

Fevereiro de 2023

# Manual do PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA Kit Instruções de uso



Versão 3 (V3)

IVD

Para uso em diagnóstico in vitro



REF

762174



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

Produzido por QIAGEN<sup>®</sup> GmbH for PreAnalytiX GmbH

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

R2

MAT

1130774PTBR

Marcas registradas: 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. Salvo indicação em contrário, PreAnalytiX, o logotipo PreAnalytiX e todas as outras marcas comerciais são propriedade da PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH.

### Acordo de Licença Limitada do PAXgene Blood RNA Kit

O uso deste produto implica a aceitação, por parte de qualquer comprador ou usuário do produto, dos seguintes termos:

1. O produto deverá ser usado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e com o presente manual e recorrendo ao uso exclusivo de componentes contidos no painel. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a PreAnalytiX® não concede nenhuma licença para usar ou incorporar os componentes deste painel com quaisquer componentes não incluídos nele, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, no presente manual e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) e [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).
2. Além das licenças expressamente declaradas, a PreAnalytiX não garante que este kit e/ou seu(s) uso(s) não viole(m) os direitos de terceiros.
3. Este kit é licenciado para uso único e não pode ser reutilizado, reconstruído ou revendido.
4. A PreAnalytiX especificamente se isenta de quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, além daquelas expressamente declaradas.
5. O comprador e o usuário do kit concordam em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam levar a ou facilitar qualquer um dos atos acima proibidos.
6. A PreAnalytiX pode fazer cumprir as proibições deste Contrato de Licença Limitada em qualquer Tribunal e irá recuperar todos seus custos de investigação e custas judiciais, incluindo honorários advocatícios, em qualquer ação destinada a fazer cumprir este Contrato de Licença Limitada ou qualquer um de seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, visite os sites [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) e [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

HB-3009-002 BD-8945 1130774PTBR © 2023 PreAnalytiX GmbH, todos os direitos reservados.

## Distribuidores PreAnalytiX

Os produtos PreAnalytiX são fabricados e distribuídos pela QIAGEN e pela BD para a PreAnalytiX.

# Conteúdo

Conteúdo .....	3
Uso previsto .....	6
Usuário previsto .....	6
Descrição e princípio .....	7
Introdução .....	7
Princípio e procedimento .....	7
Coleta e estabilização de amostras .....	8
Isolamento de RNA .....	8
Isolamento manual de RNA .....	9
Isolamento automatizado de RNA .....	11
Materiais fornecidos .....	14
Conteúdo do kit .....	14
Componentes do kit .....	15
Materiais necessários, mas não fornecidos .....	16
Para todos os protocolos .....	16
Para o protocolo manual .....	17
Para o protocolo automatizado .....	17
Avisos e precauções .....	19
Informações de segurança .....	19
Informações de emergência .....	19
Precauções .....	20
Armazenamento e manuseio de reagentes .....	23

Estabilidade em uso .....	23
Transporte, armazenamento e manuseio de espécimes.....	24
Protocolo: Isolamento manual de RNA total de sangue total humano coletado em PAXgene Blood RNA Tubes.....	25
Protocolo: Isolamento automatizado de RNA total de sangue total humano coletado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	33
Limitações de uso do produto .....	40
Controle de qualidade.....	40
Características de desempenho .....	41
Coleta e estabilização de amostras .....	41
Isolamento manual de RNA.....	46
Isolamento automatizado de RNA.....	55
Estabilidade do RNA isolado.....	58
Notas importantes .....	59
Usando o QIAcube Connect MDx .....	59
Iniciando o QIAcube Connect MDx.....	59
Instalando protocolos no QIAcube Connect MDx .....	61
Carregando o QIAcube Connect MDx.....	62
Material plásticos de colunas de centrifugação (PSC, PRC), MCT e QIAcube Connect MDx .....	65
Descarte .....	71
Referências.....	72
Guia de solução de problemas .....	73
Símbolos .....	75
Informações de contato .....	77

Anexo A: Observações gerais sobre o manuseio de RNA .....	78
Anexo B: Quantificação e determinação da qualidade de RNA total .....	79
Anexo C: Manuseando PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) .....	81
Informações para pedidos .....	83
Histórico de revisões do documento .....	85

# Uso previsto

Para uso em diagnóstico in vitro.

O PAXgene Blood RNA System consiste em um tubo de coleta de sangue (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) e um kit de purificação de ácido nucleico (PAXgene Blood RNA Kit). Ele se destina à coleta, ao armazenamento e ao transporte de sangue e estabilização de RNA intracelular em um tubo fechado e subsequente isolamento e purificação do RNA hospedeiro do sangue total para RT-PCR usado em testes de diagnóstico molecular.

As características de desempenho do PAXgene Blood RNA System foram estabelecidas apenas com transcritos dos genes FOS e IL1B. O usuário é responsável por estabelecer as características de desempenho adequadas do PAXgene Blood RNA System para outros transcritos-alvo.

