

Februari 2023

PAXgene[®] Blood RNA Kit (Handbok) Bruksanvisning



Version 3 (V3)

IVD

För in vitro-diagnostisk användning



REF

762174



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

Producerad av QIAGEN[®] GmbH för PreAnalytiX GmbH

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R2

MAT

1130774SV

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

PreAnalytiX GmbH, 8634 Hombrechtikon, CH.

© 2023 PreAnalytiX GmbH. Om inte annat har angetts, tillhör PreAnalytiX, PreAnalytiX-logotypen och alla andra varumärken PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH.

Avtal om begränsad licens för PAXgene Blood RNA Kit

Användning av denna produkt innebär att köpare eller användare av produkten godkänner följande villkor:

1. Produkten får endast användas i enlighet med de protokoll som medföljer produkten och den här handboken och får endast användas med komponenterna som ingår i panelen. PreAnalytiX® ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i denna panel med komponenter som inte ingår i denna panel förutom vad som beskrivs i de protokoll som medföljer produkten, denna handbok och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com och www.preanalytix.com.
2. Förutom de uttryckta licenserna kan PreAnalytiX inte garantera att denna sats och/eller dess användning inte kränker oberoende tredje parts rättigheter.
3. Satsen är licensierad för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. PreAnalytiX avsäger sig specifikt alla andra licenser, uttryckta eller underförstådda, förutom de specifikt stipulerade.
5. Inköparen och användaren av denna sats samtycker till att inte vidta eller tillåta att någon annan vidtar några steg som kan leda till eller underlätta några åtgärder som är förbjudna enligt ovan.
6. PreAnalytiX kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, vid eventuell åtgärd för att upprätthålla detta begränsade licensavtal eller någon av företagets immateriella rättigheter avseende satsen och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com och www.preanalytix.com.

HB-3009-002 BD-8945 1130774SV © 2023 PreAnalytiX GmbH, med ensamrätt.

PreAnalytiX-distributörer

PreAnalytiX produkter tillverkas och distribueras av QIAGEN eller BD för PreAnalytiX.

Innehåll

| | |
|--|----|
| Innehåll | 3 |
| Avsedd användning | 6 |
| Avsedd användare | 6 |
| Beskrivning och princip | 7 |
| Inledning | 7 |
| Princip och utförande | 7 |
| Provtagning och stabilisering | 8 |
| RNA-isolering | 8 |
| Manuell RNA-isolering | 9 |
| Automatiserad RNA-isolering | 11 |
| Material som medföljer | 14 |
| Satsinnehåll | 14 |
| Paketets innehåll | 15 |
| Material Som Behövs Men Inte Medföljer | 16 |
| För alla protokoll | 16 |
| För det manuella protokollet | 16 |
| För det automatiska protokollet | 17 |
| Varningar och försiktighetsåtgärder | 18 |
| Säkerhetsinformation | 18 |
| Vid nödsituationer | 18 |
| Försiktighetsåtgärder | 19 |
| Förvaring och hantering av reagenser | 22 |

| | |
|---|----|
| Användningsstabilitet | 22 |
| Insamling, förvaring och hantering av prover..... | 23 |
| Protokoll: Manuell isolering av total RNA från humant helblod i PAXgene Blood RNA Tubes... | 24 |
| Protokoll: Automatisk isolering av total RNA från humant helblod i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)..... | 31 |
| Begränsningar för produktanvändning | 38 |
| Kvalitetskontroll..... | 38 |
| Prestandaegenskaper | 39 |
| Provtagning och stabilisering | 39 |
| Manuell RNA-isolering | 44 |
| Automatiserad RNA-isolering..... | 52 |
| Stabilitet hos isolerat RNA..... | 55 |
| Viktiga anmärkningar | 56 |
| Användning av QIAcube Connect MDx | 56 |
| Starta QIAcube Connect MDx | 56 |
| Installation av protokoll på QIAcube Connect MDx | 58 |
| Laddning av QIAcube Connect MDx | 59 |
| Kolonner (PSC, PRC), MCT och plastartiklar för QIAcube Connect MDx | 62 |
| Bortskaffning | 68 |
| Referenser | 69 |
| Felsökningsguide | 70 |
| Symboler..... | 72 |
| Kontaktinformation..... | 74 |
| Bilaga A: Allmänna hänvisningar angående RNA-hantering..... | 75 |

| | |
|--|----|
| Bilaga B: Kvantifiering av mängd och kvalitet av Total RNA | 76 |
| Bilaga C: Hantering av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) | 78 |
| Beställningsinformation | 80 |
| Dokumentrevisioner | 82 |

Avsedd användning

För in vitro-diagnostisk användning.

PAXgene Blood RNA System består av blodprovtagningsrör (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) och satsen (PAXgene Blood RNA Kit) för rening av nukleinsyra. Systemet används för tagning, förvaring och transport av blod, stabilisering av intracellulärt RNA i slutna provrör och påföljande isolering och rening av värd-RNA ur helblod för RT-PCR som används vid molekylärdiagnostiska test.

Prestandaegenskaper för PAXgene Blood RNA System har endast fastställts för FOS- och IL1B-gentranskript. Användaren är ansvarig för att fastställa lämpliga prestandaegenskaper för PAXgene Blood RNA System för andra måltranskriptioner.

Indikationer för användning

PAXgene Blood RNA Kit används för rening av intracellulärt RNA från helblod som samlats in med PAXgene Blood RNA Tube (BRT). När satsen används med PAXgene Blood RNA Tube (BRT), ger systemet renat intracellulärt RNA ur helblod för RT-PCR som används i molekylärdiagnostiska tester.

Avsedd användare

Produkten är avsedd att användas professionellt av t.ex. tekniker och läkare som har utbildning i diagnostiska in vitro-procedurer.

Den här satsen är avsedd för professionell användning.

Beskrivning och princip

Inledning

Hos många molekylärbiologiska analyser av cellulärt RNA är tagning av helblod det första steget. Ett stort problem härvid är instabiliteten hos den cellulära RNA-profilen in vitro. Undersökningar hos PreAnalytiX har visat att antalet kopior av enskilda mRNA-varianter i helblod kan variera mer än tusenfalt under transport eller förvaring vid rumstemperatur (Rainen et al., 2002). Detta beror på snabb RNA-nedbrytning och inducerat uttryck hos särskilda gener efter att blod tagits. Sådana förändringar av RNA-profilen förhindrar tillförlitliga resultat vid studier av genuttrycket. Detta gör en metod för att bevara RNA-uttrycksprofilen under och efter blodtagning för en noggrann genuttrycksanalys av humant helblod essentiell.

Princip och utförande

PreAnalytiX har utvecklat ett system som möjliggör tagning, stabilisering, förvaring och transport av humant helblod, tillsammans med ett snabbt och effektivt protokoll för isolering av intracellulärt RNA. Systemet består av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) för blodtagning och samtidig RNA-stabilisering, och PAXgene Blood RNA Kit för anslutande manuell eller automatisk RNA-isolering. Både manuella och automatiserade protokoll erbjuder i stort motsvarande prestanda avseende RNA-kvalitet och -utbyte. Prestandadata för det manuella protokollet (börjar på sidan 44) och det automatiserade protokollet (börjar på sidan 52) är inkluderade i denna handbok.

PAXgene Blood RNA System möjliggör standardisering av de pre-analytiska stegen i arbetsflödet från insamling av blodprov till isolering av cellulärt RNA enligt ISO 20186-1:2019, Molekylärbiologiska in-vitro diagnostiska undersökningar – Riktlinjer för pre-analytiska processer för venöst helblod – Del 1: Isolerat cellulärt RNA.

Provtagning och stabilisering

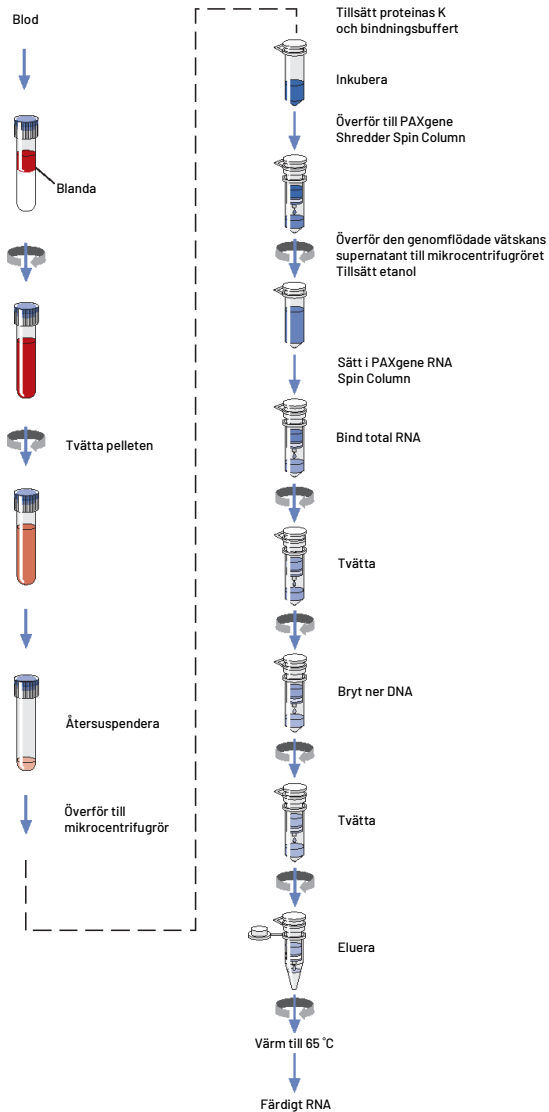
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) innehåller ett proprietärt RNA-stabiliseringsreagens. Denna tillsats skyddar RNA-molekyler mot RNase-orsakad nedbrytning och reducerar ex vivo-förändringar i genuttrycket till ett minimum. Prestandaegenskaper för PAXgene Blood RNA System har fastställts för FOS- och IL1B-gentranskript, som kan ses med början på sidan 39.

RNA-isolering

PAXgene Blood RNA Kit används för att isolera total RNA ur 2,5 mL humant helblod som samlats i PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Proceduren är enkel och kan utföras antingen manuellt eller automatiskt (se figur 1 eller figur 3, sidan 10 respektive 12). I båda protokollen påbörjas isoleringen med en centrifugering för att sedimentera nukleinsyrorna i PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Pelleten blir tvättad och återsuspenderad, följt av manuell eller automatisk RNA-isolering. I princip följer båda protokollen samma förfarande med samma satskomponenter.

Manuell RNA-isolering

Den återsuspenderade pelletten blir inkuberad i optimerad buffert med proteinas K (PK), för att digestera proteiner. Ytterligare en centrifugering med PAXgene Shredder-kolonnen (PSC) tjänar syftet att homogenisera celllysaten och avlägsna rester av celldebris. Supernatanten av filtratfraktionen förs över till ett nytt mikrocentrifugrör (MCT). Etanol tillsätts för att skapa optimala bindningsförhållanden, och lysaten appliceras på en PAXgene RNA-kolonn (PRC). Vid den påföljande korta centrifugeringen binder RNA selektivt på PAXgene-silikonmembranet under pågående kontamination. Resterande kontaminationer avlägsnas genom flera effektiva tvättsteg. Mellan det första och andra tvättsteget inkuberas membranet med DNase I (RNFD), för att avlägsna eventuellt bundna DNA-rester. Efter tvättstegen blir RNA eluerad i elueringsbuffert (BR5) och värmedenaturerad. Prestandaegenskaperna för manuell RNA-isolering med PAXgene Blood RNA System kan ses på sidan 44.



Figur 1: Den manuella PAXgene Blood RNA-proceduren.

Automatiserad RNA-isolering

Isolering av blod-RNA automatiseras med QIAGEN QIAcube Connect MDx. Det innovativa instrumentet används avancerad teknik för att bearbeta QIAGEN-kolonner, vilket möjliggör en smidig integration av automatiserad provberedning med lågt genomflöde i laboratoriets arbetsflöde. Provberedningen med QIAcube Connect MDx följer samma steg som den manuella proceduren (dvs. lysning, bindning, tvätt och eluering) och kan utföras med samma PAXgene Blood RNA Kit.

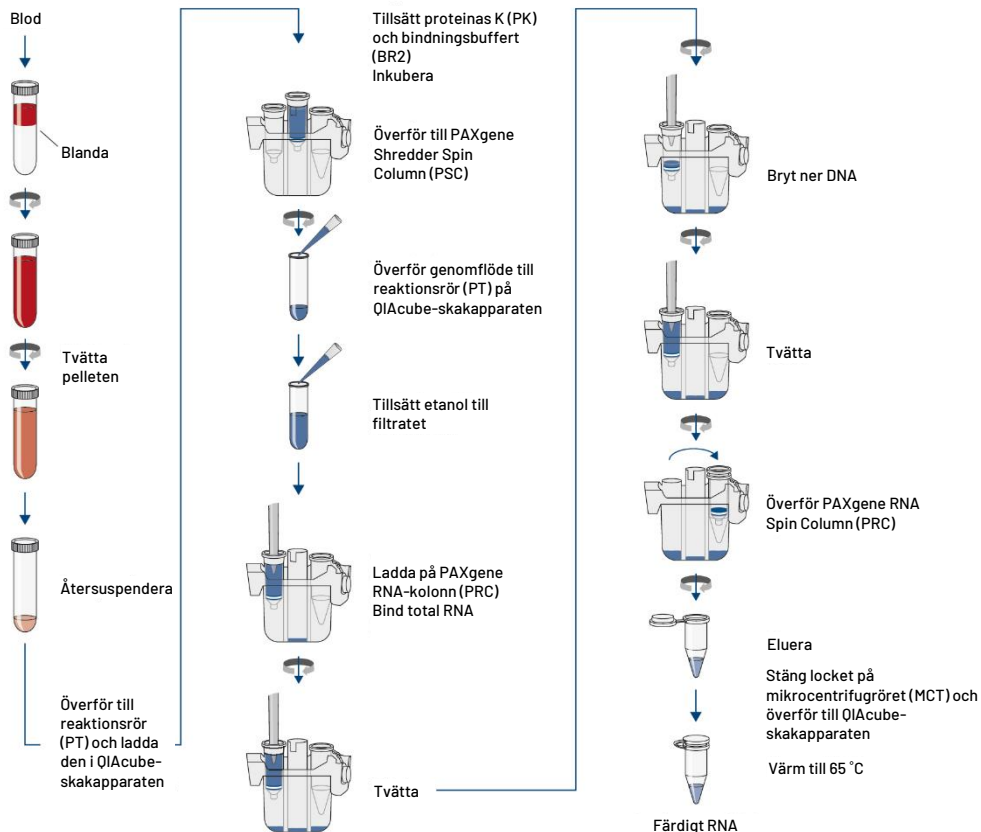


Figur 2: QIAcube Connect MDx.



QIAGEN QIAcube Connect MDx är inte tillgängligt i alla länder. Kontakta QIAGEN teknisk service för ytterligare information.

Det automatiserade RNA-isoleringsprotokollet består av 2 delar (eller protokoll) "PAXgene Blood RNA Part A" (från blodet i PAXgene Blood RNA Tube för eluering) och "PAXgene Blood RNA Part B" (efter eluering för färdigt RNA), med en mindre manuell åtgärd mellan de 2 delarna (se figur 3, sidan).




Figur 3: Den automatiserade PAXgene Blood RNA-proceduren.

Den centrifugerade, tvättade och återsuspenderade nukleinsyrapelleten (se "RNA-isolering", sidan 8) överförs från PAXgene Blood RNA Tube (BRT) till reaktionsrör (PT), vilka placeras i termoskappapparaten på arbetsbänken för QIAcube Connect MDx. Användaren väljer och startar protokollet "PAXgene Blood RNA Part A" från menyn. QIAcube Connect MDx utför stegen i protokollet genom eluering av RNA i elueringsbuffert (BR5). Användaren överför MCT-rören som innehåller renat RNA till termoskappapparaten på QIAcube Connect MDx. Användaren väljer och startar protokollet "PAXgene Blood RNA Part B" från menyn och värmedenaturering utförs av QIAcube Connect MDx. Prestandaegenskaperna för automatiserad RNA-isolering med PAXgene Blood RNA System på kan QIAcube Connect MDx ses på sidan 52.

