokollaa näytteen valmistelu-aika (12 näytteen valmisteluajoista kerättyjen tietojen perusteella) on keskimäärin noin 90 minuuttia\*, joista vain 40 minuuttia on ihmisen toimia edellyttävää aikaa. RNA:n tuotto 2,5 ml:sta terveeseen ihmiseen kokoversta on  $\geq 3 \mu\text{g} \geq 95\%$ :ssa käsitellyistä näytteistä. Koska tuotto on näytteen antajasta riippuvaista, yksilölliset tuotot voivat vaihdella. Yksittäisten näytteen antajien osalta PAXgene Blood RNA System -järjestelmä tuottaa erittäin uusittavia ja toistettavia tuottoja (kuvat 8 ja Kuva 9, sivuilla 46 ja 47) ja uusittavia ja toistettavia RT-PCR-tuloksia (kuvat 10 ja 11, sivuilla 52 ja 53), mikä tekee järjestelmästä luotettavan kliinisessä diagnostiikkakäytössä.

Kuva 8 (sivu 46) esittää PAXgene Blood RNA System -järjestelmän yleisen uusittavuuden ja toistettavuuden. Lisätutkimuksilla pyrittiin osoittamaan eri PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erien ja eri käyttäjien vaikutus RNA-tuoton uusittavuuteen ja reaaliaikaisen RT-PCR:n toimintaan. Koska näissä tutkimuksissa käytettiin yhdistettyjä verinäytteitä yksittäisten PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkien sijaan, tulokset eivät osoita järjestelmän toistettavuutta, kuten vaihtelua yksittäisten verinäytteen ottojen välillä, vaan ainoastaan näytteen valmistelun toistettavuuden (katso kuva 9, sivu 47).

\* Protokollan kokonaisaika, mukaan lukien edeltävä PAXgene Blood RNA Tube -putkien käsittely (sentrifugointi, pelletin pesu ja pelletin uudelleensuspensiointi).



**Kuva 8: Uusittava ja toistettava RNA:n eristys.** 14 verinäytteen antajan nelinkertaiset verinäytteet käsitteli manuaalisesti kolme (3) teknikkaa (A, B, C). Käytössä oli kolme laitesarjaa, ja kaikki saman tekniikan valmistelemat näytteet käsiteltiin samalla laitteella. [A] RNA:n tuoton keskiarvot ja keskihajonnat näyttereplikaattia kohti esitetään samoilta luovuttajilta ja eri tekniikoilta. [B] Kolme (3) teknikkaa käsitteli 12 verinäyttereplikaattia kultakin 14 luovuttajalta. RNA:n tuoton keskiarvot ja keskihajonnat näytettä kohti esitetään samoilta luovuttajilta ja kaikilta tekniikoilta. Kaikkien RNA-näytteiden osalta  $A_{260}/A_{280}$ -suhteet olivat välillä 1,8–2,2.



**Kuva 9:** RNA:n tuoton uusittavuus ja toistettavuus eri käyttäjien PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erien osalta käytettäessä yhdistettyjä verinäytteitä. 30 eri luovuttajan verinäytteet kerättiin PAXgene Blood RNA Tube (BRT)-putkiin (12 putkea per luovuttaja, yhteensä 360 putkea). Kolmen (3) luovuttajan putkien sisältö yhdistettiin ja sen jälkeen ne jaettiin 36 näytteeksi. Nämä 36 näytettä kolmen luovuttajan sarjasta käsiteltiin manuaalisesti kolmen (3) eri käyttäjän toimesta. Kuten käyttäjä käytti kolmea (3) eri PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erää eristämässä ja käsittelemässä nelinkertaiset näytteet kustakin 10 näyteryhmästä. **[A]** RNA:n tuotto ja keskihajonta jokaisen käyttäjä-erä-yhdistelmän osalta. Kolme (3) eri käyttäjää (A, B, C) käsittelevät nelinkertaiset verinäytteet 10 luovuttajaryhmältä kullakin kolmella sarjan erällä (1, 2, 3). Keskimääräiset tuotot (pylväät) ja keskihajonnat (virhepalkit) nelinkertaista näytettä kohti esitetään samasta luovuttajaryhmästä eri käyttäjiä ja sarjan eri eriiä kohti. **[B]** RNA:n tuoton CV luovuttajaryhmää kohti kaikkien käyttäjä-erä-yhdistelmien (A, B, C; 1, 2, 3) osalta laskettuna keskimääräisestä tuotosta ja tuoton keskihajonnasta on esitetty kuvassa 9A.

Taulukko 1A: Uusittavuus erän sisällä ja käyttäjäkohtaisesti valittujen luovuttajaryhmien osalta (1, 6, 9, 10)

Tietojen yhdistys	Luovuttajaryhmä 1 ( $5,1 \times 10^6$ solua/ml)			Luovuttajaryhmä 6 ( $6,5 \times 10^6$ solua/ml)		
	Keskimääräinen tuotto ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Keskimääräinen tuotto ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Erä 1, käyttäjä A	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
Erä 1, käyttäjä B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
Erä 1, käyttäjä C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
Erä 2, käyttäjä A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
Erä 2, käyttäjä B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
Erä 2, käyttäjä C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
Erä 3, käyttäjä A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
Erä 3, käyttäjä B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
Erä 3, käyttäjä C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
	Luovuttajaryhmä 9 ( $8,4 \times 10^6$ solua/ml)			Luovuttajaryhmä 10 ( $10,2 \times 10^6$ solua/ml)		
	Keskimääräinen tuotto ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Keskimääräinen tuotto ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Erä 1, käyttäjä A	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
Erä 1, käyttäjä B	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Erä 1, käyttäjä C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Erä 2, käyttäjä A	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Erä 2, käyttäjä B	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Erä 2, käyttäjä C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Erä 3, käyttäjä A	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Erä 3, käyttäjä B	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Erä 3, käyttäjä C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3



Taulukko 1B: Käyttäjakohtainen ja kaikkien erien välinen uusittavuus valittujen luovuttajaryhmien osalta (1, 6, 9, 10).

Tietojen yhdistys	Luovuttajaryhmä 1 ( $5,1 \times 10^6$ solua/ml)			Luovuttajaryhmä 6 ( $6,5 \times 10^6$ solua/ml)		
	Keskimääräinen tuotto ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Keskimääräinen tuotto ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Käyttäjä A, kaikki erät	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Käyttäjä B, kaikki erät	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Käyttäjä C, kaikki erät	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
	Luovuttajaryhmä 9 ( $8,4 \times 10^6$ solua/ml)			Luovuttajaryhmä 10 ( $10,2 \times 10^6$ solua/ml)		
	Keskimääräinen tuotto ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Keskimääräinen tuotto ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Käyttäjä A, kaikki erät	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Käyttäjä B, kaikki erät	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Käyttäjä C, kaikki erät	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

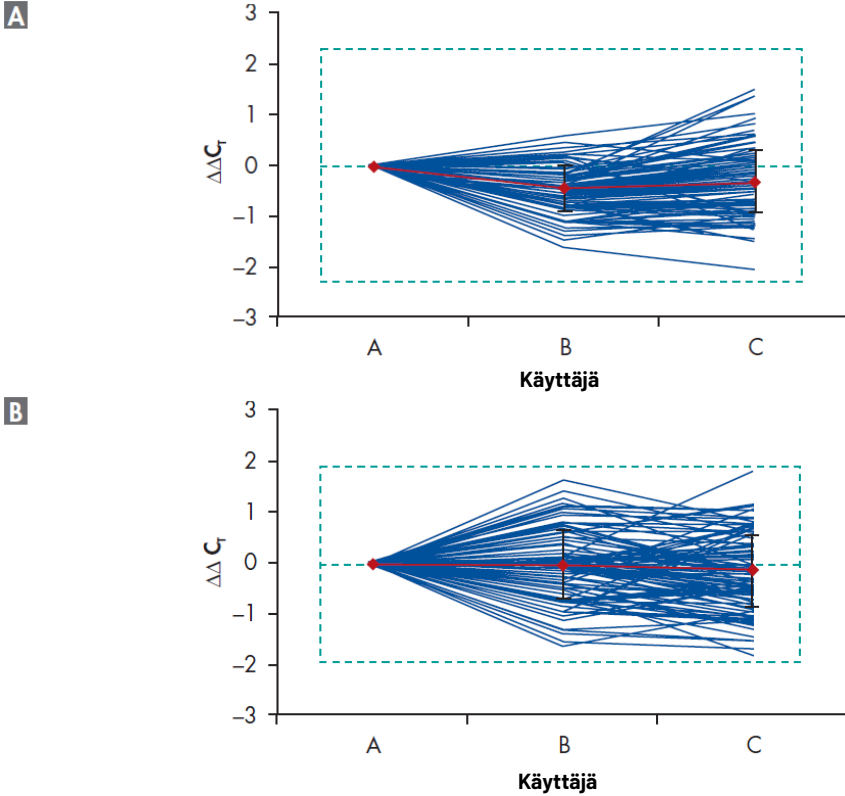
Taulukko 1C: Erän sisäinen ja kaikkien käyttäjien välinen uusittavuus valittujen luovuttajaryhmien osalta (1, 6, 9, 10).