## Indicações de uso

O PAXgene Blood RNA Kit destina-se à purificação do RNA intracelular a partir do sangue total coletado no PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Quando o kit é usado em conjunto com o PAXgene Blood RNA Tube (BRT), o sistema fornece RNA intracelular purificado de sangue total para RT-PCR usado em testes de diagnóstico molecular.

# Usuário previsto

O produto destina-se a ser usado por usuários profissionais, por exemplo, técnicos e médicos com formação em procedimentos de diagnóstico in vitro.

Este kit destina-se ao uso profissional.

# Descrição e princípio

## Introdução

A coleta de sangue total é o primeiro passo em muitos ensaios moleculares usados para estudar o RNA celular. No entanto, um problema importante em tais experimentos é a instabilidade do perfil de RNA celular *in vitro*. Estudos na PreAnalytiX mostraram que os números de cópias de espécies individuais de mRNA em sangue total podem mudar mais de 1000 vezes durante o armazenamento ou transporte à temperatura ambiente (Rainen et al., 2002). Isso é causado tanto pela rápida degradação do RNA como pela expressão induzida de certos genes após a coleta do sangue. Tais mudanças no perfil de expressão de RNA impossibilitam estudos confiáveis de expressão gênica. Um método que preserva o perfil de expressão do RNA durante e após a flebotomia é, portanto, essencial para uma análise precisa da expressão gênica em sangue total humano.

## Princípio e procedimento

A PreAnalytiX desenvolveu um sistema que permite a coleta, a estabilização, o armazenamento e o transporte de espécimes de sangue total humano, juntamente com um protocolo rápido e eficiente para isolamento de RNA intracelular. O sistema requer o uso de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) para a coleta de sangue e estabilização de RNA, seguido por isolamento de RNA manual ou automatizado usando o PAXgene Blood RNA Kit. Os protocolos manuais e automatizados apresentam um desempenho substancialmente equivalente em termos de qualidade e rendimento do RNA. Dados de desempenho do protocolo manual (começando na página 46) e do protocolo automatizado (começando na página 55) estão incluídos neste manual.

O PAXgene Blood RNA System permite a padronização das etapas do fluxo de trabalho de pré-análise, da coleta de espécimes de sangue ao isolamento de RNA de acordo com a ISO 20186-1:2019, Testes moleculares de diagnóstico in vitro – Especificações para processos de pré-exame para sangue total venoso – Parte 1: Isolamento de RNA celular.

## Coleta e estabilização de amostras

Os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) contêm um reagente proprietário de estabilização de RNA. Este aditivo protege as moléculas de RNA da degradação por RNases e minimiza as mudanças ex vivo na expressão gênica. As características de desempenho do PAXgene Blood RNA System foram estabelecidas com transcritos dos genes FOS e IL1B que podem ser consultados a partir da página 41.

## Isolamento de RNA

O PAXgene Blood RNA Kit destina-se ao isolamento de RNA total a partir de 2,5 mL de sangue total humano coletado em um PAXgene Blood RNA Tube (BRT). O procedimento é simples e pode ser realizado usando métodos manuais ou automatizados (consulte a Figura 1 ou a Figura 3, página 10 ou 12, respectivamente). Em ambos os protocolos, o isolamento começa com uma etapa de centrifugação para peletizar os ácidos nucleicos no PAXgene Blood RNA Tube (BRT). O pellet é lavado e suspenso novamente, seguido de isolamento manual ou automático de RNA. Em princípio, ambos os protocolos seguem as mesmas etapas protocolares com os mesmos componentes do kit.

## Isolamento manual de RNA

Em detalhe, o pellet ressuspensão é incubado em tampões otimizados juntamente com proteinase K (PK) para provocar a digestão da proteína. Uma centrifugação adicional através da coluna de centrifugação PAXgene Shredder (PSC) é realizada para homogeneizar o lisado celular e remover resíduos celulares, bem como o sobrenadante da fração de fluxo de passagem é transferido para um tubo da microcentrifuga novo (MCT). É adicionado etanol para ajustar as condições de ligação e o lisado é aplicado a uma coluna de centrifugação PAXgene RNA (PRC). Durante uma breve centrifugação, o RNA se liga seletivamente à membrana de sílica PAXgene durante a passagem dos contaminantes. Os contaminantes restantes são removidos em várias etapas eficientes de lavagem. Entre a primeira e a segunda etapas de lavagem, a membrana é tratada com DNase I (RNFD) para remover vestígios de DNA ligado. Após as etapas de lavagem, o RNA é eluído em tampão de eluição (BR5) e desnaturado por calor. As características de desempenho do isolamento manual de RNA usando o PAXgene Blood RNA System podem ser consultadas na página 46.