Material som medföljer

Satsinnehåll

| PAXgene Blood RNA Kit Katalognr. Antal insamlingsenheter | | | (50) 762174 50 |
|--|---|---|----------------------|
| Komponent-namn | Beskrivning | Symbol | Kvantitet |
| BR1 | Resuspension Buffer (Återsuspenderingsbuffert) | RES BUF | 20 mL |
| BR2 | Binding Buffer (Bindningsbuffert)* | BIND BUF | 18 mL |
| BR3 | Wash Buffer 1 (Tvättbuffert 1)* | WASH BUF 1 | 45 mL |
| BR4 | Wash Buffer 2 (Tvättbuffert 2) (koncentrat)† | WASH BUF 2 CONC | 11 mL |
| BR5 | Elution Buffer (Elueringsbuffert) | ELU BUF | 6 mL |
| RNFW | RNase-Free Water (RNase-fritt vatten) (flaska) | PEL WASH | 2 × 125 mL |
| PK | Proteinase K (Proteinas K) (grönt lock) | PROTK | 2 × 1,4 mL |
| PRC | PAXgene RNA Spin Columns (PAXgene RNA-kolonner) (röd)‡ | PAXgene RNA COL | 5 × 10 |
| PT | Processing Tubes (Bearbetningsrör) (2 mL)§ | PROC TUBE | 6 × 50 |
| Hemogard™ | Secondary BD Hemogard Closures (Sekundär BD Hemogard-förlutning) | SEC CLOS | 50 |
| MCT | Microcentrifuge Tubes (Mikrocentrifugrör) (1,5 ml)§ | MIC TUBE | 3 × 50, 1 × 10 |
| RNFD | DNase I, RNase-free (DNase I, fritt från RNase) (frostorkat) | DNA REM | 1500 Kunitz units¶ |
| RDD | DNA Digestion Buffer (DNA Digestionsbuffert) (vitt lock) | DNA DIG BUF | 2 × 2 mL |
| DRB | DNase Resuspension Buffer (DNase återsuspenderingsbuffert) (rör, lila lock) | DNase RES BUF | 2 mL |
| PSC | PAXgene Shredder Spin Columns (PAXgene Shredder-kolonner) (lila)‡ | PAXgene SHRED COL | 5 × 10 |
| Handbok | PAXgene Blood RNA Kit-handbok (Version 3) |  | 1 |

* Får ej komma i kontakt med desinfektionsmedel som innehåller blekmedel. Innehåller guanidinsalt. Sidan 18 innehåller Säkerhetsinformation.

† Tvättbuffert 2 (BR4) levereras med satsen som koncentrat. Tillsätt den fyrfaldiga volymen etanol (96–100 % v/v, renhetsgrad p. a.) till flaskan (som etiketten anger) innan den används första gången för att framställa den bruksfärdiga arbetslösningen.

‡ Varje kolonn är förpackad i en blister som är avsedd för engångsbruk. Se säkerhetsinformationen för anvisningar om avfallshantering.

§ Rören finns i plastpåsar och varje rör är avsett för engångsbruk. Se säkerhetsinformationen för anvisningar om avfallshantering.

¶ Kunitz units är det mått som vanligtvis används för att mäta DNase I och definieras som den mängd DNase I som ger en ökad A_{260} på 0,001 per minut och milliliter vid 25 °C, pH 5,0 med högpolymeriserat DNA som substrat (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* 33, 349 och 363).

Paketets innehåll

| Komponentnamn | Beskrivning | Aktivt innehållsämne | Koncentration |
|---------------|---|-----------------------------|---|
| BR1 | Resuspension Buffer (Återsuspenderingsbuffert) | Ingen | - |
| BR2 | Binding Buffer (Bindningsbuffert) | Guanidintiocyanat | ≥ 30 till < 50 % w/w |
| BR3 | Wash Buffer 1 (Tvättbuffert 1) | Guanidintiocyanat Etanol | ≥ 10 till < 20 % w/w ≥ 3 till < 10 % w/w |
| BR4 | Wash Buffer 2 (Tvättbuffert 2) (koncentrat) | Ingen | - |
| BR5 | Elution Buffer (Elueringsbuffert) | Ingen | - |
| RNFW | RNase-Free Water (RNase-fritt vatten) (flaska) | Ingen | - |
| PK | Proteinase K (Proteinas K) (grönt lock) | Proteinas K | ≥ 1 till < 3 % w/w |
| RNFD | DNase I, RNase-free (DNase I, fritt från RNase) (frystorkat) | DNase | ≥ 90 till ≤ 100 % w/w |
| RDD | DNA Digestion Buffer (DNA Digestionsbuffert) (vitt lock) | Ingen | - |
| DRB | DNase Resuspension Buffer (DNase återsuspenderingsbuffert) (rör, lila lock) | Ingen | - |

Material Som Behövs Men Inte Medföljer

Använd alltid labbrock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS) som kan erhållas från produktens återförsäljare.

För alla protokoll

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; kat.nr. 762165)
- Etanol (96–100 % v/v, renhetsgrad p.a.)
- Pipetter* (10 μ L–4 mL)
- Sterila RNase-fria pipettspetsar med aerosolbarriär†
- Mätcylinder‡
- Centrifug* (med swing-bucket-rotor) för PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) med variabel hastighet på 3 000–5 000 \times g
- Vortexblandare*
- Krossad is
- Permanent penna för märkning

För det manuella protokollet

- Mikrocentrifug* med variabel hastighet på minst 1 000–8 000 \times g, även om lägre och högre g-krafter kan användas (se protokollstegen för detaljer), och utrustad med en rotor för 2 mL MCT-rören

* Säkerställ att enheter och instrument har kontrollerats, underhållits och kalibrerats regelbundet i enlighet med tillverkarens rekommendationer.

† Se till att du känner till instruktionerna för hantering av RNA (Bilaga A, sidan 75).

‡ För att mäta den etanolvärdmängd som skall tillsättas till buffert BR4-koncentratet.

- Skakinkubator* som kan inkubera vid 55 °C och 65 °C och skaka vid ≥ 400 rpm, inte överstigande 1 400 rpm (t.ex. Eppendorf® Thermomixer Compact eller liknande)

För det automatiska protokollet

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

Förbrukningsvaror för QIAcube Connect MDx:

- Filter-Tips, 1000 μ L (1024)(QIAGEN, kat.nr 990352)†
- Reagent Bottles, 30 mL (6)(QIAGEN, kat.nr 990393)†
- Rotor Adapters (10 \times 24)(QIAGEN, kat.nr 990394)†

Tillbehör för QIAcube Connect MDx:

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

QIAcube Connect MDx servicepaket:

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

* Säkerställ att enheten och instrumentet har kontrollerats, underhållits och kalibrerats regelbundet i enlighet med tillverkarens rekommendationer.

† Även inkluderat i Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, kat.nr 990395).

Varningar och försiktighetsåtgärder

Kunder i EU bör vara medvetna om att alla allvarliga incidenter som har inträffat i samband med enheten måste rapporteras till tillverkaren och den behöriga myndigheten i den medlemsstat där användaren och/eller patienten befinner sig.

Om du är kund utanför Europeiska unionen bör du vara medveten om att du kan behöva konsultera lokala regelverk för rapportering av allvarliga incidenter som inträffat i samband med enheten till tillverkaren och/eller auktoriserad representant och den tillsynsmyndighet där användaren och/eller patienten befinner sig.

Säkerhetsinformation

Använd alltid labbrock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier och smittfarligt material. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheet, SDS). De är tillgängliga online i behändigt PDF-format på adressen **www.qiagen.com/safety**, där du kan hitta, granska och skriva ut säkerhetsdatablad (SDS) för varje QIAGEN-kit och kitkomponent.

- Alla kemikalier och allt biologiskt material är potentiellt farliga. Blodprover är potentiellt smittsamma och måste hanteras som smittfarligt material.
- Kassera biofarligt avfall och avfall från satsen i enlighet med lokala säkerhetsprocedurer.

Vid nödsituationer

CHEMTREC

Utanför USA & Canada +1703-527-3887

Försiktighetsåtgärder

När du arbetar med blod ska du tillämpa allmänna försiktighetsåtgärder för att undvika risken för exponering för blodburna patogener (t.ex. hiv, hepatit B och andra blodburna virus). Använd handskar, kåpor, ögonskydd, annan personlig skyddsutrustning och tekniska kontroller för att skydda mot exponering för blod. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheet, SDS). De finns tillgängliga i ett praktiskt PDF-format online på www.preanalytix.com, där du kan hitta, visa och skriva ut säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS) för denna sats.

FÖRSIKTIGHET



Tillsätt INTE blekmedel eller sura lösningar direkt till provberedningsavfall.

Bindningsbuffert (BR2) och tvättbuffert 1 (BR3) innehåller guanidinisotiocyanat, som kan reagera starkt med blekmedel. Om en vätska som innehåller bindningsbuffert (BR2) och tvättbuffert 1 (BR3) spills ut ska utsatta ytor tvättas med lämpliga laboratorierengöringsmedel och vatten. Om vätska som innehåller potentiellt smittsamma ämnen spills ska berörda ytor först rengöras med rengöringsmedel och vatten och därefter med 1 % (v/v) natriumhypoklorit (blekmedel).

RNA-stabiliseringslösningen och blodvätskan från PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kan desinficeras med 1 volym kommersiell blekmedelslösning (5 % natriumhypoklorit) till 9 volymer RNA-stabiliseringslösning och blodvätska.

Avfall från provberedning, t.ex. supernatant från centrifugeringssteg i RNA-isoleringsproceduren, ska betraktas som potentiellt smittbärande. Använd behållare för biofarligt avfall för att kassera biologiskt material. Bortskaffande måste ske i enlighet med lokala föreskrifter och förfaranden på din anläggning.

De specifika komponenterna i PAXgene Blood RNA Kit är avsedda för engångsbruk. Se Satsinnehåll på sidan 14 för information om de enskilda komponenterna.

Följande information om risker och försiktighetsåtgärder gäller för komponenter i PAXgene Blood RNA Kit. Se *PAXgene Blood RNA Tube-handboken* för säkerhetsinformation om PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Buffer BR2



Innehåller: guanidinisotiocyanat. Fara! Farligt vid förtäring. Kan vara skadligt vid hudkontakt eller inandning. Orsakar allvarlig ögonskada. Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer. Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra. Undvik miljöutsläpp. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om detta går lätt att göra. Fortsätt att skölja. Vid exponering eller oro: Kontakta omedelbart GIFTINFORMATIONSCENTRALEN eller läkare. Innehållet/behållaren lämnas till en godkänd avfallsanläggning.

Buffer BR3



Innehåller: etanol; guanidintiocyanat. Fara! Brandfarlig vätska och ånga. Orsakar allvarlig ögonskada. Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra. Får inte utsättas för värme/gnistor/öppen låga/heta ytor. Rökning förbjuden. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om detta går lätt att göra. Fortsätt att skölja. Kontakta omedelbart GIFTINFORMATIONSCENTRALEN eller läkare.

DNase I



Innehåller: DNase. Fara! Kan orsaka allergisk hudreaktion. Kan orsaka allergi- eller astmasymptom eller andningssvårigheter vid inandning. Undvik att andas in damm. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. Använd andningsskydd. Vid exponering eller oro: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRALEN eller läkare. För personen till en plats med frisk luft och placera i ett läge där det är bekvämt att andas. Tvätta kontaminerad klädsel innan den återanvänds.

Förvaring och hantering av reagenser

PAXgene RNA-kolonner (PRC), PAXgene Shredder-kolonner (PSC), proteinas K (PK) och buffertar (BR1, BR2, BR3, BR4 och BR5) ska förvaras torrt och vid den temperatur som anges på etiketten.

RNase-Free DNase Set, som innehåller DNase I (RNFD), DNA-digestionsbuffert (RDD) och DNase återsuspenderingsbuffert (DRB) skickas i rumstemperatur. Direkt efter transporten skall alla komponenter som tillhör RNase-Free DNase Set förvaras i den temperatur som anges på etiketten. Vid korrekt förvaring är satsen hållbar fram till utgångsdatumet på satsens förpackning.

Var uppmärksam på de utgångsdatum och förvaringsvillkor som anges på förpackningen och på etiketterna till alla komponenter. Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.

Användningsstabilitet

Efter första användningen av satsen är reagenserna stabila i originalflaskorna vid de temperaturer och fram till det utgångsdatum som anges på etiketten på satsen.

Reagenser som fylls i reagensflaskorna i QIAcube Connect MDx är stabila under tre månaders förvaring i rumstemperatur (15–25 °C).

Rekonstituerat DNase I (RNFD) är stabilt vid 2–8 °C i 6 veckor i den ursprungliga glasflaskan (stamlösning).

Alikvoter för engångsbruk av stamlösningen i 1,5 mL MCT-rör (levereras med satsen) är stabila under 9 månaders lagring vid -20 °C. Efter upptining är alikvoterna för engångsbruk stabila under 6 veckors förvaring vid 2–8 °C.

Insamling, förvaring och hantering av prover

PAXgene Blood RNA Kit är avsett för användning med helblod som samlats in i PAXgene Blood RNA Tubes. Blodprov ska samlas in i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) enligt anvisningarna i handboken för PAXgene Blood RNA Tube. Vid behov, se Bilaga C (sidan 78) för rekommendationer om hur PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ska hanteras. Alla prover ska betraktas som potentiellt smittfarliga. Prestandaegenskaper för PAXgene Blood RNA System har fastställts för FOS- och IL1B-gentranskript, som kan ses på sidorna 40–43.

Protokoll: Manuell isolering av total RNA från humant helblod i PAXgene Blood RNA Tubes

Viktigt att tänka på före start

- Kontrollera att satsen är intakt och oskadad och att buffertbehållarna inte läcker. Använd inga satser med synliga skador.
- När en pipett används, se till att den är inställd på rätt volym och att vätskan aspireras och dispensereras noggrant.
- För att förhindra att ett prov hamnar i fel reaktionsrör eller i fel kolonn, bör alla reaktionsrör och kolonner namnges noggrant och alla lock markeras med en permanent märkpena. Markera locken och varje rör (PT, MCT). Markera även kolonnernas PT. Förslut alltid reaktionsrören och kolonnerna när vätska har tillsatts.
- Om prov- eller buffertvätska spills ut under preparationen kan RNA-utbytet och -renheten påverkas.
- Om inget annat anges, skall alla protokollsteg (inklusive centrifugeringarna) genomföras vid rumstemperatur (15–25 °C).

På grund av den höga känsligheten hos nukleinsyra-amplifieringsmetoder skall följande försiktighetsåtgärder följas för att förhindra korskontaminering:

- Pipettera försiktigt provet i kolonnen (PSC, PRC) utan att fukta kolonnens kant.
- Byt alltid pipettspetsar mellan vätskeöverföringar. Använd pipettspetsar med aerosolbarriär.
- Undvik att vidröra spinnkolonnens (PSC, PRC) membran med pipettspetsen.
- Efter blandning eller upphettning av MCT, centrifugera försiktigt för att få bort dropparna från lockets insida.
- Använd laboratoriehandskar under hela processen. Om handskarna kommer i kontakt med provet skall de genast bytas ut.

- Förslut alltid kolonnerna (PSC, PRC) innan de sätts in i mikrocentrifugen. Centrifugera enligt protokollets anviselser.
- Öppna försiktigt endast en kolonn (PSC, PRC) åt gången och undvik aerosolbildning.
- För en effektiv parallellbearbetning av flera prov rekommenderas att ett rack med PT förbereds, i vilket kolonnerna (PSC, PRC) kan placeras efter centrifugeringen. Kassera de använda PT som innehåller filtratet och placera kolonnerna (PSC, PRC) i nya PT innan du överför dem tillbaka till mikrocentrifugen.

Saker som måste göras före start

- Blodprov ska samlas in i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) enligt anvisningarna i handboken för *PAXgene Blood RNA Tube*. Vid behov, se Bilaga C (sidan 78) för rekommendationer om hur PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ska hanteras.
- Efter blodtagningen ska PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkuberas i minst 2 h vid rumstemperatur för att säkerställa att blodceller och precipitat av RNA är fullständigt lyserade. En inkubation av PAXgene Blood RNA Tube (BRT) över natten kan leda till ett högre utbyte. Om den första blodinkubationen i rumstemperatur i 2 h inte gjordes före förvaring vid 2–8 °C, -20 °C eller -70 °C, ska PAXgene Blood RNA Tube (BRT) först ekvilibreras till rumstemperatur och sedan inkuberas vid denna temperatur i 2 h innan proceduren påbörjas.
- Läs säkerhetsinformationen på sidan 18.
- Läs riktlinjerna för hantering av RNA (Bilaga A, sidan 75).
- Se till att alla instrument som används, t.ex. pipetter och skakinkubator, kontrolleras och kalibreras regelbundet enligt tillverkarens rekommendationer.
- En skakinkubator krävs för steg 5 och 20. Ställ in temperaturen för skakinkubatorn på 55 °C.
- I bindningsbufferten (BR2) kan precipitat bildas vid förvaring. Vid behov kan denna lösas upp genom uppvärmning till 37 °C.

- Tvättbuffert 2 (BR4) levereras med satsen som koncentrat. Tillsätt den fyrfaldiga volymen etanol (96–100 % v/v, renhetsgrad p. a.) till flaskan (som etiketten anger) innan den används första gången för att framställa den bruksfärdiga arbetslösningen.
- Innan RNase-Free DNase Set används för första gången skall en DNase I-stamlösning tillredas. Lös upp DNase I (RNFD; 1 500 Kunitz-units)* i 550 µL DNase återsuspenderingsbuffert (DRB), som levereras med satsen. Se till att ingen DNase I (RNFD) går förlorad när behållaren öppnas. Rekonstituerad DNase I (RNFD) får inte vortexblandas. DNase I är särskilt känsligt för fysisk denaturering. Blanda endast genom att försiktigt vända på behållaren.
- Rekonstituerad DNase I (RNFD) kan förvaras vid 2–8 °C i den ursprungliga glasflaskan (stamlösning) eller vid –20 °C efter att stamlösningen avlägsnats från glasflaskan och delats upp i alikvoter för engångsbruk (använd det 1,5 mL MCT som medföljer satsen – det räcker till 5 alikvoter). Upptinade alikvoter kan förvaras i 2–8 °C. Frys inte ner upptinade alikvoter.
- Vid rekonstruktion och alikvotering av DNase I (RNFD), se till att du följer riktlinjerna för hantering av RNA. Vid rekonstruktion och alikvotering av DNase I (RNFD), se till att du följer riktlinjerna för hantering av RNA (Bilaga A, sidan 75).