Tietojen yhdistys	Luovuttajaryhmä 1 ( $5,1 \times 10^6$ solua/ml)			Luovuttajaryhmä 6 ( $6,5 \times 10^6$ solua/ml)		
	Keskimääräinen tuotto ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Keskimääräinen tuotto ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Erä 1, kaikki käyttäjät	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Erä 2, kaikki käyttäjät	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Erä 3, kaikki käyttäjät	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
	Luovuttajaryhmä 9 ( $8,4 \times 10^6$ solua/ml)			Luovuttajaryhmä 10 ( $10,2 \times 10^6$ solua/ml)		
	Keskimääräinen tuotto ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Keskimääräinen tuotto ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Erä 1, kaikki käyttäjät	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Erä 2, kaikki käyttäjät	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Erä 3, kaikki käyttäjät	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

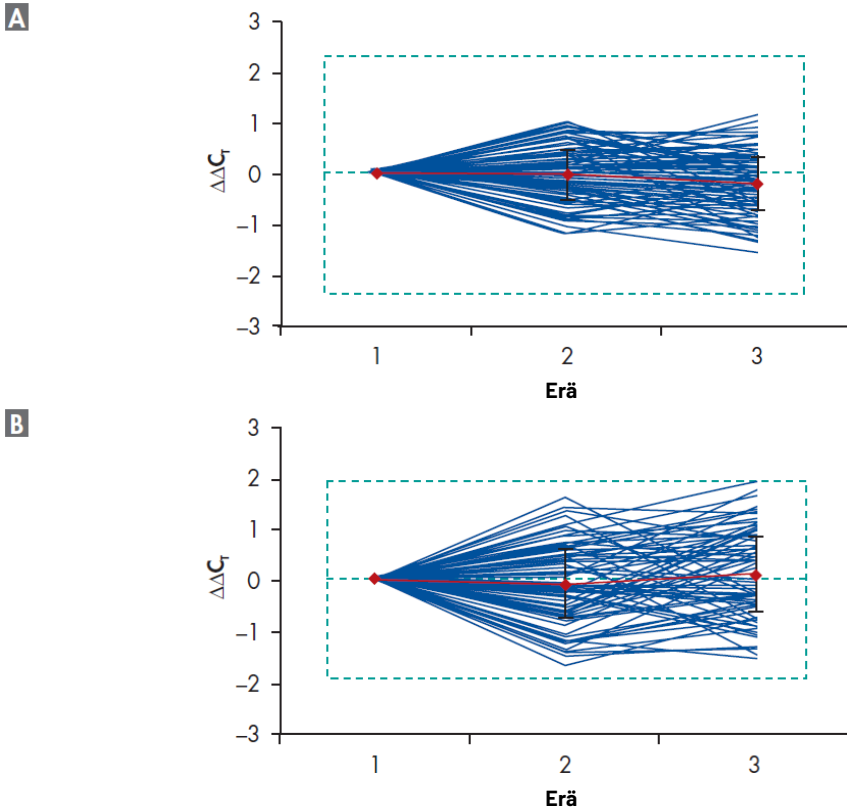
Taulukko 1D: Kaikkien erien ja kaikkien käyttäjien välinen uusittavuus valittujen luovuttajaryhmien osalta (1, 6, 9, 10).

Tietojen yhdistys	Luovuttajaryhmä 1 ( $5,1 \times 10^6$ solua/ml)			Luovuttajaryhmä 6 ( $6,5 \times 10^6$ solua/ml)		
	Keskimääräinen tuotto ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Keskimääräinen tuotto ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Erä 1, kaikki käyttäjät	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
	Luovuttajaryhmä 9 ( $8,4 \times 10^6$ solua/ml)			Luovuttajaryhmä 10 ( $10,2 \times 10^6$ solua/ml)		
	Keskimääräinen tuotto ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Keskimääräinen tuotto ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Erä 1, kaikki käyttäjät	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Tarkempi analyysi neljästä (4) edustavasta luovuttajaryhmästä. Ryhmät valittiin valkosolumäärän mukaan, ja ne heijastavat valkosolumäärän normaalin vaihteluvälin ylä-, keski- ja ala-arvoja ( $4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$  leukosyyttiä/ml). Valkosolumäärä edustaa kolmen (3) valkosolumäärän keskiarvoa kolmelta luovuttajalta per luovuttajaryhmä.



**Kuva 10: RT-PCR:n uusittavuus – käyttäjien välillä.** Kuvassa 9 kuvatussa kokeessa puhdistettua RNA:ta käytettiin reaaliaikaisessa RT-PCR:ssä. **[A]** FOS:n ja **[B]** IL1B:n suhteelliset transkriptitasot määritettiin reaaliaikaisella duplex-RT-PCR:llä käyttämällä 18S rRNA:ta sisäisenä standardina. Kaikkien näytteiden arvot on otettu mukaan kaavioon suhteessa käyttäjän A arvoihin (10 luovuttajaryhmää × 3 sarjan erää × 4 replikaattia = 120 tietojoukkoa kustakin geenistä), samoin kuin keskiarvot (punaiset viivat) ja keskihajonnat (mustat palkit) kaikista näytteistä. Katkoviivat osoittavat määrittymisen ±3x kokonaistarkkuuden (FOS: 2,34 C<sub>T</sub>; IL1B: 1,93 C<sub>T</sub>).



**Kuva 11: RT-PCR:n uusittavuus – sarjan erien välillä.** Kuvassa 9 kuvatussa kokeessa puhdistettua RNA:ta käytettiin reaaliaikaisessa RT-PCR:ssä. **[A]** FOS:n ja **[B]** IL1B:n suhteelliset transkriptitasot määritettiin reaaliaikaisella duplex-RT-PCR:llä käyttämällä 18S rRNA:ta sisäisenä standardina. Kaikkien näytteiden arvot on otettu mukaan kaavioon suhteessa sarjan erän 1 arvoihin (10 luovuttajaryhmää  $\times$  3 käyttäjää  $\times$  4 replikaattia = 120 tietojoukkoa kustakin geenistä), samoin kuin keskiarvot (punaiset viivat) ja keskihajonnat (mustat palkit) kaikista näytteistä. Katkoviivat osoittavat määrittymisen  $\pm 3x$  kokonaistarkkuuden (FOS: 2,34  $C_T$ ; IL1B: 1,93  $C_T$ ).

Taulukko 2: Yhteenvedo kuvien 10 ja 11 RT-PCR-tiedoista

Testijärjestelmä	FOS/18S rRNA -määritys		IL1B/18S rRNA -määritys	
Tietojen vertailu	Keskiarvo ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SD ( $\Delta\Delta C_T$ )	Keskiarvo ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SD ( $\Delta\Delta C_T$ )
<b>Käyttäjakohtainen ja kaikkien erien välinen uusittavuus</b>				
Kaikki käyttäjät, erä 1 – erä 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Kaikki käyttäjät, erä 1 – erä 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Kaikki käyttäjät, erä 1 – erä 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
<b>Käyttäjakohtainen ja kaikkien erien välinen uusittavuus</b>				
Kaikki erät, käyttäjä A – käyttäjä A	0,00	0,00	0,00	0,00
Kaikki erät, käyttäjä A – käyttäjä B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Kaikki erät, käyttäjä A – käyttäjä C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Käyttäjä: Teknikko, teki tutkimuksen.