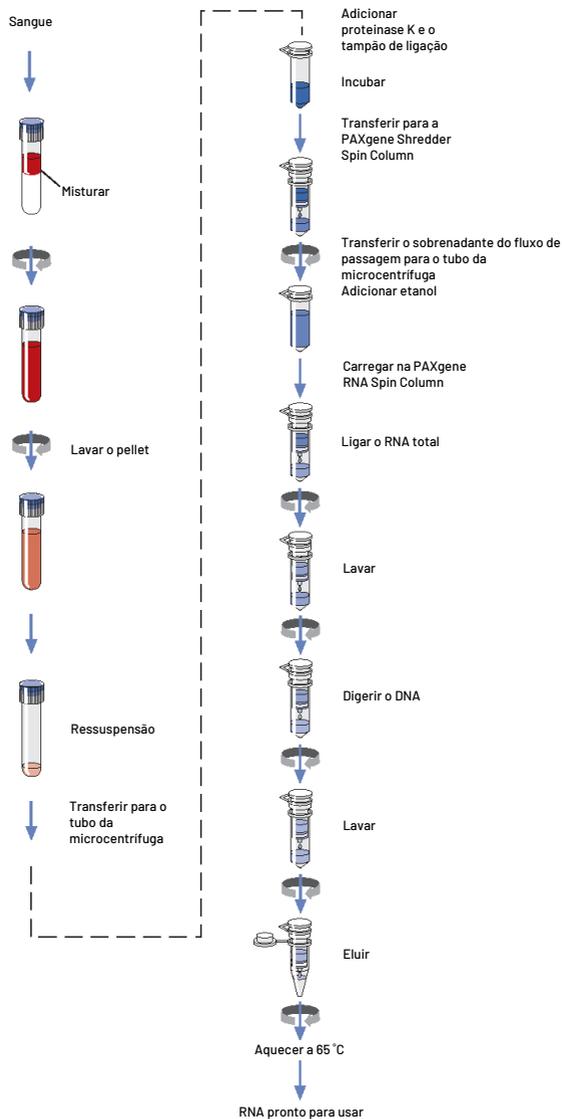


Figura 1: O procedimento manual de PAXgene Blood RNA.

## Isolamento automatizado de RNA

O isolamento de RNA do sangue é automatizado no QIAGEN QIAcube Connect MDx. O inovador instrumento usa tecnologia avançada para processar as colunas de centrifugação QIAGEN, permitindo a integração perfeita da preparação automatizada de amostras de baixo rendimento no fluxo de trabalho do laboratório. O preparo de amostras usando o QIAcube Connect MDx segue as mesmas etapas do procedimento manual (isto é, lise, ligação, lavagem e eluição) e pode ser realizado com o mesmo PAXgene Blood RNA Kit.



Figura 2: QIAcube Connect MDx.



O QIAGEN QIAcube Connect MDx não está disponível em todos os países. Para obter mais detalhes, entre em contato com a assistência técnica da QIAGEN.

O protocolo de isolamento automatizado de RNA é composto por 2 partes (ou protocolos), "PAXgene Blood RNA – Parte A" (a partir do sangue para eluir no PAXgene Blood RNA Tube) e "PAXgene Blood RNA – Parte B" (após eluir o RNA pronto para usar), com uma breve intervenção manual entre ambas as partes (consulte a Figura 3).

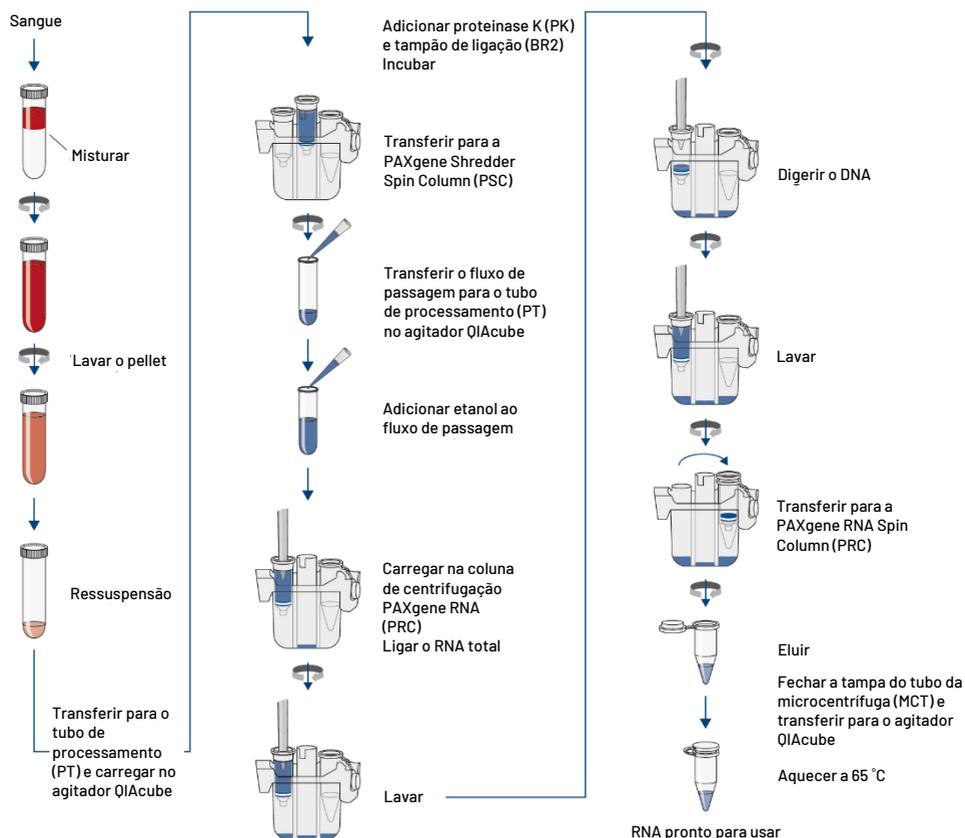


Figura 3: O procedimento automatizado do PAXgene Blood RNA.