Procedur

1. Centrifugera PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i 10 min vid 3 000–5 000 × g med en swing-bucket-rotor.



Se till att blodprovet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) har inkuberats i minst 2 h vid rumstemperatur (15–25 °C) för att garantera att blodcellerna och precipitat av RNA har lyserats fullständigt.

* Kunitz units är det mått som vanligtvis används för att mäta DNase I och definieras som den mängd DNase I som ger en ökad A_{260} på 0,001 per minut och milliliter vid 25 °C, pH 5,0 med högpolymeriserat DNA som substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 och 363).



Rotorn skall vara utrustad med adaptrar för rör med rund botten. Om andra typer av adaptrar används kan rören skadas under centrifugeringen.

2. Aspirera försiktigt supernatanten genom att dekantera eller pipettera. Tillsätt 4 mL RNase-fritt vatten (RNFV) till pelletten och stäng röret med en ny BD Hemogard-säkerhetsförslutning (medföljer satsen).

Se till att pelletten inte störs om supernatanten dekanteras och torka rørets mynning med en ren pappershandduk.

3. Vortexblanda pelletten tills den har återsuspenderats och centrifugera i 10 min vid $3\ 000\text{--}5\ 000 \times g$ med en swing-bucket-rotor. Ta därefter bort och kasta hela supernatanten.

Mindre celldebris som är kvar i supernatanten, efter skakningen men före centrifugeringen, stör inte den fortsatta proceduren.



Däremot kan lyseringen hämmas och lysatet spädas om supernatanten inte aspireras fullständigt, och på så vis påverka förutsättningarna för RNA att binda på PAXgene-membranet.

4. Tillsätt 350 μL återsuspenderingsbuffert (BR1) och vortexblanda tills pelletten är fullständigt återsuspenderad.
5. För över provet till ett 1,5 mL MCT med en pipett. Tillsätt 300 μL bindningsbuffert (BR2) och 40 μL proteinas K (PK). Blanda med vortex i 5 s och inkubera i 10 min vid $55\ ^\circ\text{C}$ i en skakinkubator vid 400–1 400 rpm. Höj skakinkubatorns temperatur till $65\ ^\circ\text{C}$ (för steg 20) efter inkubationen.



Blanda inte bindningsbuffert (BR2) och proteinas K (PK) innan de tillsätts till provet.

6. Pipettera lysatet direkt i en PSC (lila), som ställts i ett 2 mL PT, och centrifugera i 3 min med maximalt varvtal (max. $20\ 000 \times g$).



För försiktigt över hela lysatet med en pipett till kolonnen (PSC) och kontrollera visuellt att lysatet är helt överförd till kolonnen (PSC).

För att undvika att kolonnerna (PSC) eller rören (PT) skadas skall man inte centrifugera med mer än $20\,000 \times g$.



Vissa prover kan flöda igenom PSC utan centrifugering. Detta beror på den låga viskositeten hos vissa prover och ska inte anses som ett tecken på produktfel.

7. För därefter över hela supernatanten av filtratfraktionen, utan att virvla upp pelletten i PT, till ett nytt 1,5 mL MCT.
8. Pipettera därtill 350 μL etanol (96–100 % v/v, renhetsgrad p.a.). Blanda (vortexa) och centrifugera kort (1–2 s vid $500\text{--}1\,000 \times g$), för att avlägsna provvätska på insidan av locket.



Man skall inte centrifugera längre än 1–2 s, då detta eventuellt kan leda till sedimentering av nukleinsyror och därmed till ett reducerat utbyte av total RNA.

9. Pipettera 700 μL av provet i PRC (röd), som placerats i ett 2 mL PT, och centrifugera i 1 min vid $8\,000\text{--}20\,000 \times g$. För över kolonnen (PRC) till ett nytt 2 mL PT och kasta det använda PT samt filtratet.
10. Pipettera resten av provet i PRC och centrifugera i 1 min vid $8\,000\text{--}20\,000 \times g$. För över kolonnen (PRC) till ett nytt 2 mL PT och kasta det använda PT samt filtratet.



För försiktigt över provet med en pipett till kolonnen (PRC) och kontrollera visuellt att provet är helt överfört till kolonnen (PRC).

11. Pipettera 350 μL tvättbuffert 1 (BR3) till PRC. Centrifugera i 1 min vid $8\,000\text{--}20\,000 \times g$. För över kolonnen (PRC) till ett nytt 2 mL PT och kasta det använda PT samt filtratet.
12. Tillsätt 10 μL DNase I (RNFD) stamlösning till 70 μL DNA digestionsbuffert (RDD) i ett 1,5 mL MCT. Blanda genom att försiktigt "snäppa" med fingrarna på röret och centrifugera kort för att samla vätskeresterna från rörets sidor.
För att bearbeta t.ex. 10 prov, pipetteras 100 μL DNase I (RNFD) stamlösning till 700 μL DNA digestionsbuffert (RDD). Använd de 1,5 mL MCT-rör som levereras med satsen.



DNase I är särskilt känsligt för fysisk denaturering. Blanda lösningen genom att försiktigt "snäppa" med fingrarna på röret. En vortex bör inte användas för att blanda.

13. Pipettera DNase I (RNFD)-inkubationsblandningen (80 μ L) direkt på PRC-membranet och låt stå på bänken i 15 min vid 20–30 °C.



Se till att DNase I (RNFD) inkubationsblandningen hamnar direkt på membranet. Digestionen med DNase kan förlöpa ofullständigt om en del av blandningen sitter fast på innerväggen eller på O-ringen av kolonnen (PRC).

14. Pipettera 350 μ L tvättbuffert 1 (BR3) i PRC och centrifugera i 1 min vid 8 000–20 000 $\times g$. För över kolonnen (PRC) till ett nytt 2 mL PT och kasta det använda PT samt filtratet.

15. Pipettera 500 μ L tvättbuffert 2 (BR4) i PRC och centrifugera i 1 min vid 8 000–20 000 $\times g$. För över kolonnen (PRC) till ett nytt 2 mL PT och kasta det använda PT samt filtratet.



Tvättbuffert 2 (BR4) levereras med satsen som koncentrat. Se till att etanol tillsätts till tvättbuffert 2 (BR4) innan användning (se "Saker som måste göras före start" på sidan 25).

16. Tillsätt ytterligare 500 μ L tvättbuffert 2 (BR4) i PRC. Centrifugera i 3 min vid 8 000–20 000 $\times g$.

17. För över PRC till ett nytt 2 mL PT och kasta det använda PT samt filtratet. Centrifugera i 1 min vid 8 000–20 000 $\times g$.

18. Kasta PT samt filtratet. För över PRC till ett 1,5 mL MCT och pipettera 40 μ L elueringsbuffert (BR5) direkt på PRC-membranet. Centrifugera i 1 min vid 8 000–20 000 $\times g$ för att eluera RNA.

För att uppnå maximal eluerings effektivitet är det viktigt att hela membranet fuktas med elueringsbuffert (BR5).

19. Upprepa elueringssteget (steg 18) enligt beskrivning, med 40 μ L elueringsbuffert (BR5) och med samma MCT.

20. Inkubera eluatet i 5 min vid 65 °C i en skakinkubator (se steg 5), dock utan att skaka. Kyl därefter proven på is.



Genom inkubationen av proverna vid 65 °C denatureras RNA för påföljande applikationer. Även om följande applikation inkluderar ett värmedenatureringssteg, skall detta steg inte utlämnas. Tillräcklig RNA-denaturering vid denna tidpunkt är nödvändig för maximal effektivitet i efterföljande applikationer.

Överskrid varken inkubationstiden eller -temperaturen.

21. Om RNA-proverna inte används direkt ska de förvaras vid -20 °C eller -70 °C.

Eftersom RNA även efter upprepad nedfrysning och upptining förblir denaturerat, är det inte nödvändigt att upprepa inkubationen vid 65 °C. Om RNA-proven skall användas för en diagnostisk analys skall tillverkarens angivelser följas.

Vi rekommenderar spädning av prover med 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 för korrekt kvantifiering av RNA genom absorbans vid 260 nm.* Spädning av provet i RNase-fritt vatten kan leda till felaktigt låga värden.

För att ställa in spektrofotometerens nollpunkt skall ett blankprov (blank) användas, vars sammansättning av elueringsbuffert (BR5) och Tris-HCl-buffert motsvarar proven som skall mätas. Elueringsbufferten (BR5) absorberar kraftigt vid 220 nm, vilket kan leda till höga bakgrundsabsorbansvärden om spektrofotometerens nollpunkt inte har ställts in korrekt.



För kvantifiering i Tris HCl-buffert ska förhållandet $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/mL}$ användas. Se Bilaga B, sidan 76.

22. Återförslut alla flaskor som innehåller buffertar och RNase-fritt vatten, flaskor och rör som innehåller enzymer och enzymbuffertar samt påsar som innehåller plastmaterial från satsen som används för protokollet. Förvara det återstående innehållet i satsen enligt beskrivningen i avsnittet "Förvaring och hantering av reagenser" (sidan 22) och "Användningsstabilitet" (sidan 22) tills det används igen.

* Använd alltid labbrock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS) som kan erhållas från produktens återförsäljare.

Protokoll: Automatisk isolering av total RNA från humant helblod i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Viktigt att tänka på före start

- Kontrollera att satsen är intakt och oskadad och att buffertbehållarna inte läcker. Använd inga satser med synliga skador.
- När en pipett används, se till att den är inställd på rätt volym och att vätskan aspireras och dispensereras noggrant.
- För att förhindra att ett prov hamnar i fel rör eller i fel plastbehållare bör alla PT, MCT-rör och rotoradapter namnges noggrant med en permanent penna. Markera locken och behållaren för varje MCT, behållaren för varje PT samt utsidan av varje rotoradapter.
- Om prov- eller buffertvätska spills ut under preparationen kan RNA-utbytet och -renheten påverkas.
- Om inget annat anges, skall alla protokollsteg (inklusive centrifugeringarna) genomföras vid rumstemperatur (15–25 °C).

På grund av den höga känsligheten hos nukleinsyra-amplifieringsmetoder skall följande försiktighetsåtgärder följas för att förhindra korskontaminering:

- Pipettera försiktigt över provet i PT på botten av röret utan att fukta rörets kant.
- Byt alltid pipettspetsar mellan vätskeöverföringar. Använd pipettspetsar med aerosolbarriär.
- Undvik att vidröra spinnkolonnens (PSC, PRC) membran med pipettspetsen.
- Efter blandning eller upphettning av MCT, centrifugera försiktigt för att få bort dropparna från lockets insida.

- Använd laboratoriehandskar under hela processen. Om handskarna kommer i kontakt med provet skall de genast bytas ut.

Saker som måste göras före start

- Blodprov ska samlas in i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) enligt anvisningarna i handboken för *PAXgene Blood RNA Tube*. Vid behov, se Bilaga C (sidan 78) för rekommendationer om hur PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ska hanteras.
- Efter blodtagningen ska PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkuberas i minst 2 h vid rumstemperatur för att säkerställa att blodceller och precipitat av RNA är fullständigt lyserade. En inkubation av PAXgene Blood RNA Tube (BRT) över natten kan leda till ett högre utbyte. Om PAXgene Blood RNA Tube (BRT) har förvarats vid 2–8 °C, -20 °C eller -70 °C efter blodtagningen, skall röret först ekvibreras till rumstemperatur och inkuberas i 2 h före start av protokollet.
- Läs säkerhetsinformationen på sidan 18.
- Läs "Viktiga anmärkningar", sidan 56.
- Läs riktlinjerna för hantering av RNA (Bilaga A, sidan 75).
- Läs lämplig användarhandbok för QIAcube Connect MDx och annan ytterligare information som medföljer instrumentet och var uppmärksam på säkerhetsinformationen.
- Se till att enheter och instrument som används, t.ex. pipetter och QIAcube Connect MDx, kontrolleras och kalibreras regelbundet enligt tillverkarens rekommendationer.
- I bindningsbufferten (BR2) kan precipitat bildas vid förvaring. Vid behov kan denna lösas upp genom uppvärmning till 37 °C.
- Tvättbuffert 2 (BR4) levereras med satsen som koncentrat. Innan första användning ska lämplig volym etanol (96–100 % v/v, renhetsgrad p.a.) som anges på flaskan tillsättas för att få en arbetslösning.



- Innan RNase-Free DNase Set används för första gången skall en DNase I-stamlösning tillredas. Lös upp DNase I (RNFD; 1 500 Kunitz-units)* i 550 µL DNase återsuspenderingsbuffert (DRB), som levereras med satsen. Se till att ingen DNase I (RNFD) går förlorad när behållaren öppnas. Rekonstituerad DNase I (RNFD) får inte vortexblandas. DNase I är särskilt känsligt för fysisk denaturering. Blanda endast genom att försiktigt vända på behållaren.
- Rekonstituerad DNase I (RNFD) kan förvaras vid 2–8 °C i den ursprungliga glasflaskan (stamlösning) eller vid –20 °C efter att stamlösningen avlägsnats från glasflaskan och delats upp i aliquoter för engångsbruk (använd det 1,5 mL MCT som medföljer satsen – det räcker till 5 aliquoter). Upptinade aliquoter kan förvaras i 2–8 °C. Frys inte ner upptinade aliquoter.
- Vid rekonstruktion och aliquotering av DNase I (RNFD), se till att du följer riktlinjerna för hantering av RNA. Vid rekonstruktion och aliquotering av DNase I (RNFD), se till att du följer riktlinjerna för hantering av RNA (Bilaga A, sidan 75).
- Installera korrekt skakadapter (som medföljer QIAcube Connect MDx: använd adaptern för 2 mL säkerhetslocksör, märkta med "2") och placera skakstället ovanpå adaptern.
- Kontrollera avfallsbrickan och töm vid behov.
- Installera relaterade protokoll om detta inte gjorts vid tidigare körningar. För QIAcube Connect MDx måste alla protokoll i den relaterade zip-filen laddas ned. Se "Installation av protokoll på QIAcube Connect MDx", sidan 58.

Procedur



1. Stäng luckan på QIAcube Connect MDx och slå på instrumentet med strömbrytaren (se figur 15, sidan 57).

Ett pipande ljud hörs och startskärmen visas. Instrumentet utför initieringstester automatiskt.

* Kunitz units är det mått som vanligtvis används för att mäta DNase I och definieras som den mängd DNase I som ger en ökad A_{260} på 0,001 per minut och milliliter vid 25 °C, pH 5,0 med högpolymeriserat DNA som substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 och 363).

2. Öppna luckan på QIAcube Connect MDx och sätt i de reagenser och plastdelar som behövs i instrumentet. Se "Laddning av QIAcube Connect MDx", sidan 59. För att spara tid kan laddningen göras under ett eller båda följande centrifugeringssteg på 10 min (steg 3 och 5).
3. Centrifugera PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i 10 min vid 3 000–5 000 × g med en swing-bucket-rotor.
 -  Se till att blodprovet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) har inkuberats i minst 2 h vid rumstemperatur (15–25 °C) för att garantera att blodcellerna och precipitat av RNA har lyserats fullständigt.
 -  Rotorn skall vara utrustad med adaptrar för rör med rund botten. Om andra typer av adaptrar används kan rören skadas under centrifugeringen.
4. Aspirera försiktigt supernatanten genom att dekantera eller pipettera. Se till att pelletten inte störs om supernatanten dekanteras och torka rörets mynning med en ren pappershandduk. Tillsätt 4 mL RNase-fritt vatten (RNFV) till pelletten och stäng röret med en ny BD Hemogard-säkerhetsförslutning (medföljer satsen).
5. Vortexblanda pelletten tills den har återsuspenderats och centrifugera i 10 min vid 3 000–5 000 × g med en swing-bucket-rotor. Ta därefter bort och kasta hela supernatanten.

Mindre celldebris som är kvar i supernatanten, efter skakningen men före centrifugeringen, stör inte den fortsatta proceduren.

 -  Däremot kan lyseringen hämmas och lysatet spädas om supernatanten inte aspireras fullständigt, och på så vis påverka förutsättningarna för RNA att binda på PAXgene-membranet.
6. Tillsätt 350 µL återsuspenderingsbuffert (BR1) och vortexblanda tills pelletten är fullständigt återsuspenderad.
7. För över provet till ett 2 mL PT med en pipett.
 -  Använd de 2 mL PT som ingår i PAXgene Blood RNA Kit.

8. Ladda de öppna PT med prover i QIAcube Connect MDx-skakapparaten (se figur 18, sidan 61). Provpositionerna är numrerade för enkel laddning. Sätt i skakställspuggar (ingår i QIAcube Connect MDx) i facken på kanten av skakstället bredvid varje PT. Detta gör att prover kan detekteras vid laddningskontrollen.