Erä: Tässä tutkimuksessa käytetyn sarjan erän numero.

SD: Keskihajonta.

$\Delta\Delta C_T$ -keskiarvot (N = 120) ja keskihajonnat on esitetty kuvissa 10 ja 11 esitetystä tiedoista.

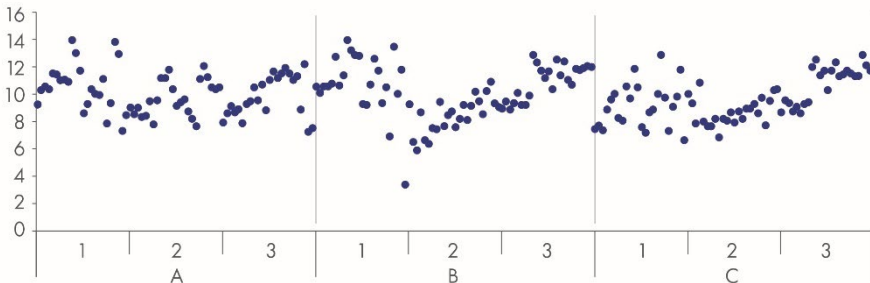
## Automaattinen RNA:n eristäminen

RNA:n tuotto 2,5 ml:sta terveeseen ihmisen kokoverta on  $\geq 3 \mu\text{g} \geq 95 \%$ :ssa käsitellyistä näytteistä. Kuva 12Kuvassa (sivu 55) on esitetty RNA:n tuotot yhteensä 216 näytteestä, jotka on valmisteltu automaattisella protokollalla käyttämällä kolmea (3) sarjan erää ja kolmea (3) käyttäjää. Koska näissä tutkimuksissa käytettiin yhdistettyjä verinäytteitä eikä yksittäisiä PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkia, tulokset eivät heijasta yksittäisten verinäytteiden osalta odotettua RNA-tuottoa. Koska tuotto on näytteen antajasta riippuvaista, yksilölliset tuotot voivat vaihdella (kuva 12, sivu 55).

Vähintään 95 %:ssa näytteistä ei näy inhibitiota RT-PCR:ssä kun eluaatin osuus RT-PCR-reaktiosta on enintään 30 %. Käytettäessä automaattista protokollaa, näytteiden välistä ristikontaminaatiota ei havaita mitattuna ABL1- ja FOS-transkriptisekvenssien kvantitatiivisella reaaliaikaisella RT-PCR:llä RNA-negatiivisista näytteistä (vesi), jotka on paritettu RNA-positiivisten näytteiden (ihmisen kokoveri) kanssa samassa ajossa.

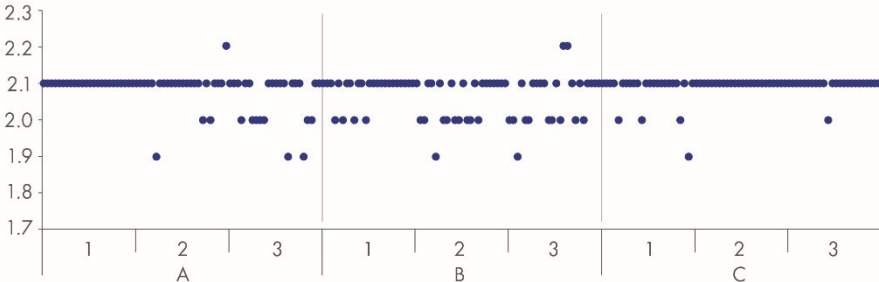
PAXgene Blood RNA System -järjestelmällä ja automaattisella protokollalla eristetty RNA on puhdasta, minkä osoittavat RT-PCR:n inhibition puute ja  $A_{260}/A_{280}$ -arvot välillä 1,8–2,2. Genomista DNA:ta on läsnä  $\leq 1\%$  (w/w)  $\geq 95\%$ :ssa kaikista näytteistä mitattuna beeta-aktiini geenisekvenssin kvantitatiivisella real-time PCR:llä. Kuvissa 13 ja kuva 14 (sivu 56) on esitetty  $A_{260}/A_{280}$ -arvot ja suhteellinen genomisen DNA yhteensä 216 näytteestä, jotka valmisteltiin automaattisella protokollalla käyttämällä kolmea (3) sarjan erää ja kolmea (3) käyttäjää.

RNA:n tuotto ( $\mu\text{g}/2,5\text{ ml}$  verta) QIAcube Connect MDx



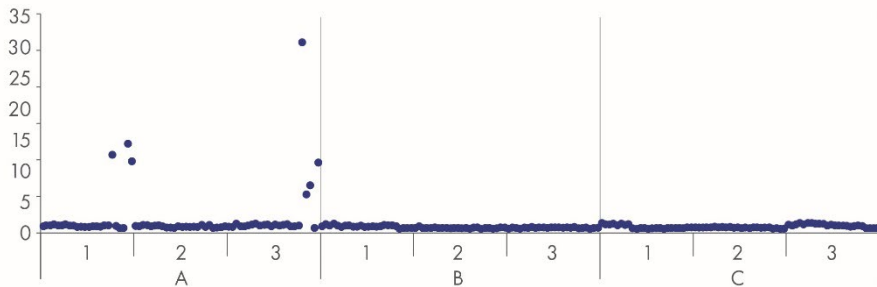
**Kuva 12: RNA:n tuotto – automaattinen käsittely QIAcube Connect MDx -laitteella** Yksittäisten luovuttajien verinäytteet otettiin PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) -näyteputkiin. Putkien sisältö yhdistettiin kuuteen luovuttajaryhmään ja sen jälkeen siitä otettiin uusi alikvootti. Yhteensä 216 näyteputkea (ts. 36 per ryhmä) käsiteltiin kolmen (3) eri käyttäjän (A, B, C) toimesta. Kukin käyttäjä käytti kolmea (3) eri PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erää (1, 2, 3) automaattisessa eristämässä useilla QIAcube Connect MDx -laitteilla ja käsitelti nelinkertaiset näytteet kustakin 6 luovuttajaryhmästä. Kaikkien yksittäisten näytteiden RNA:n tuotot on esitetty jokaisen käyttäjä-erä-yhdistelmän osalta.

RNA:n puhtaus ( $A_{260}/A_{280}$ ) QIAcube Connect MDx



**Kuva 13: RNA:n puhtaus ( $A_{260}/A_{280}$ -arvot) – automaattinen käsittely QIAcube Connect MDx -laitteella** Kuvassa 12 kuvatussa kokeessa kolme (3) eri käyttäjää (A, B, C) puhdisti RNA:n käyttämällä kolmea eri PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erää (1, 2, 3) ja QIAcube Connect MDx -laitetta. Kaikkien yksittäisten näytteiden  $A_{260}/A_{280}$ -arvot on esitetty jokaisen käyttäjä-erä-yhdistelmän osalta.

Genominen DNA (w/w) [%] QIAcube Connect MDx



**Kuva 14: RNA:n puhtaus (% genomisen DNA:n kontaminaatio) – automaattinen käsittely QIAcube Connect MDx -laitteella.** Kuvassa 12 kuvatussa kokeessa kolme (3) eri käyttäjää (A, B, C) puhdisti RNA:n käyttämällä kolmea eri PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erää (1, 2, 3) ja QIAcube Connect MDx -laitetta. Kaikkien yksittäisten näytteiden genomisen DNA:n määrä (w/w) on esitetty jokaisen käyttäjä-erä-yhdistelmän osalta.

RNA:n eristyksen automaattinen protokolla PAXgene Blood RNA System -järjestelmällä tuottaa erittäin uusittavia ja toistettavia RT-PCR-tuloksia, mikä tekee siitä erittäin hyvän kliiniseen diagnostiikkaan.