O pellet de ácido nucleico centrifugado, lavado e suspenso novamente (consulte "Isolamento de RNA", página 8) é transferido do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) para tubos de processamento (PTs), que são colocados na unidade do agitador térmico na mesa de trabalho do QIAcube Connect MDx. O operador seleciona e inicia o protocolo "PAXgene Blood RNA – Parte A" a partir do menu. O QIAcube Connect MDx realiza as etapas do protocolo através da eluição de RNA em tampão de eluição (BR5). O operador transfere os MCTs contendo o RNA purificado para a unidade do agitador térmico dos instrumentos QIAcube Connect MDx. O operador seleciona e inicia o protocolo "PAXgene Blood RNA – Parte B" a partir do menu e a desnaturação por calor é realizada pelo QIAcube Connect MDx. As características de desempenho do isolamento automatizado de RNA usando o PAXgene Blood RNA System no QIAcube Connect MDx podem ser consultadas na página 55.

# Materiais fornecidos

## Conteúdo do kit

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Nº de referência			762174
Número de dispositivos de coleta			50
Nome do componente	Descrição	Símbolo	Quantidade
BR1	Resuspension Buffer (Tampão de ressuspensão)	RES   BUF	20 mL
BR2	Binding Buffer (Tampão de ligação)*	BIND   BUF	18 mL
BR3	Wash Buffer 1 (Tampão de lavagem 1)*	WASH   BUF   1	45 mL
BR4	Wash Buffer 2 (Tampão de lavagem 2 [concentrado]) <sup>†</sup>	WASH   BUF   2   CONC	11 mL
BR5	Elution Buffer (Coletando tampão de eluição)	ELU   BUF	6 mL
RNFW	RNase-Free Water (Água sem RNase)(frasco)	PEL   WASH	2 × 125 mL
PK	Proteinase K (tampa verde)	PROTK	2 × 1,4 mL
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red)(Colunas de centrifugação PAXgene RNA [vermelho]) <sup>‡</sup>	PAXgene   RNA   COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (Tubos de processamento)(2 mL) <sup>§</sup>	PROC   TUBE	6 × 50
Hemogard™	Secondary BD Hemogard Closures (Fechos secundários BD Hemogard)	SEC   CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (1.5 ml)(Tubos da microcentrifuga [1,5 ml]) <sup>§</sup>	MIC   TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (DNase I, sem RNase)(liofilizado)	DNA   REM	1500 unidades Kunitz <sup>¶</sup>
RDD	DNA Digestion Buffer (Tampão de digestão de DNA) (tampa branca)	DNA   DIG   BUF	2 × 2 mL
DRB	DNase Resuspension Buffer (Tampão de ressuspensão de DNase)(tubo, tampa lilás)	DNase   RES   BUF	2 mL
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (Colunas de centrifugação PAXgene Shredder)(lilás) <sup>‡</sup>	PAXgene   SHRED   COL	5 × 10
Manual	Manual do PAXgene Blood RNA Kit (Versão 3)		1

\* Não compatível com reagentes desinfetantes que contenham água sanitária. Contém um sal de guanidina. Consulte a página 19 sobre Informações de segurança.

- † O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido como um concentrado. Antes de usar pela primeira vez, adicione 4 volumes de etanol (96-100% v/v, grau de pureza p.a.), conforme indicado no frasco, para obter uma solução de trabalho.
- ‡ Cada coluna é embalada em um blister que é destinado apenas para uso único. Consulte as informações de segurança para obter instruções de descarte.
- § Os tubos estão disponíveis em sacos plásticos e cada tubo é destinado apenas para uso único. Consulte as informações de segurança para obter instruções de descarte.
- ¶ As unidades Kunitz são as unidades comumente usadas para medir a DNase I, definidas como a quantidade de DNase I que causa um aumento em  $A_{260}$  de 0,001 por minuto por mililitro a 25 °C, pH de 5,0, com DNA altamente polimerizado como substrato (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* 33, 349 e 363).