Se till att korrekt skakadapter (skakadapter, 2 mL, säkerhetslocksror, märkta med "2" som ingår i QIAcube Connect MDx) är installerad.



Vid bearbetning av färre än 12 prover ska du se till att ladda skakstället enligt figur 22, sidan 65. Ett (1) eller 11 prover kan inte bearbetas. Positionsnumren i skakstället motsvarar positionsnumren i centrifugen.

9. Stäng luckan på QIAcube Connect MDx (se figur 15, sidan 57).

10. Välj protokoll "PAXgene Blood RNA Part A" och starta protokollet.

Följ instruktionerna som visas på pekskärmen på QIAcube Connect MDx.



Se till att båda programdelarna (del A och del B) är installerade på QIAcube Connect MDx (se "Installation av protokoll på QIAcube Connect MDx", sidan 58).



Instrumentet kommer att utföra laddningskontroller för prover, spetsar, rotoradapterar och reagensflaskor.

11. När protokollet "PAXgene Blood RNA Part A" är klart kan luckan på QIAcube Connect MDx öppnas (se figur 15, sidan 57). Ta bort PRC:n från rotoradapterarna och de tomma PT från skakapparaten och släng dem.



Under körningen överförs kolonnerna från rotoradapterposition 1 (lockposition L1) till rotoradapterposition 3 (lockposition L2) av instrumentet (se figur 20, sidan 63).

12. Stäng locken på alla 1,5 mL MCT-rör som innehåller renat RNA i rotoradapterarna (position 3, lockposition L3, se figur 20, sidan 63). Överför MCT-rören på 1,5 mL till QIAcube Connect MDx-skakadaptern (se figur 18, sidan 61).

13. Stäng luckan på QIAcube Connect MDx (se figur 15, sidan 57).

14. Välj protokoll "PAXgene Blood RNA Part B" och starta protokollet.

Följ instruktionerna som visas på pekskärmen på QIAcube Connect MDx.



Detta program inkuberar proverna vid 65 °C och denaturerar RNA för efterföljande steg. Även om följande applikation inkluderar ett värmedenatureringssteg, skall detta steg inte utlämnas. Tillräcklig RNA-denaturering vid denna tidpunkt är nödvändig för maximal effektivitet i efterföljande applikationer.

15. När protokollet "PAXgene Blood RNA Part B" är klart kan luckan på QIAcube Connect MDx öppnas (se figur 15, sidan 57). Placera omedelbart MCT-rören med renat RNA på is.



WARNING: Mycket varm yta. Skakapparaten kan uppnå temperaturer på upp till 70 °C. Undvik att vidröra ytan när den är het.



Låt inte renat RNA vara kvar i QIAcube Connect MDx. Om proverna inte kyls kan det renade RNA:t brytas ner. Öövervakade provberedningar under natten rekommenderas därför inte.

16. Om RNA-proverna inte används direkt ska de förvaras vid -20 °C eller -70 °C.

Om RNA, även efter upprepade nedfrysning och upptining förblir denaturerat, är det inte nödvändigt att upprepa inkubationsprotokollet ("PAXgene Blood RNA Part B"). Om RNA-proven skall användas för en diagnostisk analys skall tillverkarens anvisningar följas.

Vi rekommenderar spädning av provet i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, för korrekt kvantifiering av RNA genom absorbans vid 260 nm.* Spädning av provet i RNase-fritt vatten kan leda till felaktigt låga värden.

* Använd alltid labbrock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS) som kan erhållas från produktens återförsäljare.

För att ställa in spektrofotometerens nollpunkt skall ett blankprov (blank) användas, vars sammansättning av elueringsbuffert (BR5) och Tris-HCl-buffert motsvarar proven som skall mätas. Elueringsbufferten (BR5) absorberar kraftigt vid 220 nm, vilket kan leda till höga bakgrundsabsorbansvärden om spektrofotometerens nollpunkt inte har ställts in korrekt.



För att bestämma kvantifieringen i Tris-HCl-buffert, använd förhållandet $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/mL}$. Se Bilaga B, sidan 76.

17. Ta bort reagensflaskstället från arbetsbänk på QIAcube Connect MDx (se figur 18, sidan 61), och stäng alla reagensflaskor med korrekt märkta lock. Återförslut alla flaskor som innehåller buffertar och RNase-fritt vatten, flaskor och rör som innehåller enzymer och enzymbuffertar samt påsar som innehåller plastmaterial från satsen som används för protokollet. Förvara det återstående innehållet i satsen och reagensflaskorna enligt beskrivningen i avsnittet "Förvaring och hantering av reagenser" (sidan 22) och "Användningsstabilitet" (sidan 22) tills de används igen.

Ta bort och släng kvarvarande reagenser i PT-rören i MCT-facken på QIAcube Connect MDx. Ta bort och släng rotoradaptorna i centrifugen. Töm avfallslådan på QIAcube Connect MDx (se figur 15, sidan 57). Stäng instrumentluckan och stäng av instrumentet med strömbrytaren.

Begränsningar för produktanvändning

PAXgene Blood RNA Kit är avsett som hjälpmedel för isolering av intracellulärt RNA ur humant helblod ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocyter/mL) för in vitro-diagnostisk användning. Det är inte avsett för isolering av genomiskt DNA eller virala nukleinsyror ur humant helblod. Prestandaegenskaper har inte fastställts för alla transkript, eftersom endast ett begränsat antal RNA-transkript (FOS- och IL1B-gentranskript) har validerats för stabiliseringsvillkor. Användaren ska granska tillverkarens uppgifter samt sina egna data för att fastställa om andra transkript behöver valideras. Komponenterna i satsen är endast avsedda att användas i det manuella och automatiserade protokoll som beskrivs i denna bruksanvisning.

Se *PAXgene Blood RNA Tube Handbook* för information om hur PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) används.

Kvalitetskontroll

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje lot PAXgene Blood RNA Kit med fastlagda testkriterier enligt QIAGEN:s ISO-certifierade kvalitetshanteringssystem.

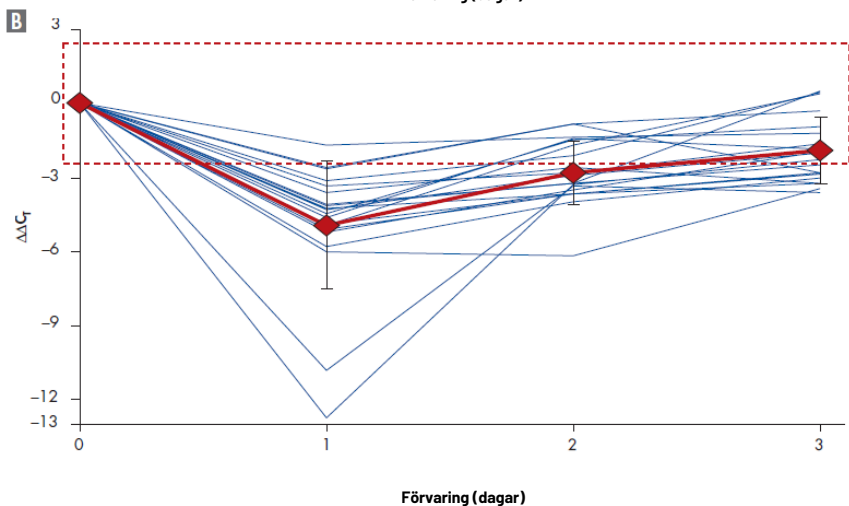
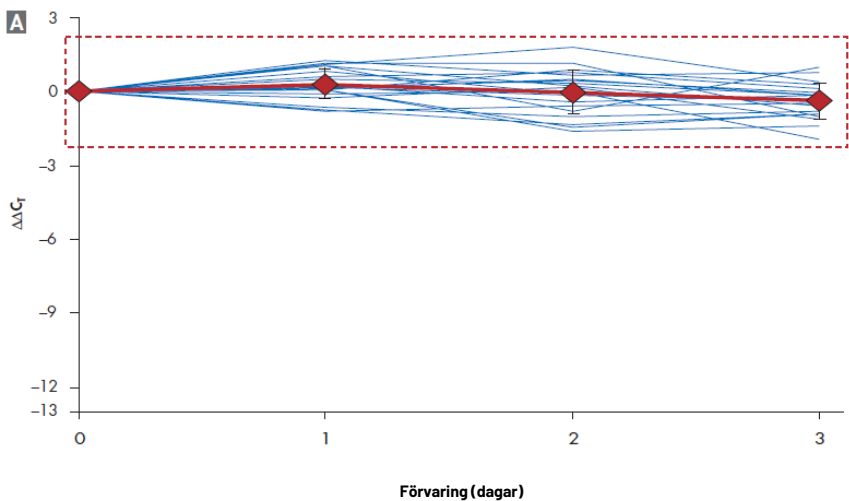
Prestandaegenskaper

Provtagning och stabilisering

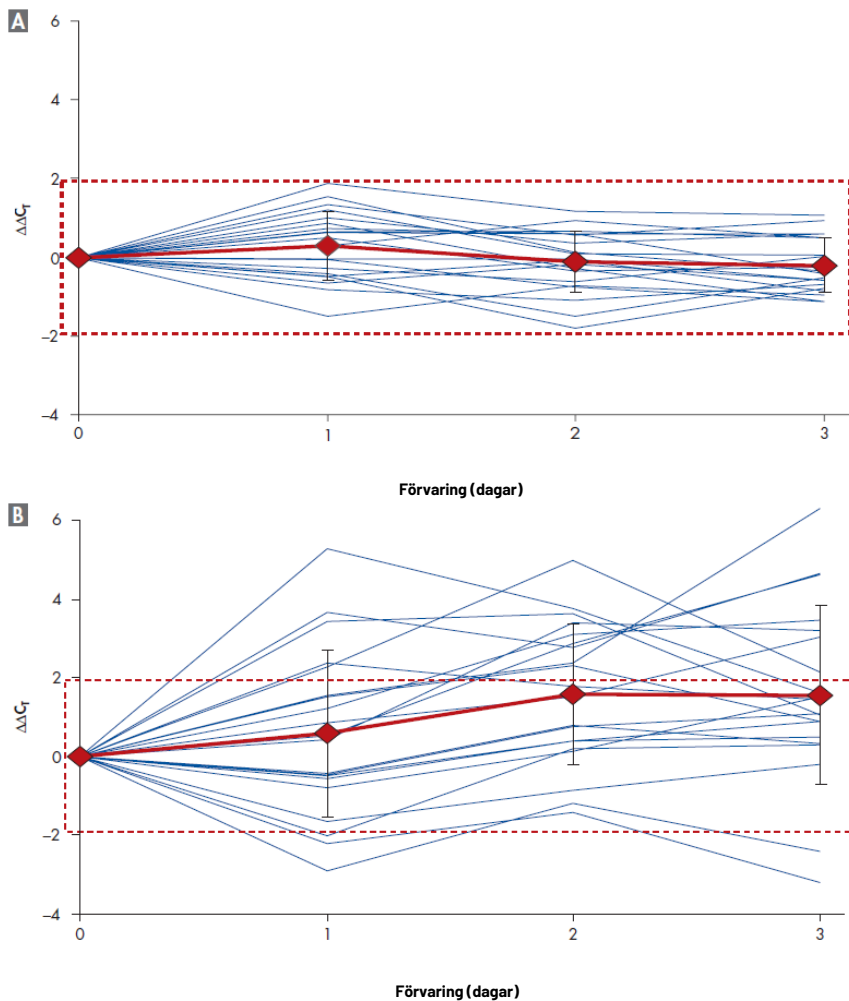
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) innehåller ett proprietärt RNA-stabiliseringsreagens. Denna tillsats skyddar RNA-molekyler mot RNase-orsakad nedbrytning och reducerar ex vivo-förändringar i genuttrycket till ett minimum. PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) är avsedda för provtagning av humant helblod och stabilisering av cellulärt RNA i upp till 3 dagar vid 18–25 °C (figur 4 och figur 5, sidan 40 respektive 41) eller upp till 5 dagar vid 2–8 °C (figur 6 och figur 7, sidan 42 och 43). Dessutom kan stabiliserat blod förvaras fryst. För närvarande visar föreliggande data att cellulärt RNA är stabilt i minst 11 år vid –20 °C eller –70 °C*. För ytterligare information från pågående studier av stabiliteten efter ännu längre tidsperioder, gå till www.preanalytix.com eller kontakta QIAGEN teknisk service.

Den faktiska tiden av RNA-stabiliseringen kan variera beroende på RNA-varianten och den därpå följande applikationen. Prestandaegenskaper har inte fastställts för alla transkript, eftersom endast ett begränsat antal RNA-transkript (FOS- och IL1B-gentranskript) har validerats för stabiliseringsvillkor. Användaren ska granska tillverkarens uppgifter samt sina egna data för att fastställa om andra transkript behöver valideras.

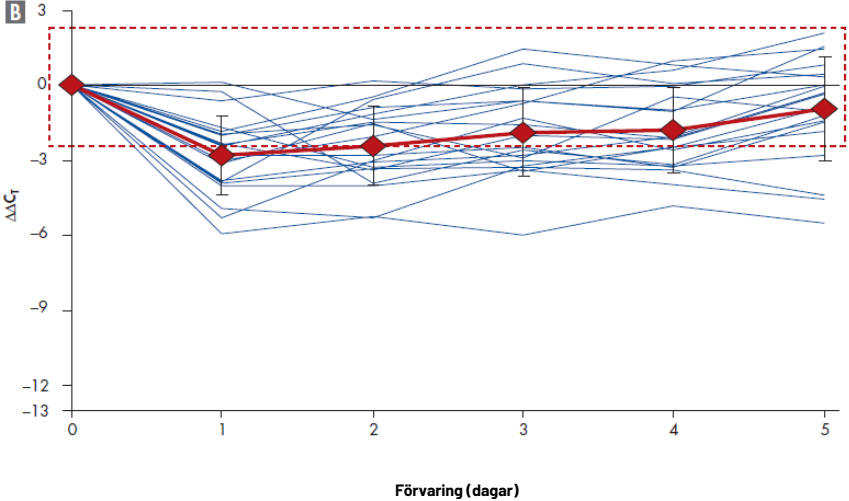
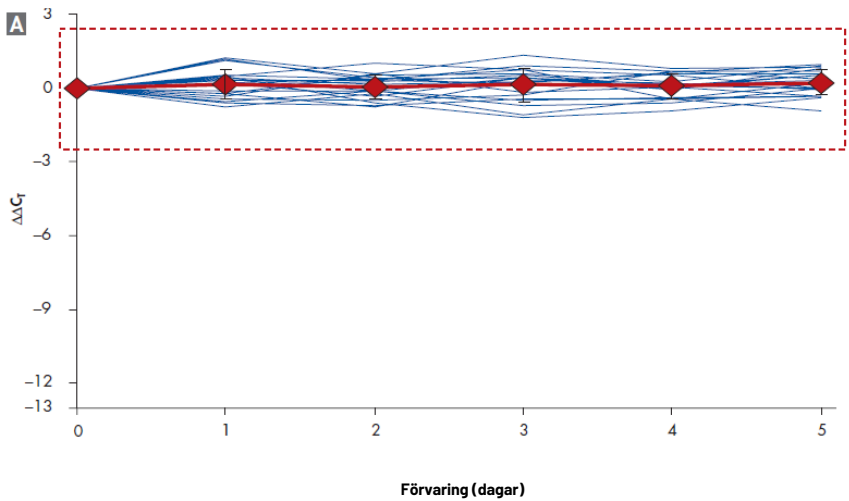
* En långtidsstudie av blodförvaring i PAXgene Blood RNA Tubes pågår.