## Eristetyn RNA:n stabiilius

Verellä täytetyistä PAXgene Blood RNA Tube -putkista PAXgene Blood RNA Kit -sarjalla eristetyt RNA-näytteet ovat stabiileja 5 vuotta säilytettynä  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa ja 7 vuotta säilytettynä  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa (tutkimusten päätepiste).

# Tärkeitä ilmoituksia

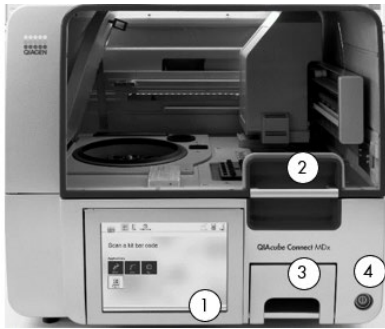
## QIAcube Connect MDx -laitteen käyttäminen

Varmista, että tiedät, miten QIAcube Connect MDx -laitetta käytetään. Lue laitteen käyttöopas ja laitteen mukana tulleet lisätiedot ja kiinnitä erityistä huomiota turvallisuustietoihin, ennen kuin aloitat automaattisen PAXgene Blood RNA -protokollan.

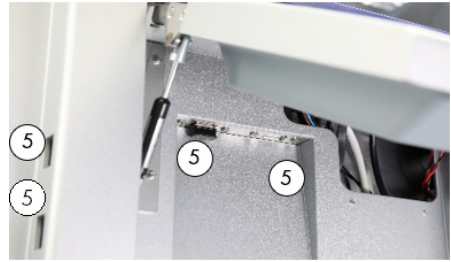
## QIAcube Connect MDx -järjestelmän käynnistäminen

Sulje QIAcube Connect MDx -laitteen suojus ja kytke laitteeseen virta virtakytkimestä (katso kuva 15, sivu 59).

Äänimerkki kuuluu ja käynnistysnäyttö tulee näkyviin. Laite tekee käynnistykseen liittyvät testit automaattisesti.



QIAcube Connect MDx -laite edestä



Ulos vedetty kosketusnäyttö



QIAcube Connect MDx -laite takaa (vasen puoli)



QIAcube Connect MDx -laite takaa (oikea puoli)

Kuva 15: QIAcube Connect MDx -laitteen ulkoiset ominaisuudet.

- |   |   |
|---|---|
| <p>① Kosketusnäyttö</p> <p>② Suojus</p> <p>③ Waste (Jäte)-lokero</p> <p>④ Virtakytkin</p> | <p>⑤ 2 USB-porttia kosketusnäytön vasemmalla puolella; 2 USB-porttia kosketusnäytön takana (Wi-Fi-moduuli kytketty yhteen USB-porttiin)</p> <p>⑥ RJ-45 Ethernet-portti</p> <p>⑦ Virtajohdon liitäntä</p> <p>⑧ Tuuletusaukko</p> |
|---|---|

## Kosketusnäyttö

QIAcube Connect MDx -laitetta ohjataan kosketusnäytöllä. Kosketusnäytön avulla käyttäjä voi käyttää laitetta, ja laite ohjaa käyttäjää työpöydän valmistelussa. Näytteen käsittelyn aikana kosketusnäytössä näkyy protokollan tila ja jäljellä oleva aika.



Kuva 16: QIAcube Connect MDx -laitteen ulosvedetty kosketusnäyttö.

## Protokollien asentaminen QIAcube Connect MDx -laitteeseen

Protokollan alkuasennus voi olla tarpeen, ennen kuin ensimmäinen RNA:n valmisteluajo voidaan tehdä QIAcube Connect MDx -laitteella. Asenna sekä PAXgene Blood RNA Part A- että PAXgene Blood RNA Part B -protokollat.

QIAcube Connect MDx -laitteen protokollat ovat osoitteessa [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Ne on ladattava laitteen mukana toimitetulle USB-muistitikulle. Nämä protokollat siirretään laitteeseen USB-portin kautta.

Kosketusnäytön sivussa oleva USB-portti (katso kuva 15, sivu 59) mahdollistaa USB-muistitikun liittämisen QIAcube Connect MDx -laitteeseen (USB-muistitikku tulee QIAcube-laitteen mukana). Datatiedostot, kuten lokitiedostot tai raporttiedostot, voidaan myös siirtää USB-portin kautta laitteesta USB-muistitikulle.



USB-portti on tarkoitettu käytettäväksi vain QIAGENin toimittaman USB-muistitikun kanssa. Älä liitä muita laitteita tähän porttiin.



Älä irrota USB-muistitikua, kun lataat protokollia tai siirät datatiedostoja tai kun protokolla-ajo on kesken.

Lisätietoja protokollien lataamisesta QIAcube Connect MDx -laitteisiin on käytettävän laitteen käsikirjassa.

## QIAcube Connect MDx -laitteen täyttäminen

Ajan säästämiseksi täyttäminen voidaan tehdä toisen tai molempien 10 minuutin sentrifugointivaiheen (vaiheet 3 ja 5) aikana. Katso Protokolla: Automaattinen kokonais-RNA:n eristys ihmisen kokoverestä, joka on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT)-putkiin, sivu 32.

### Reagenssipullot

Ennen jokaista QIAcube Connect MDx -laitteen ajoa laitteen neljä (4) reagenssipulloa on täytettävä huolellisesti taulukossa 3 (sivu 62) luetelluilla reagensseilla osoitettuun enimmäistasoon asti tai, jos se ei ole mahdollista, PAXgene Blood RNA Kit -sarjan puskurimäärien sallimaan tasoon. Merkitse pulloihin ja korkkeihin selkeästi puskureiden nimet ja aseta täytetyt reagenssipullot reagenssipullotelineen asianmukaisiin paikkoihin. Aseta teline laitteen työpöydälle kuvan mukaisesti (kuvat 17 ja 18, sivut 62 ja 63).



Buffer BR2 -puskurin toimitettu määrä ei täytä reagenssipulloa osoitettuun tasoon asti. Buffer BR3- ja Buffer BR4 -puskurit eivät ehkä täytä pulloa osoitettuun tasoon asti, kun useita näytteitä on käsitelty edellisissä ajoissa.



Muista poistaa pullojen korkit, ennen kuin asetat ne työpöydälle.



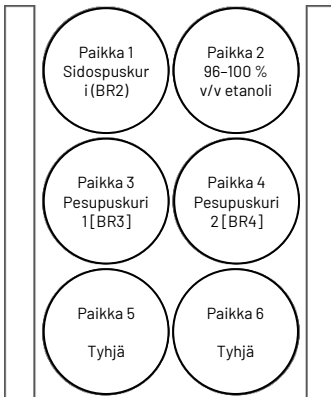
PAXgene Blood RNA Kit -sarjan mukana tulevat puskurimäärät (50) riittävät enintään seitsemään (7) RNA-valmisteluajoon QIacube Connect MDX -laitteessa, jolloin näytteitä on 2-12 per ajo. Yleisesti ottaen ajoja, joissa on vähemmän näytteitä ajoa kohden, on vältettävä, jotta sarjalla voi käsitellä yhteensä 50 näytettä. Jos RNA-valmisteluajoja tehdään enemmän kuin 7, puskurimäärä ei ehkä riitä viimeisten näytteiden käsittelyyn.

**Taulukko 3: Sijainnit reagenssipullotelineessä**

Paikka	Reagenssi
1	Sidospuskuri (BR2)
2	Etanolia (96-100 % v/v)
3	Pesupuskuri 1 [BR3]
4	Pesupuskuri 2 [BR4]*
5	–(jätä tyhjäksi)
6	–(jätä tyhjäksi)

\* Pesupuskuri 2 (BR4) toimitetaan konsentraattina. Lisää ennen ensimmäistä käyttökertaa 4 tilavuutta etanolia (96-100 % v/v, puhtausluokkaa p.a.) pullon merkintöjen mukaan työskentelyliuosta varten.