## Componentes do kit

Nome do componente	Descrição	Princípio ativo	Concentração
BR1	Resuspension Buffer (Tampão de ressuspensão)	Nenhum	-
BR2	Binding Buffer (Tampão de ligação)	Tiocianato de guanidina	≥ 30 a < 50% w/w
BR3	Wash Buffer 1 (Tampão de lavagem 1)	Tiocianato de guanidina Etanol	≥ 10 a < 20% w/w ≥ 3 a < 10% w/w
BR4	Wash Buffer 2 (Tampão de lavagem 2 [concentrado])	Nenhum	-
BR5	Elution Buffer (Coletando tampão de eluição)	Nenhum	-
RNFW	RNase-Free Water (Água sem RNase) (frasco)	Nenhum	-
PK	Proteinase K (tampa verde)	Proteinase K	≥ 1 a < 3% w/w
RNFD	DNase I, RNase-free (DNase I, sem RNase) (liofilizado)	DNase	≥ 90 a ≤ 100% w/w
RDD	DNA Digestion Buffer (Tampão de digestão de DNA) (tampa branca)	Nenhum	-
DRB	DNase Resuspension Buffer (Tampão de ressuspensão de DNase) (tubo, tampa lilás)	Nenhum	-

# Materiais necessários, mas não fornecidos

Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre utilize um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

## Para todos os protocolos

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; nº de ref. 762165)
- Etanol (96-100% v/v, grau de pureza p.a.)
- Pipetas\* (10 µL–4 mL)
- Ponteiros de pipetas esterilizadas, com barreira contra aerossóis e sem RNase<sup>†</sup>
- Cilindro graduado<sup>‡</sup>
- Centrífuga\* capaz de atingir 3000–5000 × g e equipada com um rotor de movimento horizontal de recipiente para fixar os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Agitador tipo vórtex\*
- Gelo triturado
- Caneta permanente para rotulagem

\* Certifique-se de que os dispositivos e instrumentos tenham sido verificados, mantidos e calibrados regularmente de acordo com as recomendações do fabricante.

<sup>†</sup> Certifique-se de que se familiariza com as diretrizes sobre como manusear RNA (Apêndice A, página 75).

<sup>‡</sup> Para a adição de etanol ao concentrado de tampão BR4.

## Para o protocolo manual

- Microcentrífuga de velocidade variável\* com um alcance de, pelo menos, 1000–8000 × *g*, embora forças *g* mais baixas e mais altas sejam aplicáveis (consulte as etapas do protocolo para obter detalhes), e equipada com um rotor para MCTs de 2 mL
- Agitador-incubador\* capaz de incubar a 55 °C e 65 °C e agitar a ≥ 400 rpm, não excedendo 1400 rpm (por exemplo, Eppendorf® Thermomixer Compact ou equivalente)

## Para o protocolo automatizado

- Tesoura
- QIAcube Connect MDx\* (QIAGEN, nº de ref. 9003070)

### Consumíveis do QIAcube Connect MDx:

- Filter-Tips, 1000 µL (1024)(QIAGEN, nº de ref. 990352)†
- Reagent Bottles, 30 mL (6)(QIAGEN, nº de ref. 990393)†
- Rotor Adapters (10 × 24)(QIAGEN, nº de ref. 990394)†

### Acessórios do QIAcube Connect MDx:

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, nº de ref. 990392)†

\* Certifique-se de que o dispositivo e o instrumento tenham sido verificados, mantidos e calibrados regularmente de acordo com as recomendações do fabricante.

† Também incluído no Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, nº de ref. 990395).

### **Pacotes de serviço QIAcube Connect MDx:**

- QIAcube Connect MDx System FUL-2 (QIAGEN, nº de ref. 9003071)
- QIAcube Connect MDx System FUL-3 (QIAGEN, nº de ref. 9003072)
- QIAcube Connect MDx System PRV-1 (QIAGEN, nº de ref. 9003073)
- QIAcube Connect MDx Device PRV-1 (QIAGEN, nº de ref. 9003074)
- QIAcube Connect MDx System PRM-1 (QIAGEN, nº de ref. 9003075)

# Avisos e precauções

Para clientes na União Europeia, esteja ciente de que será necessário relatar qualquer incidente grave que tenha ocorrido em relação ao dispositivo ao fabricante e à autoridade competente do país-membro no qual o usuário e/ou o paciente estão estabelecidos.

Para clientes fora da União Europeia, esteja ciente de que poderá ser necessário consultar seus regulamentos locais para relatar incidentes graves que tenham ocorrido com o dispositivo ao fabricante e/ou seu representante autorizado e à autoridade regulatória na qual o usuário e/ou o paciente estão estabelecidos.

## Informações de segurança

Ao trabalhar com substâncias químicas e materiais com risco biológico, sempre utilize um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas. Elas estão disponíveis online em formato PDF compacto e conveniente em [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), onde é possível encontrar, visualizar e imprimir a SDS para cada kit e para componente do kit QIAGEN.

- Todos os produtos químicos e materiais biológicos são potencialmente perigosos. Os espécimes e as amostras de sangue são potencialmente infecciosos e devem ser tratados como materiais com risco biológico.
- Descarte os resíduos biologicamente nocivos e os resíduos do kit de acordo com os procedimentos de segurança locais.

## Informações de emergência

CHEMTREC

Fora dos EUA e do Canadá +1 703-527-3887

## Precauções

Ao trabalhar com sangue, são tomadas precauções universais para evitar o risco de exposição potencial a patógenos transmitidos pelo sangue (por ex., HIV, hepatite B e outros vírus transmitidos pelo sangue). Use luvas, jalecos, proteção ocular, outros equipamentos de proteção pessoal e controles de engenharia para se proteger da exposição ao sangue. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas. Elas estão disponíveis online, em formato PDF conveniente e compacto, em **[www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)**, onde você pode encontrar, visualizar e imprimir as SDSs deste kit.