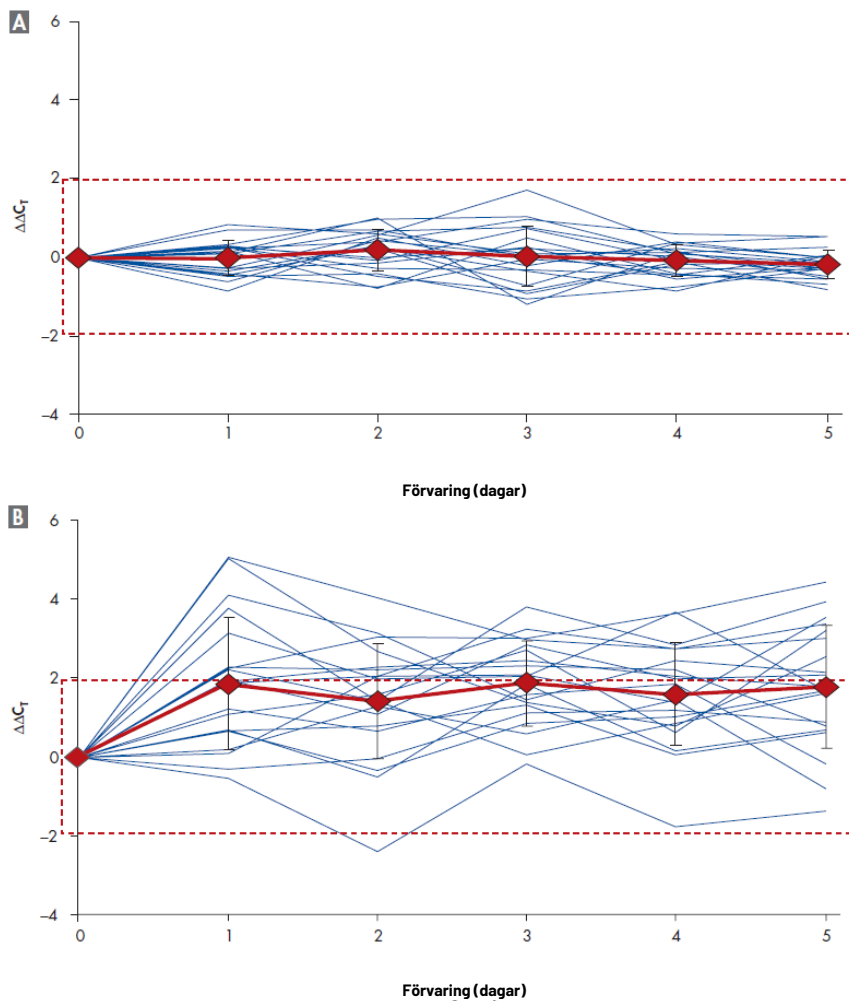
Figur 4: RNA-stabilitet i blodprov vid 18–25 °C: FOS. Blodprov från 10 upplevt friska givare förvarades i angivet antal dagar vid 18–25 °C, innan total RNA isolerades. Alla prov togs i duplikat. **[A]** Blodprov togs och förvarades i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) och total RNA renades fram med PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Blodprov togs och förvarades i standardblodprovsrör med EDTA som antikoaguleringsmedel och total RNA renades fram med en organisk standardisoleringsmetod och silikonbaserad membran-RNA-upprening. Relativ FOS-transkriptionsnivå bestämdes via realtids duplex RT-PCR, med 18S-rRNA som intern standard. De analyserade provernas värden är angivna med medelvärde och standardavvikelse. Den streckade linjen anger området för analysens mät noggrannhet $\pm 3 \times$ precision ($2,34 C_t$).



Figur 5: RNA-stabilitet i blodprov vid 18–25 °C: IL1B. Blodprov togs och total RNA renades fram efter förvaring vid 18–25 °C så som beskrivs i figur 4. De relativa koncentrationerna IL1B-transkription bestämdes genom realtids duplex RT-PCR, med 18S-rRNA som intern standard. De analyserade provernas värden är angivna med medelvärde och standardavvikelse. Den streckade linjen anger området för analysens mätnoggrannhet $\pm 3 \times$ precision (1,93 C_T).



Figur 6: RNA-stabilitet i blodprov vid 2-8 °C: FOS. Blodprov från 10 givare förvarades i angivet antal dagar vid 2-8 °C, innan total RNA isolerades. Alla prov togs i duplikat. **[A]** Blodprov togs och förvarades i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) och total RNA renades fram med PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Blodprov togs och förvarades i standardblodprovsrör med EDTA som antikoaguleringsmedel och total RNA renades fram med en organisk standardisoleringsmetod och silikonbaserad membran-RNA-upprening. Relativ FOS-transkriptionsnivå bestämdes via realtids duplex RT-PCR, med 18S-rRNA som intern standard. De analyserade provernas värden är angivna med medelvärde och standardavvikelse. Den streckade linjen anger området för analysens mätnoggrannhet $\pm 3 \times$ precision ($2,34 C_T$).



Figur 7: RNA-stabilitet i blodprov vid 2–8 °C: IL1B. Blodprov togs och total RNA renades fram efter förvaring vid 2–8°C så som beskrivs i figur 6. De relativa koncentrationerna IL1B-transkription bestämdes genom realtids duplex RT-PCR, med 18S-rRNA som intern standard. De analyserade provernas värden är angivna med medelvärde och standardavvikelse. Den streckade linjen anger området för analysens mät noggrannhet $\pm 3 \times$ precision (1,93 C_T).

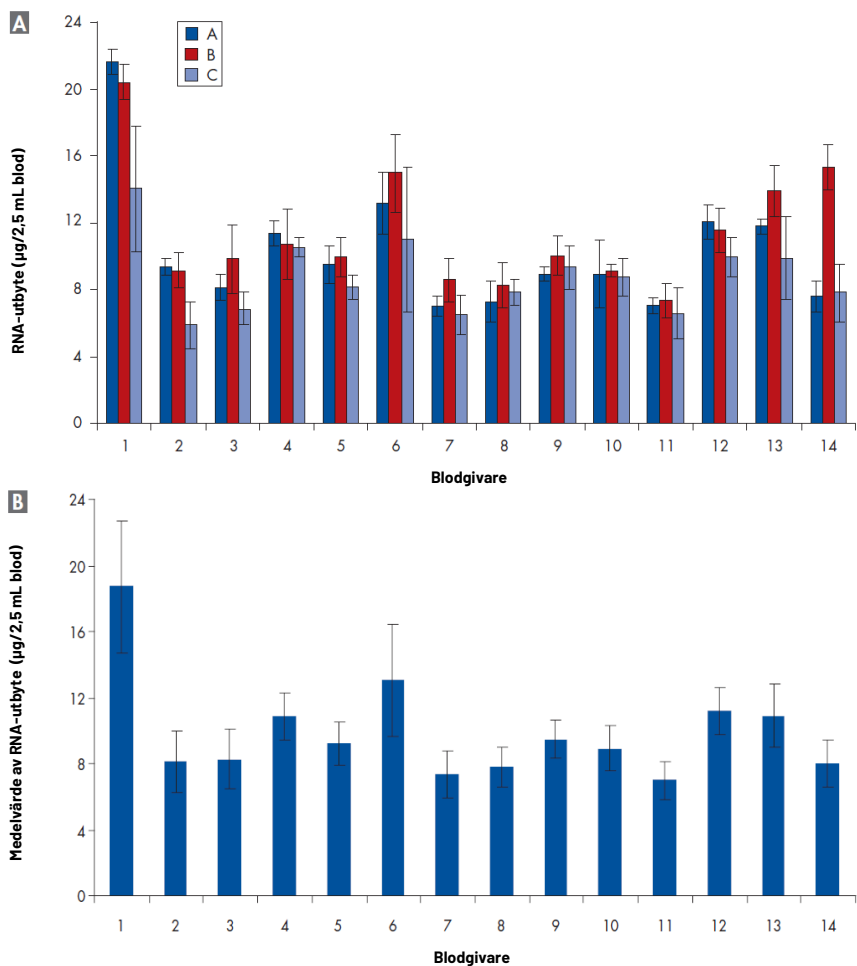
Manuell RNA-isolering

Total RNA som isolerats med PAXgene Blood RNA System är ren. Med det manuella protokollet ligger A_{260}/A_{280} -värdena mellan 1,8 och 2,2 och ≤ 1 % (w/w) genomiskt DNA finns i ≥ 95 % av alla prover, uppmätt med kvantitativ real-time PCR av en sekvens i beta-aktinengen. Minst 95 % av proverna visar ingen hämning i RT-PCR när eluatet utgör upp till 30 % av RT-PCR-reaktionsvolymen.

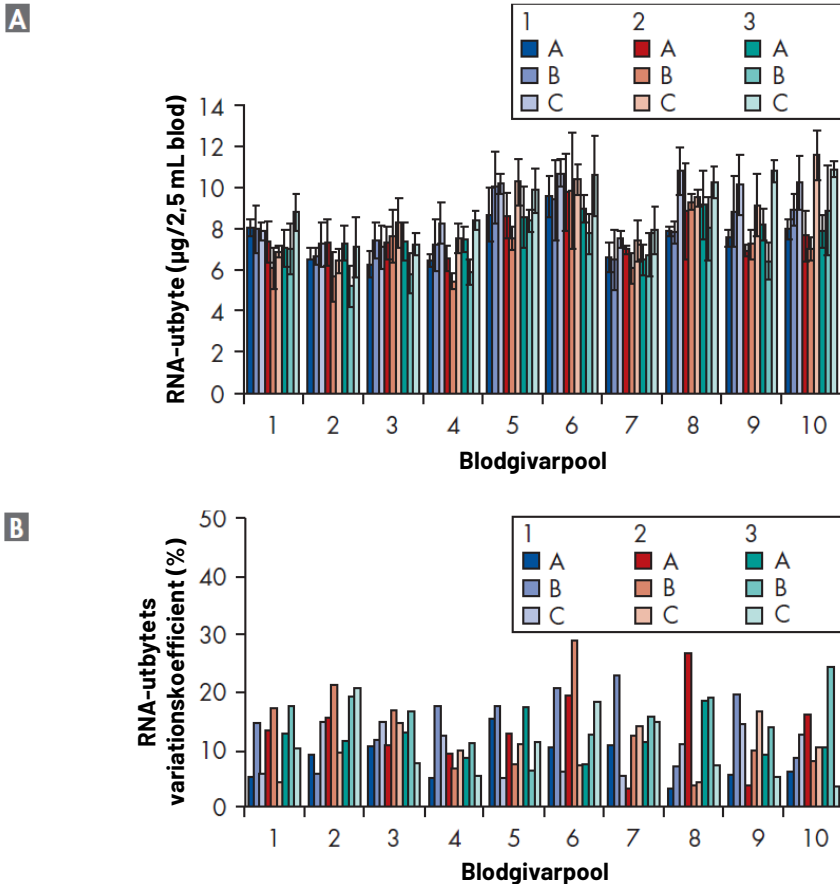
Vid användning av det manuella protokollet är den genomsnittliga tiden för provberedning (baserat på data från 12 provberedningskörningar) ca 90 min*. Därav utgör ren hanteringstid ca 40 min. Hos ≥ 95 % av de bearbetade proven är RNA-utbytet av friska givare ≥ 3 μ g ur 2,5 mL helblod. Eftersom utbytet till stor del beror på givaren, kan det enskilda RNA-utbytet variera. Vid undersökning av enskilda blodgivare ger PAXgene Blood RNA System mycket reproducerbara och repeterbara resultat (figur 8 och figur 9, sidan 45 respektive 46) samt reproducerbar och repeterbar RT-PCR (figur 10 och figur 11, sidan 50 respektive 51), vilket gör att den är robust för kliniska diagnostiska tester.

Figur 8 (sidan 45) visar övergripande repeterbarhet och reproducerbarhet hos PAXgene Blood RNA System. Ytterligare studier gjordes för att visa hur olika lotnummer av PAXgene Blood RNA Kit och olika användare påverkar RNA-utbytets reproducerbarhet och real-time RT-PCR-resultatet. Eftersom poolade blodprov användes för dessa studier istället för enskilda PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) återspeglar resultatet inte systemets repeterbarhet, inklusive fluktuationer mellan olika blodtagningar, utan endast repeterbarheten hos provberedningen (se figur 9, sidan 46).

* Total protokollkörstid, inklusive initial hantering av PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugeringar, pellettvätt och pelletåtersuspendering).



Figur 8: Reproducerbar och repeterbar RNA-isolering. Fyra replikat av blodproven från 14 givare bearbetades manuellt av 3 olika laboranter (A, B, C). Därvid användes tre olika satser laboratorieutrustning, varvid en laborant endast använde en och samma utrustningssats för provbearbetningen. [A] Genomsnittligt RNA-utbyte och standardavvikelse per replikatprov från samma blodgivare och olika laboratortekniker visas. [B] Tolv blodprovreplikater från 14 blodgivare behandlades av 3 olika laboratortekniker. Genomsnittligt RNA-utbyte och standardavvikelse per prov från samma blodgivare och alla laboratortekniker visas. Hos alla RNA-proven låg A_{280}/A_{280} -absorbansförhållandet mellan 1,8 och 2,2.



Figur 9: Repeterbarhet och reproducerbarhet av RNA-utbyte med olika laboranter och olika lotnummer av PAXgene Blood RNA Kit med poolade blodprov. Blodprov från 30 givare samlades i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)(12 rör per givare, dvs. totalt 360 rör). Innehållet i alla rör av vardera 3 givare blev poolat och i anslutning åter alikvoterat till 36 prov. Dessa 36 prov per pool av tre givare upparbetades manuellt av tre olika laboranter. Varje laborant använde PAXgene Blood RNA Kit ur tre olika lotnummer för isoleringen av RNA och bearbetade fyra replikat ur var och en av de tio blodgivarpoolerna. **[A]** RNA-utbyte och standardavvikelse för varje laborant-lot-kombination. Fyra replikat av blodproven från 10 givare genomfördes av tre olika laboranter (A, B, C), med vars tre sats-lotnummer (1, 2, 3). Avbildat är det genomsnittliga utbytet (kolonner) och standardavvikelsen (felbalkar) per fyra replikat från en och samma givarpool för olika laboranter och sats-lotnummer. **[B]** RNA-utbytets variationskoefficient (CV) per blodgivarpool för alla kombinationer av laborant-lotnummer (A, B, C; 1, 2, 3) beräknat från genomsnittligt utbyte och standardavvikelse som visas i figur 9A.

Tabell 1A: Reproducerbarhet inom varje lot och för varje användare för utvalda blodgivarpooler (1, 6, 9, 10)

| Kombination av data | Givarpool 1 ($5,1 \times 10^6$ celler/mL) | | | Givarpool 6 ($6,5 \times 10^6$ celler/mL) | | |
|---------------------|--|----------------------|--------|--|----------------------|--------|
| | Genomsnittligt utbyte (μg) | SD (μg) | CV (%) | Genomsnittligt utbyte (μg) | SD (μg) | CV (%) |
| Lot 1, användare A | 8,03 | 0,42 | 5 | 9,55 | 0,99 | 10 |
| Lot 1, användare B | 7,98 | 1,17 | 15 | 9,38 | 1,94 | 21 |
| Lot 1, användare C | 7,87 | 0,45 | 6 | 10,71 | 0,65 | 6 |
| Lot 2, användare A | 7,32 | 0,98 | 13 | 9,78 | 1,89 | 19 |
| Lot 2, användare B | 6,09 | 1,04 | 17 | 9,82 | 2,83 | 29 |
| Lot 2, användare C | 6,87 | 0,31 | 4 | 10,37 | 0,74 | 7 |
| Lot 3, användare A | 7,04 | 0,90 | 13 | 8,96 | 0,68 | 8 |
| Lot 3, användare B | 6,98 | 1,22 | 17 | 7,73 | 0,97 | 13 |
| Lot 3, användare C | 8,78 | 0,89 | 10 | 10,59 | 1,94 | 18 |
| Kombination av data | Givarpool 9 ($8,4 \times 10^6$ celler/mL) | | | Givarpool 10 ($10,2 \times 10^6$ celler/mL) | | |
| | Genomsnittligt utbyte (μg) | SD (μg) | CV (%) | Genomsnittligt utbyte (μg) | SD (μg) | CV (%) |
| Lot 1, användare A | 7,52 | 0,41 | 6 | 7,96 | 0,49 | 6 |
| Lot 1, användare B | 8,82 | 1,72 | 19 | 8,90 | 0,76 | 9 |
| Lot 1, användare C | 10,14 | 1,46 | 14 | 10,22 | 1,29 | 13 |
| Lot 2, användare A | 6,92 | 0,27 | 4 | 7,63 | 1,23 | 16 |
| Lot 2, användare B | 7,20 | 0,71 | 10 | 7,00 | 0,56 | 8 |
| Lot 2, användare C | 9,14 | 1,52 | 17 | 11,56 | 1,21 | 10 |
| Lot 3, användare A | 8,18 | 0,76 | 9 | 7,85 | 0,82 | 10 |
| Lot 3, användare B | 6,41 | 0,88 | 14 | 8,88 | 2,17 | 24 |
| Lot 3, användare C | 10,78 | 0,56 | 5 | 10,88 | 0,37 | 3 |

Tabell 1B: Reproducerbarhet för varje användare och mellan alla lotnummer för valda givarpooler (1, 6, 9, 10)

| Kombination av data | Givarpool 1 ($5,1 \times 10^6$ celler/mL) | | | Givarpool 6 ($6,5 \times 10^6$ celler/mL) | | |
|-----------------------------|--|----------------------|--------|--|----------------------|--------|
| | Genomsnittligt utbyte (μg) | SD (μg) | CV (%) | Genomsnittligt utbyte (μg) | SD (μg) | CV (%) |
| Användare A, alla lotnummer | 7,46 | 0,85 | 11 | 9,43 | 1,22 | 13 |
| Användare B, alla lotnummer | 7,02 | 1,31 | 19 | 8,98 | 2,09 | 23 |
| Användare C, alla lotnummer | 7,84 | 0,98 | 13 | 10,56 | 1,15 | 11 |
| | Givarpool 9 ($8,4 \times 10^6$ celler/mL) | | | Givarpool 10 ($10,2 \times 10^6$ celler/mL) | | |
| | Genomsnittligt utbyte (μg) | SD (μg) | CV (%) | Genomsnittligt utbyte (μg) | SD (μg) | CV (%) |
| Användare A, alla lotnummer | 7,54 | 0,72 | 10 | 7,81 | 0,82 | 11 |
| Användare B, alla lotnummer | 7,48 | 1,50 | 20 | 8,26 | 1,54 | 19 |
| Användare C, alla lotnummer | 10,02 | 1,34 | 13 | 10,89 | 1,10 | 10 |