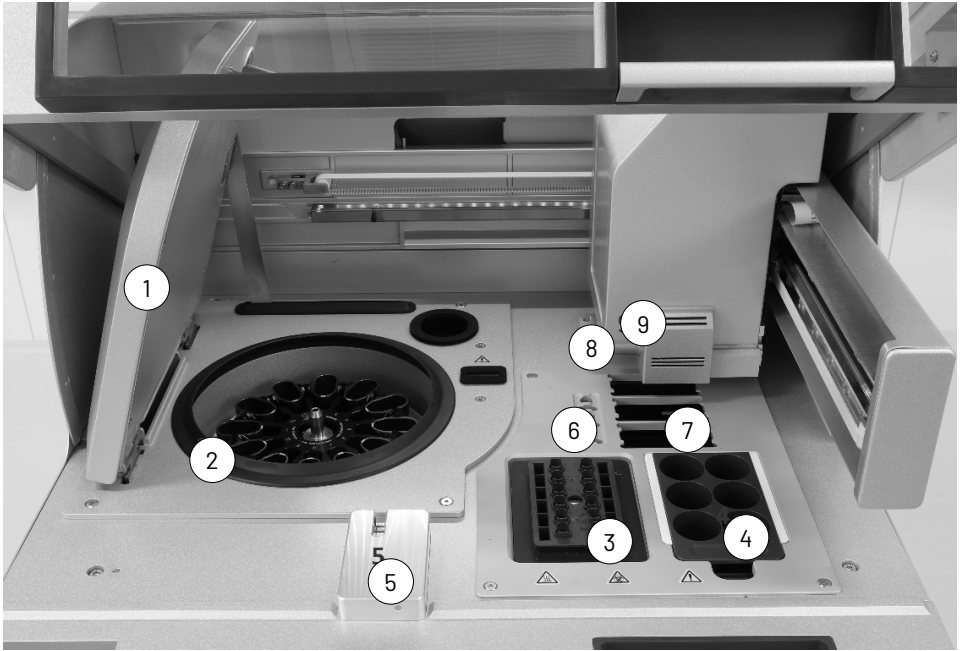
**A**



**B**



**Kuva 17: Reagenssipullotelineen asettaminen. [A]** Kaaviokuva pullojen sijainneista ja sisällöistä reagenssipullotelineessä. **[B]** Telineen asettaminen QIacube Connect MDX -laitteeseen.



Kuva 18: QIAcube Connect MDx sisältä.

- |   |                                  |   |  |
|---|----------------------------------|---|--|
| ① | Sentrifugin kansi                | ⑥ | Mikrosentrifugiputkien aukot   |
| ② | Sentrifugi                       | ⑦ | 3 paikkaa kärkitelineille  |
| ③ | Ravistin                         | ⑧ | Hävitysaukot kärjille ja putkille  |
| ④ | Reagenssipulloteline             | ⑨ | Robottivarsi (sisältää 1 kanavapipetin, tartuntalaitteen, ultraäänianturin, optisen anturin ja UV-merkkivalon) |
| ⑤ | Kärkianturi ja suojuksen lukitus |   |  |

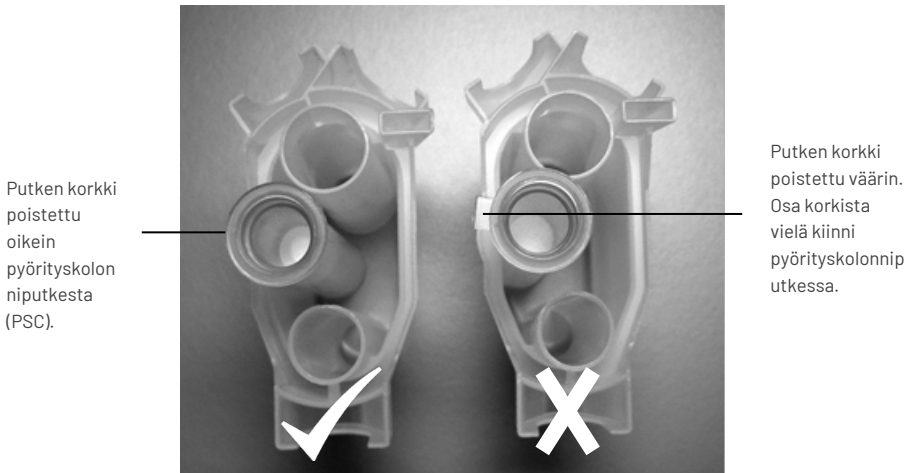
## Pyörityskolonnit (PSC, PRC), mikrosentrifugiputki ja QIAcube Connect MDx -laitteen muovitarvikkeet

Aseta kaksi (2) kärkitelinettä, joissa on 1 000 µl:n suodatinkärkiä, QIAcube Connect MDx -laitteeseen (katso kuva 18, sivu 63). Täytä telineisiin kärjet tarvittaessa.

**i** Käytä vain 1 000 µl:n suodatinkärkiä, jotka on tarkoitettu käytettäväksi QIAcube Connect MDx -laitteen kanssa.

Merkitse kaikkien näytteiden roottoriadapterit ja mikrosentrifugiputket tussilla. Avaa käytettävät pyörityskolonniputket (PSC) ja leikkaa niiden korkit kokonaan pois saksilla (katso kuva 19).

**i** Jotta QIAcube Connect MDx -laitteen robottitartuntalaite toimii oikein, poista kokonaan (leikkaa) korkit ja kaikki muoviosat, jotka liittävät korkin pyörityskolonniputkeen (PSC) (katso kuva 19). Muuten robottitartuntalaite ei pysty tarttumaan pyörityskolonniputkiin (PRC) kunnolla.



**Kuva 19: Pyörityskolonniputken asettaminen.** Pyörityskolonniputki (PSC) asetetaan roottoriadapterin keskipaikkaan. Leikkaa korkki pois ennen pyörityskolonniputken (PSC) asettamista.



Aseta pyörityskolonniputki (PSC, ilman korkkia, katso kuva 19, sivu 64), pyörityskolonniputki (PRC) ja merkitty mikrosentrifugiputki (MCT) asianmukaisesti paikkoihin kuhunkin merkittyyyn roottoriin adapteriin taulukon 4 ja kuvan 20 mukaisesti.

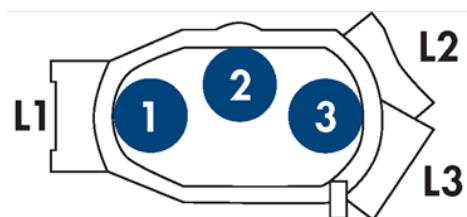


Varmista, että pyörityskolonniputken (PRC) ja mikrosentrifugiputken (MCT) korkit on painettu kokonaan aukkojen pohjalle roottoriadapterin reunalla, koska muutoin korkit irtoavat sentrifugoinnin aikana.

**Taulukko 4: Muovitarvikkeet roottoriadapterissa**

Paikka	Reagenssi	Korkin paikka
1	PAXgene RNA -pyörityskolonniputki (punainen, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder spin column -putki (violetti, PSC)(leikkaa korkki pois ennen roottoriadapteriin asettamista)	-
3	MCT*	L3

\* Käytä PAXgene Blood RNA Kit -sarjan sisältämiä mikrosentrifugiputkia (1,5 ml).