### CUIDADO



NÃO adicione água sanitária ou soluções ácidas diretamente nos resíduos resultantes da preparação da amostra.

O tampão de ligação (BR2) e o tampão de lavagem 1 (BR3) contêm tiocianato de guanidina, que pode formar compostos altamente reativos quando misturado com água sanitária. Em caso de derrame de tampão de ligação (BR2) ou tampão de lavagem 1 (BR3), limpe com detergente laboratorial adequado e água. Se o líquido derramado contiver agentes potencialmente infecciosos, limpe primeiro a área afetada com água e detergente de laboratório e, em seguida, com hipoclorito de sódio a 1% (v/v) (água sanitária).

A solução estabilizadora de RNA e a mistura de sangue do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) podem ser desinfetadas usando 1 volume de solução de água sanitária comercial (hipoclorito de sódio a 5%) para cada 9 volumes da solução estabilizadora de RNA e mistura de sangue.

Os resíduos de preparo de amostras, como sobrenadantes das etapas de centrifugação no procedimento de isolamento de RNA, devem ser considerados potencialmente infecciosos. Use recipientes de risco biológico para descartar os materiais biológicos. O descarte de ser feito de acordo com os regulamentos e procedimentos locais de suas instalações.

Os componentes específicos do PAXgene Blood RNA Kit são destinados apenas para uso único. Consulte o Conteúdo do kit na página 14 para obter mais informações sobre cada componente.

As advertências de perigo e precaução a seguir se aplicam aos componentes do PAXgene Blood RNA Kit. Consulte o *Manual do PAXgene Blood RNA Tube* para obter informações de segurança sobre os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

#### Buffer BR2



Contém: tiocianato de guanidina. Perigo! Nocivo, se engolido. Pode ser nocivo em contato com a pele ou se inalado. Causa lesões graves nos olhos. Nocivo para a vida aquática, com efeitos duradouros. Em contato com ácidos, libera gases muito tóxicos. Evite liberar no meio ambiente. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. **SE EM CONTATO COM OS OLHOS:** Enxágue cuidadosamente com água por vários minutos. Remova as lentes de contato, se presentes e fáceis de remover. Continue enxaguando. **EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição:** Ligue imediatamente para um CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES E ENVENENAMENTO ou médico. Descarte o conteúdo/recipiente em um local de descarte de resíduos aprovado.

### Tampão BR3



Contém: etanol; tiocianato de guanidina. Perigo! Líquidos e vapores inflamáveis. Causa lesões graves nos olhos. Em contato com ácidos, libera gases muito tóxicos. Mantenha distância de calor/faíscas/chamas abertas/superfícies quentes. Não fume. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. SE EM CONTATO COM OS OLHOS: Enxágue cuidadosamente com água por vários minutos. Remova as lentes de contato, se presentes e fáceis de remover. Continue enxaguando. Ligue imediatamente para um CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES E ENVENENAMENTO ou médico.

### DNase I



Contém: DNase. Perigo! Pode provocar uma reação alérgica cutânea. Se inalado, pode causar alergias ou sintomas de asma ou dificuldades respiratórias. Evite respirar poeira. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Use proteção respiratória. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Entre em contato com um CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES E ENVENENAMENTO ou médico. Leve a pessoa para um local ao ar livre e deixe-a confortável para respirar. Lave a roupa contaminada antes de usá-la novamente.

## Armazenamento e manuseio de reagentes

As colunas de centrifugação PAXgene RNA (PRC), colunas de centrifugação PAXgene Shredder (PSC), a proteinase K (PK) e os tampões (BR1, BR2, BR3, BR4 e BR5) devem ser armazenados a seco à temperatura indicada no rótulo do kit.

O RNase-Free DNase Set, que contém DNase I (RNFD), tampão de digestão de DNA (RDD) e tampão de ressuspensão de DNase (DRB), é enviado à temperatura ambiente. Armazene todos os componentes do RNase-Free DNase Set imediatamente após o recebimento, à temperatura indicada no rótulo. Quando armazenado devidamente, o kit permanece estável até o fim do prazo de validade indicado na caixa do kit.

É necessário prestar atenção às datas de validade e às condições de armazenamento impressas na caixa e nos rótulos de todos os componentes. Não use componentes cuja data de validade tenha expirado nem que tenham sido incorretamente armazenados.

## Estabilidade em uso

Após o primeiro uso do kit, os reagentes ficam estáveis nos frascos originais às temperaturas e até a data de validade indicada no rótulo da caixa do kit.

Os reagentes contidos nos frascos de reagentes do QIAcube Connect MDx ficam estáveis por três meses de armazenamento à temperatura ambiente (15 a 25 °C).

A DNase I reconstituída (RNFD) fica estável entre 2 e 8 °C por seis semanas no frasco de vidro original (solução de estoque).