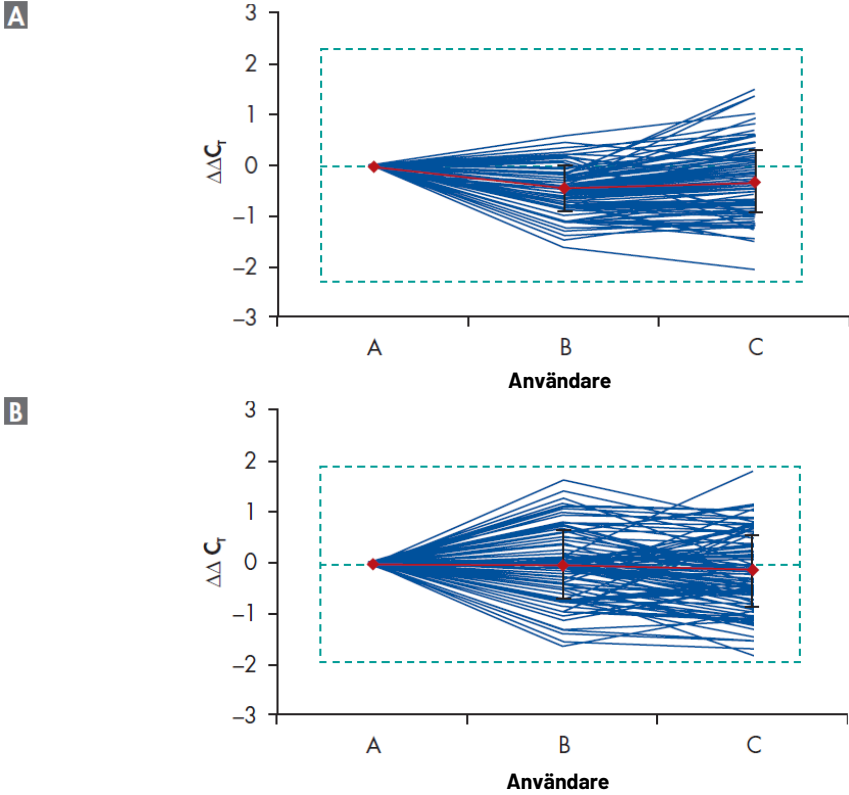
Tabell 1C: Reproducerbarhet inom varje lot och för varje användare för valda givarpooler (1, 6, 9, 10)

| Kombination av data | Givarpool 1 ($5,1 \times 10^6$ celler/mL) | | | Givarpool 6 ($6,5 \times 10^6$ celler/mL) | | |
|-----------------------|--|----------------------|--------|--|----------------------|--------|
| | Genomsnittligt utbyte (μg) | SD (μg) | CV (%) | Genomsnittligt utbyte (μg) | SD (μg) | CV (%) |
| Lot 1, alla användare | 7,96 | 0,69 | 9 | 9,88 | 1,34 | 14 |
| Lot 2, alla användare | 6,76 | 0,93 | 14 | 9,99 | 1,84 | 18 |
| Lot 3, alla användare | 7,60 | 1,27 | 17 | 9,09 | 1,71 | 19 |
| | Givarpool 9 ($8,4 \times 10^6$ celler/mL) | | | Givarpool 10 ($10,2 \times 10^6$ celler/mL) | | |
| | Genomsnittligt utbyte (μg) | SD (μg) | CV (%) | Genomsnittligt utbyte (μg) | SD (μg) | CV (%) |
| Lot 1, alla användare | 8,83 | 1,63 | 19 | 9,02 | 1,27 | 14 |
| Lot 2, alla användare | 7,75 | 1,36 | 18 | 8,73 | 2,31 | 26 |
| Lot 3, alla användare | 8,46 | 1,99 | 24 | 9,20 | 1,80 | 20 |

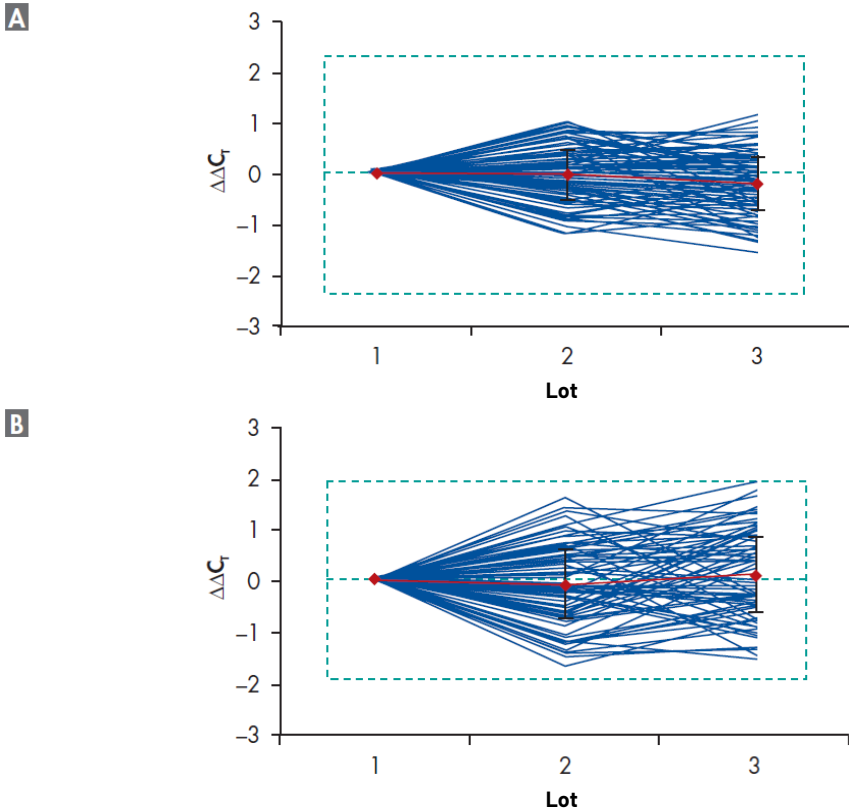
Tabell 1D: Reproducerbarhet mellan alla lotnummer och alla användare för valda givarpooler (1, 6, 9, 10)

| Kombination av data | Givarpool 1 ($5,1 \times 10^6$ celler/mL) | | | Givarpool 6 ($6,5 \times 10^6$ celler/mL) | | |
|-----------------------|--|----------------------|--------|--|----------------------|--------|
| | Genomsnittligt utbyte (μg) | SD (μg) | CV (%) | Genomsnittligt utbyte (μg) | SD (μg) | CV (%) |
| Lot 1, alla användare | 7,44 | 1,09 | 15 | 9,66 | 1,65 | 17 |
| | Givarpool 9 ($8,4 \times 10^6$ celler/mL) | | | Givarpool 10 ($10,2 \times 10^6$ celler/mL) | | |
| | Genomsnittligt utbyte (μg) | SD (μg) | CV (%) | Genomsnittligt utbyte (μg) | SD (μg) | CV (%) |
| Lot 1, alla användare | 8,35 | 1,70 | 20 | 8,99 | 1,80 | 20 |

Detaljerad analys av 4 representativa givarpooler. Poolerna valdes i enlighet med antalet vita blodkroppar och reflekterar de övre, mellersta och lägre värdena av det normala antalet vita blodceller ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocyter/mL). Antalet vita celler representerar medelvärdet av de tre vita blodcellsvärdena från 3 givare per givarpool.



Figur 10: Reproducerbarheten för RT-PCR – mellan användare. RNA som renats i experimentet som beskrivs i figur 9 användes för real-time RT-PCR. Relativa transkriptionsnivåer av [A] FOS och [B] IL1B bestämdes med realtids duplex RT-PCR, med 18S-rRNA som intern standard. Värdena för alla prover relativt till värdena för användare A (10 blodgivarpooler × 3 sats-lotnummer × 4 replikat = 120 datauppsättningar för varje gen) med medelvärde (röd linje) och standardavvikelse (svarta staplar) visas. Den streckade linjen anger ± 3 x total precision för analyserna (FOS: 2,34 C_T; IL1B: 1,93 C_T).



Figur 11: Reproducerbarheten hos RT-PCR – mellan sats-loter. RNA som renats i experimentet som beskrivs i figur 9 användes för real-time RT-PCR. Relativa transkriptionsnivåer av [A] FOS och [B] IL1B bestämdes med realtids duplex RT-PCR, med 18S-rRNA som intern standard. Avbildat är alla provernas värden relativt till värdena av satslot 1 (10 givarpooler \times 3 användare \times 4 replikat = 120 datauppsättningar för varje gen) med medelvärde (röd linje) och standardavvikelse (svart balk). Den streckade linjen anger $\pm 3 \times$ total precision för analyserna (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

Tabell 2: Sammanfattning av RT-PCR-data från figur 10 och figur 11

| Testsystem | FOS/ 18S rRNA-analys | | IL1B/18S rRNA-analys | |
|--|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| Jämförelse av data | Medelvärde ($\Delta\Delta C_T$) | \pm SD ($\Delta\Delta C_T$) | Medelvärde ($\Delta\Delta C_T$) | \pm SD ($\Delta\Delta C_T$) |
| Reproducerbarheten mellan alla lotnummer för varje laborant | | | | |
| Alla laboranter, lot 1-lot 1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Alla laboranter, lot 1-lot 2 | -0,03 | 0,48 | -0,07 | 0,66 |
| Alla laboranter, lot 1-lot 3 | -0,21 | 0,52 | 0,11 | 0,71 |
| Reproducerbarheten mellan alla lotnummer för varje laborant | | | | |
| Alla lotnummer, laborant A-laborant A | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Alla lotnummer, laborant A-laborant B | -0,46 | 0,44 | -0,06 | 0,69 |
| Alla lotnummer, laborant A-laborant C | -0,31 | 0,60 | -0,15 | 0,71 |

Användare: Teknisk assistent som genomförde experimenten.

Lot: Satsens lotnummer.

SD: Standardavvikelse.

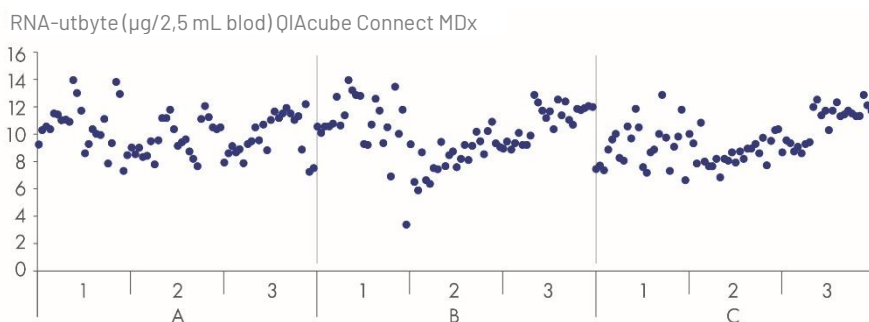
Genomsnittliga $\Delta\Delta C_T$ -värden (N = 120) och standardavvikelser för data visas i figur 10 och figur 11.

Automatiserad RNA-isolering

Hos ≥ 95 % av de bearbetade proven är RNA-utbytet av friska givare ≥ 3 μg ur 2,5 mL helblod. Figur 12 (sidan 53) anger RNA-utbytet från totalt 216 prover preparerade med det automatiserade protokollet med 3 sats-lotnummer av 3 användare. Eftersom poolade blodprov har använts istället för prov som tagits individuellt med PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) återspeglar resultaten inte det förväntade RNA-utbytet från enstaka prover av individuella blodtagningar. Eftersom utbytet till stor del beror på blodgivaren kan enskilt RNA-utbyte variera (se figur 12, sidan 53).

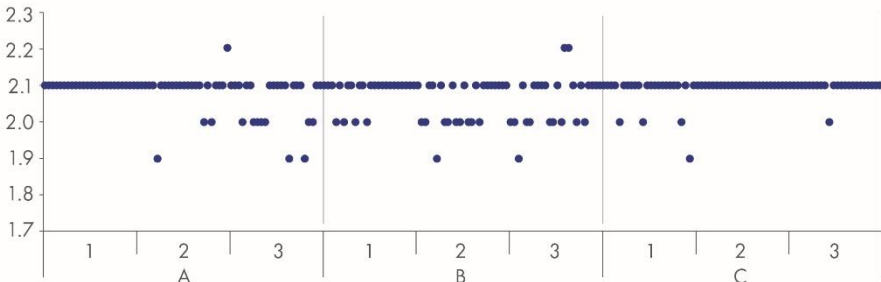
Minst 95 % av proverna visar ingen hämning i RT-PCR när eluatet utgör upp till 30 % av RT-PCR-reaktionsvolymen. Med det automatiska protokollet är korskontaminering mellan proverna oupptäckbar, om mätta som kvantitativa, real-time RT-PCR av sekvenser av ABL1- och FOS-transkriptioner i RNA-negativa prover (vatten) jämfört med RNA-positiva prover (humant helblod) i samma körning.

RNA som isolerats med PAXgene Blood RNA System och det automatiserade protokollet är rent, vilket visas genom bristen på RT-PCR-inhibition och A_{260}/A_{280} -värden mellan 1,8 och 2,2. Genomiskt DNA finns till $\leq 1\%$ (w/w) i $\geq 95\%$ av alla prover, vilket mätts med kvantitativ real-time PCR av en sekvens i beta-aktinogenen. Figur 13 och Figur 14 (sidan 54) visar A_{260}/A_{280} -värden och relativt genomiskt DNA från totalt 216 prover som preparerats med det automatiserade protokollet med 3 satslotnummer av 3 användare.



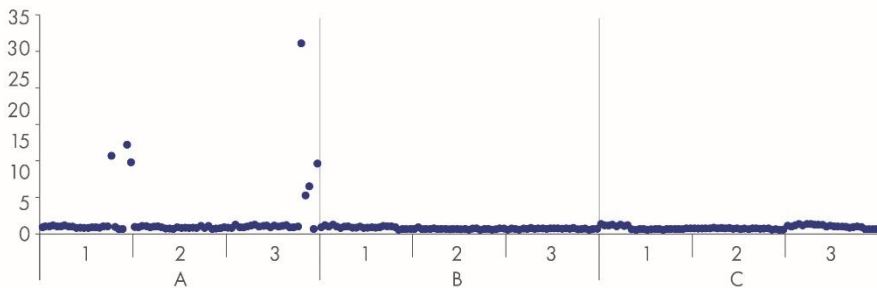
Figur 12: RNA-utbyte – automatisk bearbetning med QIAcube Connect MDx. Blodprov från enskilda blodgivare samlades in i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Rörens innehåll poolades i 6 blodgivarpooler och återalikvoterades därefter. Totalt 216 rör (dvs. 36 per pool) bearbetades av 3 olika användare (A, B, C). Varje användare använde PAXgene Blood RNA Kit från tre olika lotnummer (1, 2, 3) för automatiserad isolering med QIAcube Connect MDx och bearbetade fyra replikat från var och en av de 6 blodgivarpoolerna. RNA-utbytet för alla enskilda prover visas för varje kombination av användare-lotnummer.

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



Figur 13: RNA-renhet (A_{260}/A_{280} -värden) – automatiserad bearbetning med QIAcube Connect MDx. RNA renades av 3 olika användare (A, B, C) som använde 3 olika lotnummer (1, 2, 3) av PAXgene Blood RNA Kit med QIAcube Connect MDx i experimentet som beskrivs i figur 12. A_{260}/A_{280} -värden för alla enskilda prover visas för varje kombination av användare-lotnummer.

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



Figur 14: RNA-renhet (% kontamination av genomiskt DNA) – automatiserad bearbetning QIAcube Connect MDx. RNA renades av 3 olika användare (A, B, C) som använde 3 olika lotnummer (1, 2, 3) av PAXgene Blood RNA Kit med QIAcube Connect MDx i experimentet som beskrivs i figur 12. Mängd genomiskt DNA (w/w) i alla enskilda prover visas för varje kombination av användare-lotnummer.

Det automatiska protokollet för RNA-isolering med PAXgene Blood RNA System levererar reproducerbara och repeterbara RT-PCR-resultat, vilket gör det mycket användbart för kliniska undersökningar.

Stabilitet hos isolerat RNA

RNA-prover som isolerats från blod som fyllts med PAXgene Blood RNA Tubes med PAXgene Blood RNA Kit är stabila i 5 års lagring vid -20°C och 7 års lagring vid -70°C (slutpunkt för studierna).

Viktiga anmärkningar

Användning av QIAcube Connect MDx

Se till att du känner till hur man använder QIAcube Connect MDx. Läs instrumentets användarhandbok och annan information som medföljer instrumentet, och lägg särskilt märke till säkerhetsinformationen innan du påbörjar det automatiska PAXgene Blood RNA-protokollet.

Starta QIAcube Connect MDx

Stäng luckan på QIAcube Connect MDx och slå på instrumentet med strömbrytaren (se figur 15, sidan 57).

Ett pipande ljud hörs och startskärmen visas. Instrumentet utför initieringstester automatiskt.