**Kuva 20: Paikat roottoriadapterissa.** Roottoriadapterissa on 3 putken paikkaa (1-3) ja kolme korkin paikkaa (L1-L3).

## Sentrifugin täyttäminen

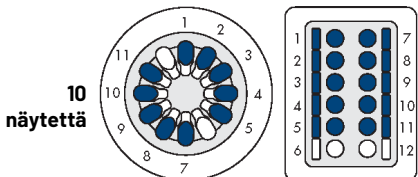
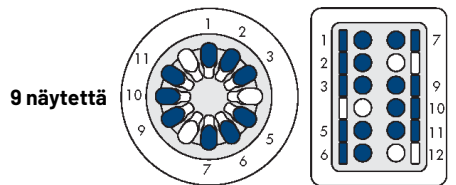
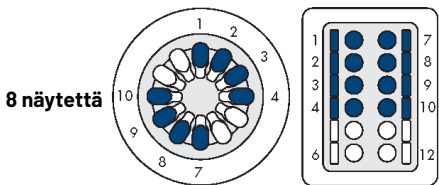
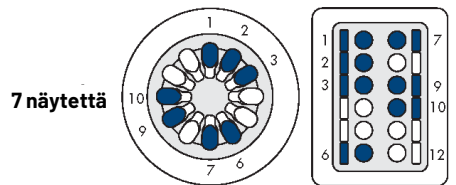
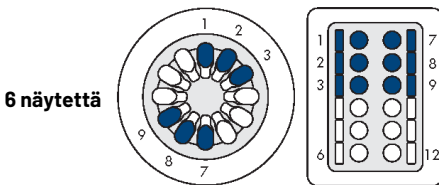
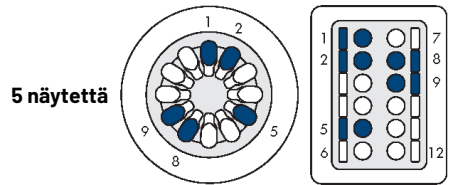
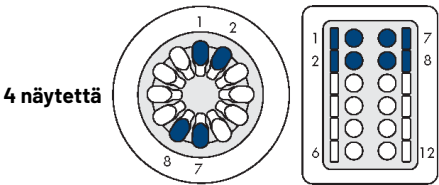
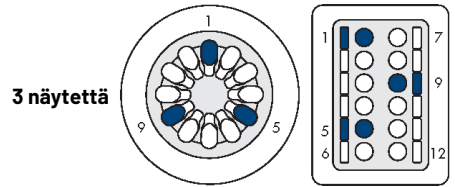
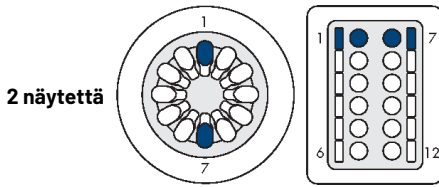
Aseta kootut roottoriadapterit QIAcube Connect MDx -sentrifugin koteloihin kuvan 21 mukaisesti.



Jos käsittelet alle 12 näytettä, lataa sentrifugin roottori säteittäissuunnassa tasapainoisesti (katso kuva 22, sivu 67). Kaikki sentrifugin kotelot on asennettava ennen protokolla-ajon aloittamista, vaikka näytteitä käsiteltäisiin alle 12. Yksittäistä (yhtä) näytettä tai 11 näytettä ei voi käsitellä.



Kuva 21: QIAcube Connect MDx -sentrifugin täyttäminen. Aseta kootut roottoriadapterit sentrifugin koteloihin.



Kuva 22: Sentrifugin ja ravistimen täyttäminen. Sentrifugin ja ravistimen paikat 2–10 näytteen käsittelyssä. Yhtä tai 11 näytettä ei voi käsitellä. 12 näytteen käsittelyä varten täytetään kaikki sentrifugin ja ravistimen paikat (kuvaa ei esitetty).

## Käsittelyputket

Poista mikrosentrifugiputkien (MCT) aukkoihin aiemmista ajoista jääneet käsittelyputket (PT) (katso kuva 18, sivu 63). Täytä kolme (3) käsittelyputkea (PT) taulukossa 5 ilmoitetulla reagenssimäärällä ajon sisältämän näytemäärän mukaan.

DNaasi I -inkubaatioseosta varten pipetoi ilmoitettu määrä DNA:n hajottamispuskuria (RDD) käsittelyputkeen (PT) ja lisää ilmoitettu määrä DNaasi I (RNFD) -varastoliuosta. Sekoita pipetoimalla varovasti koko seosta ylös ja alas kolme (3) kertaa käyttämällä 1000 µl:n pipettikärkeä.



Käytä PAXgene Blood RNA Kit -sarjan sisältämiä 2 ml:n käsittelyputkia (PT). Merkitse putkiin selvästi reagenssien nimet ja aseta ne asianmukaisesti paikkoihin mikrosentrifugiputkien (MCT) aukkoihin taulukon 6 (sivu 69) mukaisesti.



DNaasi I (RNFD) on erittäin herkkä fyysiselle denaturoitumiselle. Sekoita vain pipetoimalla käyttämällä suurireikäisiä pipettikärkeä siirroksen vähentämiseksi. Älä vorteksoi.

Pipetoi vain tarvittava määrä taulukon 5 mukaisesti.

**Taulukko 5: Käsittelyputkiin (PT) tarvittava reagenssien määrä mikrosentrifugiputkien (MCT) aukoissa**

Näytteiden määrä	Ilmoitetulle näytemäärälle tarvittava reagenssin määrä (µl)		
	Proteinaasi K (PK)	DNaasi I -inkubaatioseos	Eluutiopuskuri (BR5)
2	126	187 (23 DNaasi I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNaasi I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNaasi I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNaasi I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNaasi I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNaasi I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNaasi I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNaasi I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNaasi I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNaasi I + 806 Buffer RDD)	1177

**Taulukko 6: Mikrosentrifugiputkien aukot**

	Paikka		
	A	B	C
Sisältö	Proteinase K (Proteinaasi K)	DNaasi I -inkubaatioseos	Eluutiopuskuri (BR5)
Astia	Käsittelyputki*	Käsittelyputki*	Käsittelyputki*

\* Käytä PAXgene Blood RNA Kit -sarjan sisältämiä 2 ml:n käsittelyputkia (PT).

# Hävittäminen

Näytteenoton ja manuaalisen RNA:n eristämisen jälkeen katso turvallisen hävityksen ohjeet turvallisuustiedoista ja varotoimista sivuilta 18 ja 19.

Lisäksi QIAcube Connect MDx -laitteella tehdystä automaattisesta RNA:n eristyksestä syntyneiden käytettyjen kärkien ja putkien hävittämisestä on lisätietoa kuvassa 21 ja kuvassa 22, sivu 66 ja 67.

# Lähdeviitteet

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.

# Vianmääritysopas

Tämä vianmääritysopas voi auttaa mahdollisissa esiin tulevilla ongelmilla. Lisätietoja on saatavissa teknisen tuen sivustostamme usein kysytyjen kysymysten (Frequently Asked Questions, FAQ) osiosta: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). QIAGENin teknisen palvelun asiantuntijat vastaavat aina mielellään kysymyksiisi, koskivatpa ne sitten tämän käsikirjan tietoja tai tässä käsikirjassa esitellyjä protokollia tai näytteisiin ja määrittäisiin liittyviä tekniikoita. (Katso yhteystiedot tämän takakannesta tai osoitteesta [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).)

Huomautuksia ja ehdotuksia	
<b>RNA hajonnut</b>	
a) RNAasi-kontaminaatio	 Ole varovainen, ettet vie RNAaseja reagensseihin toimenpiteen tai myöhemmän käsittelyn aikana (katso liite A, sivu 77).
<b>Heikko RNA:n tuotto</b>	
b) Alle 2,5 ml verta otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen	 Varmista, että 2,5 ml verta on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen (katso <i>PAXgene Blood RNA Tube -käsikirja</i> ).
c) RNA-pitoisuus mitattuna vedessä	 RNA on laimennettava 10 mM:n Tris-HCl:llä, pH 7,5,* tarkkaa kvantifiointia varten (katso liite B, sivu 78).
d) Solujäte siirretty pyörityskolonniin putkeen (PRC) manuaalisen protokollan vaiheissa 9 ja 10	 Vältä siirtämästä suuria hiukkasia, kun pipetoit supernatanttia manuaalisen protokollan vaiheissa 7 (pienen solujätämäärän siirtäminen ei vaikuta toimenpiteeseen).
e) Supernatanttia ei poistettu täysin vaiheessa 3	 Varmista, että supernatantti poistetaan kokonaisuudessaan. Jos supernatantti dekantoidaan, poista pisarat PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putken reunasta taputtelemalla sitä paperipyyhkeeseen. Ryhdy tarvittaviin varotoimiin ristikontaminaation estämiseksi.
f) PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putken ottamisen jälkeen verta inkuboidaan alle 2 h	 Inkuboi verta PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkessa vähintään 2 tunnin jälkeen.