As alíquotas de uso único da solução de estoque em MCTs de 1,5 mL (fornecidos com o kit) ficam estáveis por nove meses de armazenamento a -20 °C. Após o descongelamento, as alíquotas de uso único ficam estáveis por seis semanas entre 2 e 8 °C.

# Transporte, armazenamento e manuseio de espécimes

O PAXgene Blood RNA Kit destina-se ao uso com sangue coletado nos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). O sangue deve ser coletado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) de acordo com as instruções do Manual de PAXgene Blood RNA Tube. Se necessário, consulte o Anexo C (página 81) para obter recomendações sobre o manuseio de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Todas as amostras devem ser tratadas como materiais potencialmente perigosos. As características de desempenho do PAXgene Blood RNA System foram estabelecidas com transcritos dos genes FOS e IL1B que podem ser consultados nas páginas 42–45.

# Protocolo: Isolamento manual de RNA total de sangue total humano coletado em PAXgene Blood RNA Tubes

## Pontos importantes antes de iniciar

- Certifique-se de que a caixa do kit esteja intacta e sem danos e que os tampões não vazaram. Não use um kit que tenha sido danificado.
- Ao usar uma pipeta, certifique-se de que esteja ajustada no volume correto e que o líquido seja cuidadoso e completamente aspirado e dispensado.
- Para evitar a transferência de amostras para o tubo ou coluna de centrifugação incorreta, certifique-se de que todos os tubos e colunas de rotação estejam devidamente rotulados usando uma caneta permanente. Rotule a tampa e o corpo de cada tubo (PT, MCT). Para colunas de centrifugação, rotule o corpo do respectivo PT. Feche cada tubo ou coluna de centrifugação depois que o líquido for transferido para ele/ela.
- Derramamento de amostras e tampões durante o procedimento pode reduzir o rendimento e a pureza do RNA.
- Salvo indicação em contrário, todas as etapas deste protocolo, incluindo as de centrifugação, devem ser realizadas à temperatura ambiente (15-25 °C).

Devido à sensibilidade das tecnologias de amplificação de ácido nucleico, as seguintes precauções são necessárias ao manusear amostras para evitar a contaminação cruzada:

- Pipete cuidadosamente a amostra na coluna de centrifugação (PSC, PRC) sem umedecer a borda da coluna.
- Troque sempre as ponteiros das pipetas entre as transferências de líquidos. Use ponteiros de pipetas com barreira contra aerossóis.

- Evite tocar na membrana da coluna de centrifugação (PSC, PRC) com a ponteira da pipeta.
- Após agitar em vórtex ou aquecer um MCT, centrifugue-o brevemente para remover gotas do interior da tampa.
- Use luvas durante todo o procedimento. Em caso de contato entre as luvas e a amostra, troque as luvas imediatamente.
- Feche a coluna de centrifugação (PSC, PRC) antes de colocá-la na microcentrífuga. Centrifugue conforme descrito no procedimento.
- Abra apenas uma coluna de centrifugação (PSC, PRC) por vez e tenha cuidado para evitar gerar aerossóis.
- Para um processamento paralelo eficiente de múltiplas amostras, preencha um rack com PTs para os quais as colunas de centrifugação (PSC, PRC) podem ser transferidas após a centrifugação. Descarte os PTs usados que contenham fluxo de passagem e coloque colunas de centrifugação (PSC, PRC) nos novos PTs antes de transferir de volta para a microcentrífuga.

## O que fazer antes de começar

- O sangue deve ser coletado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) de acordo com as instruções do *Manual de PAXgene Blood RNA Tube*. Se necessário, consulte o Anexo C (página 81) para obter recomendações sobre o manuseio de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Certifique-se de que os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) sejam incubados por, pelo menos, 2 h à temperatura ambiente após a coleta de sangue para garantir a lise completa das células sanguíneas e a precipitação de RNA. A incubação do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante a noite pode aumentar os rendimentos. Caso a incubação de sangue inicial à temperatura ambiente durante 2 h não seja concluída antes do armazenamento entre 2 e 8 °C, -20 °C ou -70 °C, equilibre primeiro o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) à temperatura ambiente e em seguida incube-o a esta temperatura durante 2 h antes de iniciar o procedimento.