Vy framifrån av QIAcube Connect MDx



Utdragen pekskärm



Vy bakifrån av QIAcube Connect MDx (vänster sida)



Vy bakifrån av QIAcube Connect MDx (höger sida)

Figur 15: Yttre funktioner hos QIAcube Connect MDx.

- 1 Pekskärm
- 2 Huv
- 3 Avfallslåda
- 4 Strömbrytare

- 5 2 USB-portar till vänster om pekskärmen, 2 USB-portar bakom pekskärmen (Wi-Fi-modulen är ansluten till 1 USB-port)
- 6 RJ-45 Ethernet-port
- 7 Elanslutning
- 8 Utlopp för kylluft

Pekskärm

QIAcube Connect MDx styrs via en pekskärm. Pekskärmen gör att användaren kan använda instrumentet och vägleder användaren genom arbetsbänkens inställningar. Under provbearbetningen visar pekskärmen protokollstatusen och återstående tid.




Figur 16: Utdragen pekskärm hos QIAcube Connect MDx.


Installation av protokoll på QIAcube Connect MDx

En initial protokollinstallation kan behövas innan den första RNA-prepareringskörningen kan göras på QIAcube Connect MDx. Installera de båda protokollen "PAXgene Blood RNA Part A" och "PAXgene Blood RNA Part B".

Protokoll för QIAcube Connect MDx finns på www.qiagen.com och måste laddas ned till USB-minnet som levereras med instrumentet. Dessa protokoll överförs till instrumentet via USB-porten.

Via USB-porten (placerad på sidan av pekskärmen, se figur 15, sidan 57) kan USB-minnet som medföljer instrumentet anslutas till QIAcube Connect MDx. Datafiler, som loggfiler och rapportfiler, kan också överföras via USB-porten från instrumenten till USB-minnet.

 USB-porten är endast avsedd att användas med QIAGEN:s USB-minne. Anslut inte andra enheter till denna port.

 Ta inte bort USB-minnet när du laddar ned protokoll, överför datafiler eller under en protokollkörning.


För mer information om hur man laddar upp protokoll till QIAcube Connect MDx, se instrumentets användarhandbok.


Laddning av QIAcube Connect MDx

För att spara tid kan laddningen göras under ett eller båda centrifugeringssteg på 10 min (steg 3 och 5) i "Protokoll: Automatisk isolering av total RNA från humant helblod i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)", sidan 31.

Reagensflaskor

Innan varje körning på QIAcube Connect MDx ska du fylla de 4 reagensflaskorna med de reagenser som anges i tabell 3 (sidan 60) upp till den maximala indikatornivån eller, om det inte är möjligt, till den nivå som buffertvolymerna i PAXgene Blood RNA Kit tillåter. Märk flaskor och lock tydligt med buffertnamn och placera de fyllda reagensflaskorna på lämpliga positioner i stället för reagensflaskor. Ladda stället på instrumentets arbetsbänk så som visas (figur 17 och figur 18, sidan 60 respektive 61).

 Den medföljande volymen BR2-buffert fyller inte en reagensflaska till indikatornivån. BR3- och BR4-buffertar kanske inte fyller flaskan till indikatornivån efter bearbetning av flera prover i tidigare körningar.

 Ta bort locken innan flaskorna placeras på arbetsbänken.



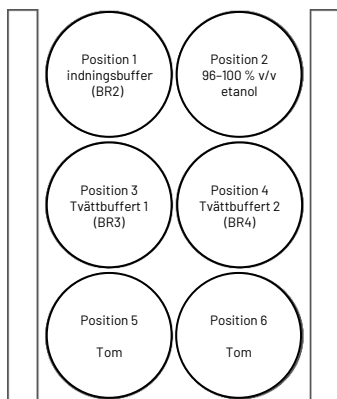
Buffertvolymerna i PAXgene Blood RNA Kit (50) räcker till maximalt 7 RNA-beredningskörningar på QIAcube Connect MDx, med 2 till 12 prov per körning. I allmänhet bör körningar med ett litet antal prover per körning undvikas för att bearbeta totalt 50 prover per sats. Fler än 7 RNA-beredningskörningar kan leda till otillräckliga buffertvolymmer för bearbetning av de sista proven.

Tabell 3: Positioner i reagensstället

| Position | Reagens |
|----------|------------------------|
| 1 | Bindningsbuffert (BR2) |
| 2 | Etanol (96-100 % v/v) |
| 3 | Tvättbuffert 1 (BR3) |
| 4 | Tvättbuffert 2 (BR4)* |
| 5 | – (lämna tom) |
| 6 | – (lämna tom) |

* Tvättbuffert 2 (BR4) levereras med satsen som koncentrat. Tillsätt den fyrfaldiga volymen etanol (96-100 % v/v, renhetsgrad p. a.) till flaskan (som etiketten anger) innan den används första gången för att framställa den bruksfärdiga arbetslösningen.

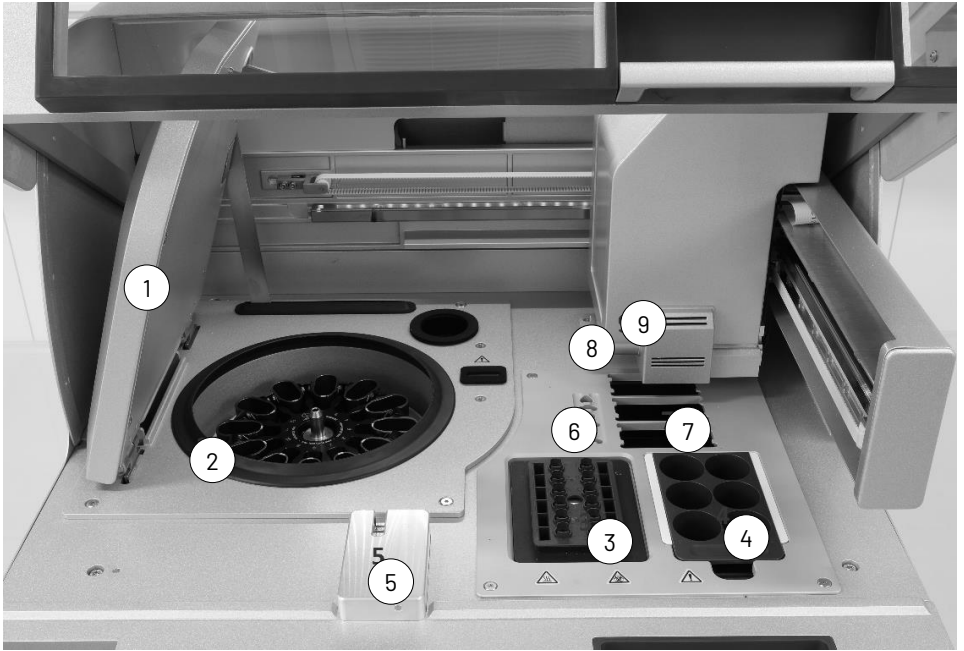
A



B



Figur 17: Laddning av stället för reagensflaskor. [A] Schema för positioner och innehåll i flaskorna i stället för reagensflaskor. [B] Laddning av stället på QIAcube Connect MDx.



Figur 18: QIAcube Connect MDx sedd inifrån.

- | | | | |
|---|-----------------------------|---|--|
| ① | Centrifuglock | ⑥ | MCT-fack |
| ② | Centrifug | ⑦ | Tre fack för spetsställ |
| ③ | Skakapparat | ⑧ | Kasseringsfack för spetsar och kolonner |
| ④ | Ställ för reagensflaskor | ⑨ | Robotarm (inklusive enkanalspipett, gripanordning, ultraljudssensor och optisk sensor samt UV LED) |
| ⑤ | Spetssensor och lås för huv | | |

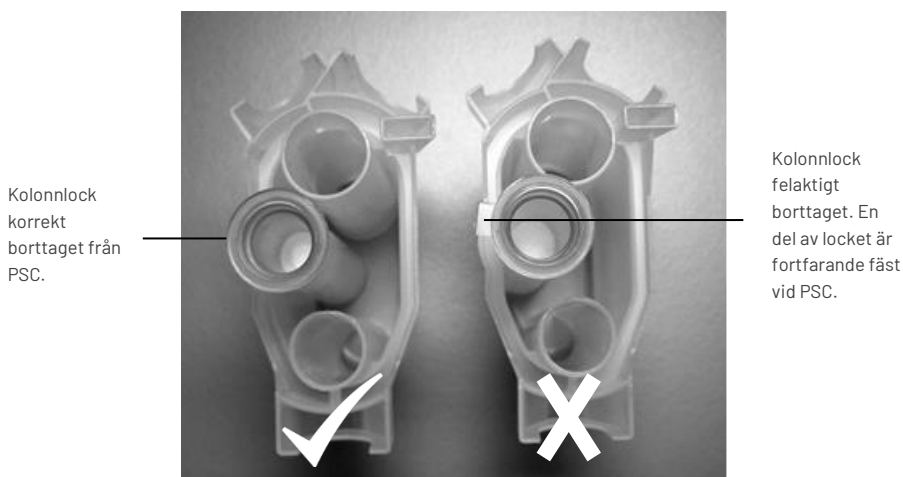
Kolonner (PSC, PRC), MCT och plastartiklar för QIAcube Connect MDx

Placera 2 spetshållare fyllda med filterspetsar 1 000 µL på QIAcube Connect MDx (se figur 18, sidan 61). Fyll vid behov på ställen med spetsar.

i Använd endast 1 000 µL filterspetsar som utformats för att användas med QIAcube Connect MDx.

Märk rotoradaptern och MCT för varje prov med en permanent märkpena. Öppna PSC:n som ska användas och klipp av locken helt med en sax (se figur 19).

i För att robotgripanordningen på QIAcube Connect MDx ska fungera korrekt ska du helt ta bort (klippa av) locken och alla plastdelar som ansluter locket till PSC:n (se figur 19). Annars kan robotgripanordningen inte gripa tag i PSC:n ordentligt.



Figur 19: Laddning av PSC:n. PSC:n laddas i mellanpositionen på rotoradaptern. Klipp av locket på PSC:n innan du laddar den.

Ladda PSC:n (utan lock, se figur 19, sidan 62), PRC och det märkta MCT i lämpliga positioner i var och en av de märkta rotoradaptorna såsom visas i tabell 4 och figur 20.

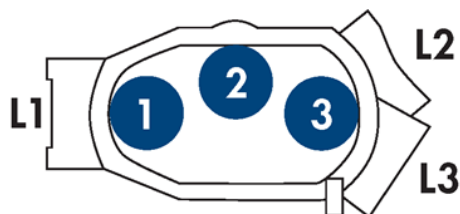


Se till att locken på kolonnen (PRC) och MCT är helt nedtryckta i botten på facken på rotoradaptorns kant, annars kommer locken att lossna vid centrifugering.

Tabell 4: Förbrukningsmaterial av plast i rotoradaptorn

| Position | Reagens | Lockposition |
|----------|--|--------------|
| 1 | PAXgene RNA-kolonn (röd, PRC) | L1 |
| 2 | PAXgene Shredder-kolonn (lila, PSC)(klipp av lock före placering i rotoradapter) | - |
| 3 | MCT* | L3 |

* Använd den MCT (1,5 mL) som medföljer PAXgene Blood RNA Kit.



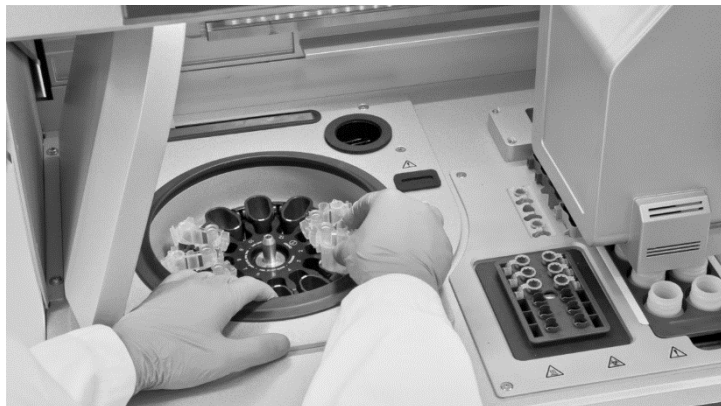
Figur 20: Positioner i rotoradaptorn. Rotoradaptorn har 3 rörpositioner (1-3) och 3 lockpositioner (L1-L3).

Laddning av centrifugen

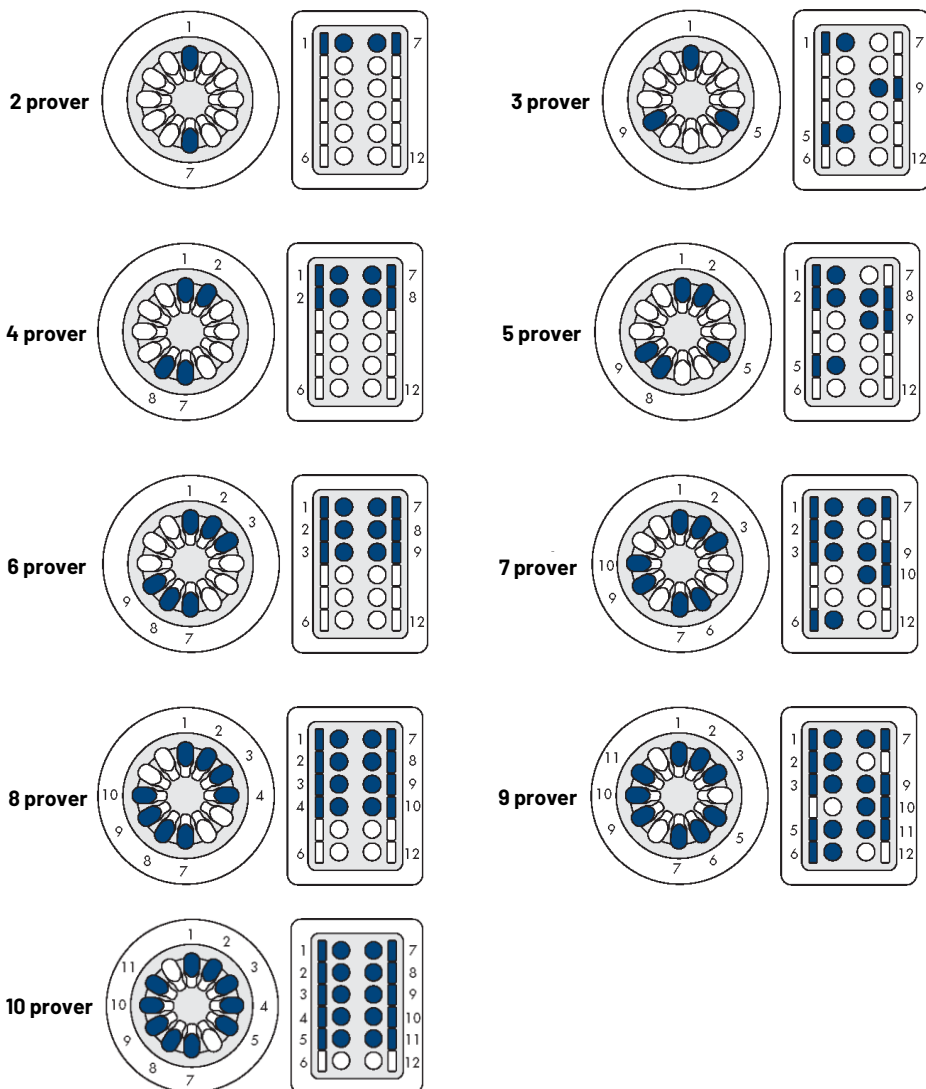
Ladda de hopmonterade rotoradaptrarna i centrifughållarna i QIAcube Connect MDx såsom visas i figur 21 nedan.



Om färre än 12 prover bearbetas ska du se till att centrifugrotorn laddas radialt balanserad (se figur 22, sidan 65). Alla centrifughållare måste sättas i innan protokollkörningen startas, även om färre än 12 prover skall bearbetas. Ett enda prov eller 11 prover kan inte bearbetas.



Figur 21: Laddning av centrifug på QIAcube Connect MDx. Ladda de monterade rotoradaptrarna i centrifugbägarna.



Figur 22: Laddning av centrifug och skakapparät. Centrifug- och skakpositioner visas för bearbetning av två (2) till tio (10) prover. Ett (1) eller 11 prover kan inte bearbetas. Vid bearbetning av 12 prover är alla centrifug- och skakpositioner laddade (bild visas ej).

Reaktionsrör

Ta bort alla PT som finns kvar i MCT-facken från tidigare körningar (se figur 18, sidan 61). Fyll 3 PT med den mängd reagens som anges i tabell 5 i enlighet med antalet prover i körningen.

För DNase I-inkubationsblandning ska du pipettera den angivna mängden DNA-digestionsbuffert (RDD) i ett PT och tillsätta den angivna mängden DNase (RNFD) stamlösning. Blanda försiktigt genom att pipettera den färdiga blandningen upp och ner 3 gånger med en 1 000 µL pipettspets.



Använd de 2 mL PT som ingår i PAXgene Blood RNA Kit. Märk rören tydligt med reagensnamn och placera dem i lämplig position i MCT-facken så som anges i tabell 6 (sidan 67).