\* Kun käsittelet kemikaaleja, käytä aina asianmukaista suojavaatetusta, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja on tuotekohtaisissa käyttöturvatiiedoissa (Safety Data Sheet, SDS), joita saa tuotteen toimittajalta.






Huomautuksia ja ehdotuksia	
<b>Matala <math>A_{260}/A_{280}</math>-arvo</b>	
g) Vettä käytetty laimentamaan RNA:ta $A_{260}/A_{280}$ -mittausta varten	 Käytä 10 mM:n Tris-HCl:ää, pH 7,5, laimentamaan RNA ennen puhtauden mittaamista* (katso liite B, sivu 78).
h) Spektrofotometriä ei ole nollattu kunnolla	 Nollaa spektrofotometri käyttämällä nollanäytettä, joka on valmistettu samasta määrästä eluutiopuskuria (BR5) ja 10 mM:n Tris-HCl-puskuria, pH 7,5, kuin mitattavissa näytteissä. Eluutiopuskurilla (BR5) on korkea absorbanssi 220 nm, mikä voi johtaa korkeisiin tausta-absorbanssitasoihin, jos spektrofotometriä ei ole asianmukaisesti nollattu.
<b>Laitteen toimintahäiriö</b>	
i) QIAcube Connect MDx ei toiminut oikein	Lue QIAcube-käyttöopas ja kiinnitä huomiota erityisesti Vianmäärittys-osioon. Varmista, että laite on huollettu asianmukaisesti käyttöoppaan ohjeiden mukaisesti.

\* 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.

# Symbolit

Käyttöohjeessa tai pakkauksessa ja etiketeissä saattaa näkyä seuraavia symboleita. Lisäsymbolit on selitetty kohdassa Sarjan sisältö (sivu 6).

Symboli	Selitys
V<N1>	Tuotteen versio <N1>
 <N2>	Sisältää reagensseja, jotka riittävät <N2> testiin
	Katso käyttöohjeet
	Viimeinen käyttöpäivämäärä
<b>IVD</b>	In vitro -diagnostinen lääketieteellinen laite
<b>REF</b>	Tuotenumero
<b>LOT</b>	Eränumero
<b>MAT</b>	Materiaalinumero
<b>COMP</b>	Komponentit
<b>NUM</b>	Numero
<b>KU</b>	Kunitz-yksiköt
<b>ADD</b>	Lisätty
<b>CONT</b>	Sisältö
<b>RCNS</b>	Rekonstruoitu

**DNase**

Deoksiribonukleaasi I

**EtOH**

Etanoli

**GITC**

Guanidiini-isotiosyanaatti

**RNase-Free DNase Set**

RNase-Free DNase Set

**GTIN**

GTIN-numero



Lämpötilarajoitus



Lämpötilan yläraja



Valmistaja

**EC REP**

Valtuutettu edustaja Euroopassa säädöksen (EU) 2017/746 mukaisesti



Tärkeä ilmoitus



Etanolin lisäys



CE-merkki. Tämä tuote täyttää in vitro -diagnostisia lääketieteellisiä laitteita koskevan säädöksen (EU) 2017/746 vaatimukset.

**UDI**

Yksilöllinen laitetunniste



Huomio



VAROITUS: Kuuma pinta

# Yhteystiedot

QIAGEN-yhtiön tarjoama tekninen tuki on huippulaatuista ja helposti saatavilla. Teknisen palvelun osastoillamme on kokeneita asiantuntijoita, joilla on laaja teoreettinen ja käytännöllinen molekyylibiologian osaaminen ja jotka hallitsevat PreAnalytiX-tuotteiden käytön. Jos sinulla on kysyttävää PAXgene Blood RNA Kit -sarjasta, ota meihin yhteyttä. Autamme mielellämme.

Jos tarvitset teknistä neuvontaa tai lisätietoja, käy teknisen tuen sivuilla osoitteessa **[www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support)**, soita ilmaisnumeroon 00800-22-44-6000 tai ota yhteyttä johonkin QIAGENin teknisen palvelun osastoon tai paikalliseen jälleenmyyjään (ks. takakansi tai käy osoitteessa **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**).

# Liite A: Yleisiä huomautuksia RNA:n käsittelystä

## RNA:n käsitteleminen



Ribonukleasit (RNAasit) ovat erittäin vakaita ja aktiivisia entsyymejä, jotka eivät tavallisesti edellytä kofaktoreita toimiakseen. Koska RNAaseja on vaikea inaktivoida ja jopa pikkuruiset määrät riittävät hajottamaan RNA:ta, mitään muovi- tai lasitarvikkeita ei saa käyttää poistamatta ensin mahdollista RNAasi-kontaminaatiota. On oltava erittäin varovainen, ettei RNAaseja viedä vahingossa RNA-näytteeseen eristystoimenpiteen aikana tai sen jälkeen. Jotta voidaan luoda ja ylläpitää RNAasitonta ympäristöä, esikäsittelyn aikana on ryhdyttävä varotoimiin ja käytettävä kertakäyttöisiä ja ei-kertakäyttöisiä astioita ja liuoksia RNA:n kanssa työskennellessä.

## Yleinen käsittely



Asianmukaista mikrobiologista, aseptista tekniikkaa on aina käytettävä työskennellessä RNA:n kanssa. Käsissä ja pölyssä on bakteereita ja homeita, ne ovat yleisiä RNAasi-kontaminaation lähteitä. Estä ihon pinnan tai pölyisten laboratoriovälineiden aiheuttamat RNAasi-kontaminaatiot käyttämällä aina lateksi- tai vinyylikäsitteitä, kun käsittelet reagensseja ja RNA-näytteitä. Vaihda käsitteet usein ja pidä putket suljettuina aina kun mahdollista. Pidä puhdistettu RNA jäässä, kun alikvootteja pipetoidaan myöhempiä käyttötarkoituksia varten.

Protokollia RNAasi-kontaminaation poistamiseen lasitarvikkeista ja liuoksista löytyy yleisistä molekyylibiologian oppaista, kuten Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

# Liite B: Kokonais-RNA:n kvantifiointi ja laadun määrittäminen

## RNA:n kvantifiointi

RNA:n pitoisuus on määritettävä mittaamalla absorbanssi 260 nm:ssä ( $A_{260}$ ) spektrofotometrillä. Merkittävyyden varmistamiseksi lukemien tulisi olla spektrofotometriä lineaarisella alueella. Yhden yksikön absorbanssi aallonpituudella 260 nm vastaa 44 µg:aa RNA:ta millilitrassa ( $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ ). Tämä suhde on voimassa vain mittauksissa, jotka tehdään 10 mM:n Tris-HCl-puskurissa,\* pH 7,5. Siksi jos on tarpeen laimentaa RNA-näytettä, se on tehtävä 10 mM:n Tris-HCl-puskurilla. Kuten jäljempänä on selostettu (katso RNA:n puhtaus, sivu 79), absorbanssi-arvojen suhde 260 ja 280 nm:ssä tuottaa arvion RNA:n puhtaudesta. Mitattaessa RNA-näytteitä on varmistettava, että kyvetit ovat RNAasittomia. Nollaa spektrofotometri käyttämällä nollanäytettä, joka on valmistettu samasta määrästä eluutiopuskuria (BR5) ja Tris-HCl-puskuria kuin mitattavissa näytteissä. Eluutiopuskurilla (BR5) on korkea absorbanssi 220 nm, mikä voi johtaa korkeisiin tausta-absorbanssitasoniin, jos spektrofotometriä ei ole asianmukaisesti nollattu. Esimerkki RNA:n kvantifiointiin käytetystä laskennasta on esitetty jäljempänä.

RNA-näytteen tilavuus	=	80 µl
Laimennus (1/15)	=	10 µl RNA-näytettä + 140 µl 10 mM:n Tris-HCl:ä, pH 7,5
Mittaa kyvetissä (RNAasittomassa) olevan laimennetun näytteen absorbanssi.		
$A_{260}$	=	0,3
Näytteen pitoisuus	=	$44 \times A_{260} \times \text{laimennuskerroin}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 µg/ml
Kokonaistuotto	=	pitoisuus $\times$ näytteen tilavuus millilitroina
	=	$198 \mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml}$
	=	15,8 µg RNA

\* Kun käsittelet kemikaaleja, käytä aina asianmukaista suojavaatetusta, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja on tuotekohtaisissa käyttöturvatieotteissa (Safety Data Sheet, SDS), joita saa tuotteen toimittajalta.

## RNA:n puhtaus

260 nm:ssä ja 280 nm:ssä ( $A_{260}/A_{280}$ ) mitattujen lukemien suhde antaa arvion RNA:n puhtaudesta suhteessa kontaminantteihin, jotka absorboivat UV-valoa, kuten proteiini. pH kuitenkin vaikuttaa merkittävästi  $A_{260}/A_{280}$ -suhteeseen. Matalampi pH tuottaa matalamman  $A_{260}/A_{280}$ -suhteen ja pienemmän herkkyyden proteiinikontaminaatiolle.\* Tarkkoja arvoja varten on suositeltavaa mitata absorbanssi 10 mM:n Tris-HCl-puskurissa, pH 7,5. Puhtaalla RNA:lla on  $A_{260}/A_{280}$ -suhde 1,8–2,2 10 mM:n Tris-HCl-puskurissa, pH 7,5. Nollaa spektrofotometri käyttämällä nollanäytettä, joka on valmistettu samasta määrästä eluutiopuskuria (BR5) ja Tris-HCl-puskuria kuin mitattavissa näytteissä. Eluutiopuskurilla (BR5) on korkea absorbanssi 220 nm, mikä voi johtaa korkeisiin tausta-absorbanssitasoihin, jos spektrofotometriä ei ole asianmukaisesti nollattu.

\* 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.

# Liite C: PAXgene Blood RNA Tube (BRT)-putkien käsitleminen



Seuraavat BD:n suositukset voivat olla hyödyllisiä käsiteltäessä PAXgene Blood RNA Tube (BRT)-putkia. Katso *PAXgene Blood RNA Tube -käsikirjasta* lisätietoja PAXgene Blood RNA Tube (BRT)-putkista.

## Ohjeet BD Hemogard -suljimen poistamiseen

1. Tartu PAXgene Blood RNA Tube (BRT)-putkeen toisella kädellä ja aseta peukalo BD Hemogard -suljimen alle. (Lisää vakautta asettamalla käsivarsi tasaiselle pinnalle.) Väännä BD Hemogard -suljinta toisella kädellä, kun samanaikaisesti painat toisen käden peukalolla ylöspäin vain, kunnes putken suljin on löysällä.
2. Siirrä peukalo pois, ennen kuin nostat suljimen. Älä käytä peukaloa painamaan suljinta pois PAXgene Blood RNA Tube (BRT)-putkesta. Huomio: Jos PAXgene Blood RNA Tube (BRT) sisältää verta, on olemassa altistumisvaara. Loukkaantumisen estämiseksi suljimen poistamisen yhteydessä on tärkeää, että peukalo, jolla suljinta painetaan ylöspäin, ei enää koske PAXgene Blood RNA Tube (BRT)-putkeen välittömästi, kun BD Hemogard -suljin löystyy.
3. Nosta suljin pois PAXgene Blood RNA Tube (BRT)-putkesta. Mikäli muovisuojus irtoaa kumitulpasta, älä kokoa suljinta uudelleen. Poista kumisuljin varovasti PAXgene Blood RNA Tube (BRT)-putkesta.



## Ohjeet toissijaisen BD Hemogard -sulkimen asettamiseen

1. Aseta suljin PAXgene Blood RNA Tube (BRT)-putken päähän.
2. Väännä ja paina alaspäin tiukasti, kunnes suljin on asettunut uudelleen kokonaan. Sulkimen täydellinen uudelleenasetus on tarpeen, jotta se pysyy tiukasti PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkessa käsittelyn aikana.

# Tilaustiedot

Tuote	Sisältö	Tuotenro
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Column -putkea, 50 Shredder Spin Column -putkea, käsittelyputkia, RNAasitonta DNAasi I:tä, RNAasittomia reagensseja ja puskureita. Käytettäväksi yhdessä PAXgene Blood RNA Tube -putkien kanssa	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 verinäyteputkea	762165
<b>Liittyvät tuotteet, jotka voi tilata QIAGENilta QIAcube-laitteella tehtävää automaattista RNA:n eristystä varten</b>		
Starter Pack, QIAcube	Pakkaus sisältää: reagenssipullotelineet (3); telineen merkintätarrat (8); 200 µl:n suodatinkärjet (1 024); 1 000 µl:n suodatinkärjet (1 024); 1 000 µl:n suodatinkärjet, leveäaukkoiset (1 024); 30 ml:n reagenssipullot (18); roottoriadapterit (240); roottoriadapterin pidike	990395
Filter-Tips, 1000 µL (1024)	Steriilit, kertakäyttöiset suodatinkärjet, telineessä	990352
Reagent Bottles, 30 mL (6)	Korkilliset reagenssipullot (30 ml), 6 kappaleen pakkaus, käytettäväksi QIAcube-reagenssipullotelineen kanssa	990393
Rotor Adapters (10 × 24)	240 preparaatiota varten: 240 kertakäyttöistä roottoriadapteria, käytettäväksi QIAcube-laitteen kanssa	990394
Reagent Bottle Rack	Teline, johon mahtuu 6 × 30 ml:n reagenssipulloa QIAcube-työpöydälle	9026197
Rotor Adapter Holder	12 kertakäyttöisen roottoriadapterin pidike, käytettäväksi QIAcube-laitteen kanssa	990392

Tuote	Sisältö	Tuotenro
<b>Liittyvät tuotteet, jotka voi tilata BD:ltä verinäytteiden ottamiseen PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) -putkiin*</b>		
BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set	21 G:n, 0,75 tuuman (0,8 x 19 mm:n) neula, 12 tuuman (305 mm:n) letku, jossa luer- sovitin; 50/laatikko, 200/pakkaus	367286/367281
BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set	21G 3/4 tuuman (0,8 x 19 mm) neula, 12 tuuman (305 mm) letku, jossa luer- sovitin. 50/laatikko, 200/pakkaus	367344
BD Vacutainer One-Use Holder	Pelkkä kotelo 13 mm:n ja 16 mm:n halkaisijalle; 1000/kotelo	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm 4,0 ml:n näytteenottoputki, jossa punainen BD Hemogard -suljin ja paperietiketti; 100/laatikko, 1000/kotelo	368975/367812
BD Vacutainer EST Tube	13x 75 mm 3,0 ml:n näytteenottoputki, jossa kirkas BD Hemogard -suljin ja muovietiketti; 100/laatikko, 1000/kotelo	362725
BD Vacutainer No Additive (Z) Tube	13 x 75 mm 3,0 ml:n näytteenottoputki, jossa kirkas BD Hemogard -suljin ja paperietiketti; 100/laatikko, 1000/kotelo	366703

\* Nämä verinäytteen ottovaruusteet edustavat tyypillisiä tuotteita, joita voidaan käyttää PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkien kanssa. Lisätietoja näistä lisävarusteista sekä niiden tilausohjeet ovat osoitteessa [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

# Asiakirjan muutoshistoria

Päivämäärä	Muutokset
[R1] huhtikuu 2022	Ensimmäinen IVDR-versio
[R2] helmikuu 2023	PreAnalytiX GmbH:n osoite muutettu Feldbachstrassesta osoitteeseen Garstligweg 8. Lisätty BD-tuotteita tilaustietoihin. Päivitetty turvallisuustiedot.

## Huomautukset



Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista PreAnalytiX- tai QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. PreAnalytiX- ja QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat löytyvät osoitteesta [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) ja [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä palvelusta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

**Better samples  
More to explore**

 **PreAnalytiX**  
A QIAGEN / BD Company

Katso lisätietoja: [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)

HB-3009-002 02/2023