DNase I (RNFD) är särskilt känsligt för fysisk denaturering. Blanda endast genom pipettering, använd pipettspetsar med bred cylinder för att minska skjuvning. En vortex bör inte användas för att blanda.

Se till att endast pipettera den mängd som anges i tabell 5 nedan.

Tabell 5: Mängden reagens som behövs i PT för MCT-facken

| Antal prover | Reagensvolym för det angivna antalet prover (µL) | | |
|--------------|--|------------------------------------|------------------------|
| | Proteinas K (PK) | DNase I inkubationsblandning | Elueringsbuffert (BR5) |
| 2 | 126 | 187 (23 DNase I + 164 Buffer RDD) | 313 |
| 3 | 170 | 261 (33 DNase I + 228 Buffer RDD) | 399 |
| 4 | 213 | 334 (42 DNase I + 292 Buffer RDD) | 486 |
| 5 | 256 | 407 (51 DNase I + 356 Buffer RDD) | 572 |
| 6 | 299 | 481 (60 DNase I + 421 Buffer RDD) | 658 |
| 7 | 342 | 554 (69 DNase I + 485 Buffer RDD) | 745 |
| 8 | 386 | 627 (78 DNase I + 549 Buffer RDD) | 831 |
| 9 | 429 | 701 (88 DNase I + 613 Buffer RDD) | 918 |
| 10 | 472 | 775 (97 DNase I + 678 Buffer RDD) | 1004 |
| 12 | 558 | 921 (115 DNase I + 806 Buffer RDD) | 1177 |

Tabell 6: MCT-fack

| | Position | | |
|-----------|---------------|------------------------------|------------------------|
| | A | B | C |
| Innehåll | Proteinas K | DNase I inkubationsblandning | Elueringsbuffert (BR5) |
| Behållare | Reaktionsrör* | Reaktionsrör* | Reaktionsrör* |

* Använd de 2 mL PT som ingår i PAXgene Blood RNA Kit.

Bortskaffning

För säkert bortskaffande efter provtagning och manuell RNA-isolering hänvisas till säkerhetsinformation och försiktighetsåtgärder på sidan 18 respektive 19.

För automatiserad RNA-isolering med QIAcube Connect MDx hänvisas dessutom till figur 21 och figur 22, sidan 64 respektive 65, som anger särskilda fack för bortskaffande av använda spetsar och kolonner.

Referenser

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.

Felsökningsguide

Den här felsökningsguiden kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som uppstår. Mer information finns på sidan med vanliga frågor på vårt tekniska supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Dessutom svarar teamet för QIAGEN teknisk service gärna på frågor om informationen och protokollen i denna handbok eller prov- och analysmetoder (för kontaktinformation, se sista sidan eller besök www.qiagen.com).

| Kommentarer och förslag | |
|--|--|
| RNA är nedbrutet | |
| a) RNase-kontamination |  Se till att inget RNase hamnar i reagenserna under proceduren eller efterföljande hantering (se Bilaga A, sidan 75). |
| Lågt RNA-utbyte | |
| b) Mindre än 2,5 mL blod har samlats i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) |  Se till att det samlas 2,5 mL blod vid blodtagningen i PAXgene Blood RNA Tube (BRT, se <i>PAXgene Blood RNA Tube-handboken</i>) |
| c) RNA-koncentration uppmätt i vatten |  RNA måste spädas i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* för korrekt kvantifiering (se Bilaga B, sidan 76). |
| d) Celldebris förs över till PRC i steg 9 och 10 av det manuella protokollet |  Undvik att föra över större partiklar när supernatanten pipetteras efter steg 7 av det manuella protokollet (små debris påverkar inte proceduren). |
| e) Supernatanten aspireras inte fullständigt efter steg 3 |  Se till att supernatanten aspireras fullständigt. Om supernatanten dekanteras, skall droppar på randen till PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tas bort med en pappershandduk. Genomför rimliga försiktighetsåtgärder för att undvika korskontaminering. |
| f) Efter blodtagning i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) inkuberas blodet i högst 2 h |  Inkubera blod i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i minst 2 h efter provtagning. |



* Använd alltid labbrock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS) som kan erhållas från produktens återförsäljare.

| Kommentarer och förslag | |
|--|--|
| Lågt A_{260}/A_{280}-värde | |
| g) Vatten används för att späda RNA för A_{260}/A_{280} -mätning |  <p>Använd 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 för spädning av RNA innan renheten mäts* (se Bilaga B, sidan 76).</p> |
| h) Spektrofotometern är inte korrekt nollställd |  <p>För att ställa in spektrofotometerns nollpunkt skall ett blankprov (blank) användas, vars sammansättning av elueringsbuffert (BR5) och 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, motsvarar proven som skall mätas. Elueringsbufferten (BR5) absorberar kraftigt vid 220 nm, vilket kan leda till höga bakgrundsabsorbansvärden om spektrofotometerns nollpunkt inte har ställts in korrekt.</p> |
| Instrumentfel | |
| i) QIAcube Connect MDx fungerade inte korrekt | Läs <i>QIAcube Connect MDx User Manual</i> och lägg särskilt märke till avsnittet Felsökning. Se till att instrumentet är korrekt underhållet enligt beskrivningen i användarhandboken. |

* 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.

Symboler

Följande symboler kan finnas i bruksanvisningen eller på förpackningar och etiketter. Ytterligare symboler förklaras i Satsinnehåll (sidan 6).

| Symbol | Symbolförklaring |
|---|---|
| V<N1> | Version <N1> av produkten |
|  <N2> | Innehåller tillräckligt med reagenser för <N2> test |
|  | Läs bruksanvisningen |
|  | Utgångsdatum |
| IVD | In vitro-diagnostisk medicinteknisk enhet |
| REF | Katalognummer |
| LOT | Lotnummer |
| MAT | Materialnummer |
| COMP | Komponenter |
| NUM | Antal |
| KU | Kunitz units |
| ADD | Tillsätta |
| CONT | Innehåller |
| RCNS | Rekonstituerad |

DNase

Deoxyribonukleas I

EtOH

Etanol

GITC

Guanidinisotiocyanat

RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

GTIN

GS-artikelnnummer



Temperaturbegränsning



Övre temperaturgräns



Tillverkare

EC REP

Europeisk auktoriserad representant enligt förordning (EU) 2017/746



Viktig anmärkning



Tillsats av etanol



CE-märkning. Den här produkten uppfyller kraven i förordning (EU) 2017/746 för in vitro-diagnostiska medicintekniska enheter.

UDI

Unik enhetsidentifierare



Försiktighet



WARNING: Mycket varm yta

Kontaktinformation

Vi på QIAGEN är stolta över vår tekniska supports kvalitet och tillgänglighet. Erfarna vetenskapare på vår tekniska serviceavdelning hjälper gärna vid frågor angående PreAnalytiX produkter. Kontakta oss om du har frågor angående PAXgene Blood RNA Kit.

För teknisk support och ytterligare information är du välkommen att besöka vårt tekniska supportcenter på www.qiagen.com/Support, ringa oss på 00800-22-44-6000 eller kontakta QIAGEN teknisk service eller en lokal distributör (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Bilaga A: Allmänna hänvisningar angående RNA-hantering

Arbeta med RNA



Ribonukleaser (RNaser) är mycket motståndskraftiga och aktiva enzymer, som normalt inte behöver kofaktorer för att fungera. RNaser är svåra att inaktivera och även små mängder kan bryta ner RNA. Använd därför inga laboriematerial av glas eller plast utan att först eliminera eventuell RNase-kontamination. Se till att inga RNase-kontaminationer kan tillkomma på RNA-proven under eller efter isoleringsproceduren. För att skapa och bevara en RNase-fri omgivning bör de påföljande försiktighetsåtgärderna följas vid förbehandling och bruk av engångs- och flergångsbehållare och lösningar vid arbete med RNA.

Allmän hantering



Arbetet med RNA ska alltid följa principerna för korrekt mikrobiologisk aseptiska teknik. Händer och dammpartiklar kan bära på bakterier och mögelsvampar, vilket är de vanligaste orsakerna till RNase-kontaminering. För att undvika RNase-kontaminering via hud eller dammig laborieutrustning ska du alltid bära latex- eller vinylhandskar vid hantering av reagenser och RNA-prover. Byt laboriehandskarna ofta och stäng alltid alla rör direkt efter användning. Låt renat RNA ligga kvar på is, om aliquoter pipetteras för nedströmstillämpningar.

Protokoll för att ta bort RNase-kontaminering från glasmaterial och lösningar finns i allmänna molekylärbiologiska metodböcker som t.ex. Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Bilaga B: Kvantifiering av mängd och kvalitet av Total RNA

Kvantifiering av mängden RNA

Koncentrationen av RNA ska bestämmas genom mätning av absorbansen vid 260 nm (A_{260}) i en spektrofotometer. Absorbansvärdena skall ligga i spektrofotometerens linjära område för att ge en så noggrann mätning som möjligt. En absorbans på 1 enhet vid 260 nm motsvarar 44 µg RNA per mL ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/mL}$). Detta förhållande gäller endast för mätningar i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Om det är nödvändigt att späda RNA-provet skall det därför göras i 10 mM Tris-HCl. Så som anges nedan (se "RNA-renhet", sidan 77) ger förhållandet mellan absorbansvärdena vid 260 nm och 280 nm ett mått på RNA-renhet. Se till att kyvetterna som används för mätning av RNA-prov är RNase-fria. För att ställa in spektrofotometerens nollpunkt skall ett blankprov (blank) användas, vars sammansättning av elueringsbuffert (BR5) och Tris-HCl-buffert motsvarar proven som skall mätas. Elueringsbufferten (BR5) absorberar kraftigt vid 220 nm, vilket kan leda till höga bakgrundsabsorbansvärden om spektrofotometerens nollpunkt inte har ställts in korrekt. Nedan finns ett exempel på hur RNA-kvantifieringen beräknas.

| | | |
|--|---|---|
| RNA-provets volym | = | 80 µL |
| Spädning (1/15) | = | 10 µL RNA-prov + 140 µL 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 |
| Mät absorbans av utspätt prov i en kyvett (RNase-fri). | | |
| A_{260} | = | 0,3 |
| Provets koncentration | = | $44 \times A_{260} \times \text{spädningsfaktor}$ |
| | = | $44 \times 0,3 \times 15$ |
| | = | 198 µg/mL |
| Totalt utbyte | = | koncentration \times provvolym i milliliter |
| | = | 198 µg/mL \times 0,08 mL |
| | = | 15,8 µg RNA |

* Använd alltid labbrock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS) som kan erhållas från produktens återförsäljare.

RNA-renhet

Förhållandet mellan absorbansvärdena vid 260 och 280 nm (A_{260}/A_{280}) är ett mått på RNA-renheten avseende kontaminanter som absorberar UV, som t.ex. protein. A_{260}/A_{280} -förhållandet beror dock till stor del på pH-värdet. Lägre pH-värde resulterar i ett lägre A_{260}/A_{280} -förhållande och minskad känslighet för proteinkontaminering.* För korrekta värden rekommenderar vi absorbansmätningar i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Ren RNA har ett A_{260}/A_{280} -förhållande på 1,8–2,2 i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. För att ställa in spektrofotometerens nollpunkt skall ett blankprov (blank) användas, vars sammansättning av elueringsbuffert (BR5) och Tris-HCl-buffert motsvarar proven som skall mätas. Elueringsbufferten (BR5) absorberar kraftigt vid 220 nm, vilket kan leda till höga bakgrundsabsorbansvärden om spektrofotometerens nollpunkt inte har ställts in korrekt.

* 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.

Bilaga C: Hantering av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Följande rekommendationer från BD kan vara hjälpsamma vid hantering av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Se *PAXgene Blood RNA Tube-handboken* för mer information om PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Anvisningar för borttagning av BD Hemogard-säkerhetsförslutning

1. Ta tag i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) med ena handen och placera tummen under BD Hemogard-säkerhetsförslutningen. (Ytterligare stabilitet kan uppnås om underarmen stöds mot en fast yta.) Skruva av BD Hemogard-förslutningen med ena handen, samtidigt som du med den andra handens tumme trycker uppåt endast till proppen i röret lossnar.
2. Ta bort tummen innan förslutningen tas av. Använd inte tummen för att trycka av förslutningen från PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Försiktighet: Om PAXgene Blood RNA Tube (BRT) innehåller blod, utgör detta en potentiell infektionsrisk. För att undvika att skada sig när förslutningen tas bort, är det viktigt att ta bort tummen (med vilken förslutningen trycks upp) från PAXgene Blood RNA Tube (BRT), så snart BD Hemogard-förslutningen lossnar.
3. Lyft av förslutningen från PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Om det mycket osannolika inträffar att plasthöljet lossnar från gummiproppen, försök inte att sätta ihop förslutningen igen. Avlägsna försiktigt gummiproppen från PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Beskrivning om återförslutning med en sekundär BD Hemogard-säkerhetsförslutning

1. Sätt en ny förslutning på PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Skruva och tryck samtidigt ned proppen på röret tills det sitter ordentligt. Proppen skall tryckas in fullständigt så att förslutningen sitter säkert på PAXgene Blood RNA Tube (BRT) vid hantering.

Beställningsinformation

| Produkt | Innehåll | Kat.nr. |
|--|--|---------------|
| PAXgene Blood RNA Kit (50) | 50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, Reaktionsrör, RNase-fri DNase I, RNase-fria reagenser och buffertar. För att användas tillsammans med PAXgene Blood RNA Tubes | 762174 |
| PAXgene Blood RNA Tubes (100) | 100 blodtagingsrör | 762165 |
| Relaterade produkter som kan beställas från QIAGEN för automatiserad RNA-isolering på QIAcube | | |
| Starter Pack, QIAcube | Förpackningen innehåller: reagensflaskställ (3); etikettremсор (8); 200 µL-filterspetsar (1024); 1 000 µL filterspetsar (1024); 1 000 µL filterspetsar, bred cylinder (1024); 30 mL reagensflaskor (18); rotoradapterar (240); rotoradapterhållare | 990395 |
| Filter-Tips, 1000 µL (1024) | Sterila engångsfilterspetsar, i ställ | 990352 |
| Reagent Bottles, 30 mL (6) | Reagent Bottles (30 mL) med lock; 6-pack; för användning med QIAcube reagensflaskställ | 990393 |
| Rotor Adapters (10 × 24) | För 240 preparationer: 240 rotoradapterar för engångsbruk för QIAcube | 990394 |
| Reagent Bottle Rack | Ställ med plats för 6 × 30 mL reagensflaskor på QIAcube-arbetsbänk | 9026197 |
| Rotor Adapter Holder | Hållare för 12 rotoradapterar för engångsbruk för QIAcube | 990392 |
| Relaterade produkter som kan beställas från BD för blodprovtagning med PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)* | | |
| BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set | 21G, 0,75 tums-kanyler (0,8 × 19 mm), 12 tums-slang (305 mm) med luer-adapter; 50 per box, 200 per behållare | 367286/367281 |

| Produkt | Innehåll | Kat.nr. |
|---|---|---------------|
| BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set | 21G 3/4 tum (0,8 × 19 mm) nål, 12 tum (305 mm) slang med lueradapter. 50/box, 200/behållare | 367344 |
| BD Vacutainer One-Use Holder | Behållare endast för 13 mm och 16 mm diameter; 1 000/behållare | 364815 |
| BD Vacutainer Plus Serum Tubes | 13 × 75 mm 4,0 mL, med röd BD Hemogard-säkerhetsförslutning och pappersetikett; 100/box, 1 000/behållare | 368975/367812 |
| BD Vacutainer EST Tube | 13 × 75 mm 3,0 mL med färglös BD Hemogard-säkerhetsförslutning och genomskinlig etikett; 100/box, 1 000/behållare | 362725 |
| BD Vacutainer No Additive (Z) Tube | 13 × 75 mm 3,0 mL, med färglös BD Hemogard-säkerhetsförslutning och pappersetikett; 100/box, 1 000/behållare | 366703 |

* Dessa blodprovtagningstillbehör är typiska produkter som kan användas tillsammans med PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Mer information, inklusive beställningsinformation för dessa tillbehör, finns på www.preanalytix.com.

Dokumentrevisioner

| Datum | Ändringar |
|--------------------|---|
| [R1] april 2022 | Första IVDR-utgåva |
| [R2] februari 2023 | Gatuadressen för PreAnalytiX GmbH ändrades från Feldbachstrasse till Garstligweg 8. BD-produkter lades till under Beställningsinformation. Uppdaterad säkerhetsinformation. |

Anmärkningar



Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler finns i respektive bruksanvisning eller handbok för PreAnalytiX eller QIAGEN kit. Bruksanvisningar och handböcker för PreAnalytiX- och QIAGEN-kit finns tillgängliga på www.preanalytix.com och www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGEN teknisk service eller från din lokala återförsäljare.

**Better samples
More to explore**

 **PreAnalytiX**
A QIAGEN / BD Company

Läs mer på: www.preanalytix.com

HB-3009-002 02/2023

Beställning www.qiagen.com/shop | Teknisk support: www.support.qiagen.com | Webbplats www.qiagen.com
eller www.preanalytix.com