- Leia as informações de segurança na página 19.
- Leia as orientações sobre como manusear RNA (Apêndice A, página 78).
- Certifique-se de que os instrumentos, tais como pipetas e o agitador-incubador, tenham sido verificados e calibrados regularmente de acordo com as recomendações do fabricante.
- Um agitador-incubador é necessário nas etapas 5 e 20. Ajuste a temperatura do agitador-incubador para 55 °C.
- O tampão de ligação (BR2) pode formar um precipitado após o armazenamento. Se necessário, aqueça até 37 °C para dissolver.
- O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido como um concentrado. Antes de usar pela primeira vez, adicione 4 volumes de etanol (96-100% v/v, grau de pureza p.a.), conforme indicado no frasco, para obter uma solução de trabalho.
- Se estiver usando o RNase-Free DNase Set pela primeira vez, prepare a solução de estoque de DNase I. Dissolva a DNase I sólida (RNFD; 1500 unidades Kunitz)\* em 550 µL do tampão de ressuspensão de DNase (DRB) fornecido com o conjunto. Tome cuidado para que nenhuma DNase I (RNFD) seja perdida ao abrir o frasco. Não agite em vórtex a DNase I reconstituída (RNFD). A DNase I é especialmente sensível à desnaturação física. A mistura deve ser realizada invertendo cuidadosamente o frasco.
- A DNase I reconstituída (RNFD) pode ser armazenada entre 2 e 8 °C no frasco de vidro original (solução de estoque) ou a -20 °C após a remoção da solução de estoque do frasco de vidro e a divisão em alíquotas de uso único (use o MCT de 1,5 mL fornecido com o kit; há tubos suficientes para 5 alíquotas). As alíquotas descongeladas podem ser armazenadas entre 2 e 8 °C. Não volte a congelar as alíquotas após o descongelamento.
- Ao reconstituir a DNase I (RNFD) e preparar alíquotas da mesma, certifique-se de que segue as diretrizes para o manuseio de RNA (Apêndice A, página 78).

\* As unidades Kunitz são as unidades comumente usadas para medir a DNase I, definidas como a quantidade de DNase I que causa um aumento em  $A_{260}$  de 0,001 por minuto por mililitro a 25 °C, pH de 5,0, com DNA altamente polimerizado como substrato (Kunitz, M (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 e 363).

## Procedimento

1. Centrifugue o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) por 10 min. a 3000–5000 × g usando um rotor de movimento horizontal de recipiente.



Certifique-se de que a amostra de sangue foi incubada no PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante, pelo menos, 2 h à temperatura ambiente (15–25 °C) a fim de obter a lise completa das células sanguíneas e a precipitação de RNA.



O rotor deve conter adaptadores de tubo para tubos de fundo redondo. Se outros tipos de adaptadores de tubo forem usados, os tubos podem quebrar durante a centrifugação.

2. Remova o sobrenadante por meio de decantação ou pipetagem. Adicione 4 mL de água sem RNase (RNFW) ao pellet e feche o tubo usando um novo fecho secundário BD Hemogard (fornecido com o kit).

Se o sobrenadante for decantado, tome cuidado para não perturbar o pellet e seque a borda do tubo com uma toalha de papel limpa.

3. Agite em vórtex até que o pellet esteja visivelmente dissolvido e centrifugue por 10 min. a 3000–5000 × g usando um rotor de movimento horizontal de recipiente. Remova e descarte todo o sobrenadante.

Restarão pequenos detritos no sobrenadante após a agitação em vórtex, mas, antes da centrifugação, não afetarão o procedimento.



A remoção incompleta do sobrenadante inibirá a lise e diluirá o lisado, o que afeta as condições de ligação do RNA à membrana PAXgene.

4. Adicione 350 µL de tampão de ressuspensão (BR1) e agite em vórtex até que o pellet esteja visivelmente dissolvido.
5. Pipete a amostra em um MCT de 1,5 mL. Adicione 300 µL de tampão de ligação (BR2) e 40 µL de proteinase K (PK). Misture em vórtex por 5 s e incube por 10 min. a 55 °C usando um agitador-incubador a 400 a 1400 rpm. Após a incubação, ajuste a temperatura do agitador-incubador para 65 °C (para a etapa 20).



Não misture tampão de ligação (BR2) e proteinase K (PK) antes de adicioná-los à amostra.

6. Pipete o lisado diretamente em uma PSC (lilás) colocada em um PT de 2 mL e centrifugue durante 3 min. à velocidade máxima (mas não exceda  $20.000 \times g$ ).



Pipete cuidadosamente o lisado na coluna de centrifugação (PSC) e verifique visualmente se o lisado foi completamente transferido para a coluna de centrifugação (PSC).

Para evitar danos nas colunas (PSC) e nos tubos (PT), não exceda  $20.000 \times g$ .



Algumas amostras podem fluir por meio da PSC sem centrifugação. Isso se deve à baixa viscosidade de algumas amostras e não deve ser tomado como uma indicação de falha do produto.

7. Transfira cuidadosamente todo o sobrenadante da fração de fluxo de passagem para um novo MCT de 1,5 mL, sem perturbar o pellet no PT.
8. Adicione 350  $\mu\text{L}$  de etanol (96–100% v/v, grau de pureza p.a.). Misture agitando em vórtex e centrifugue rapidamente (1–2 s a  $500\text{--}1000 \times g$ ) para remover as gotas do interior da tampa do tubo.



A duração da centrifugação não deve exceder 1–2 s, pois isso pode resultar na peletização de ácidos nucleicos e redução dos rendimentos de RNA total.

9. Pipete 700  $\mu\text{L}$  de amostra na PRC (vermelho) colocada em um PT de 2 mL e centrifugue durante 1 min. a  $8000\text{--}20.000 \times g$ . Coloque a coluna de centrifugação (PRC) em um novo PT de 2 mL e descarte o PT antigo que contém o fluxo de passagem.
10. Pipete a amostra restante na PRC e centrifugue por 1 min. a  $8000\text{--}20.000 \times g$ . Coloque a coluna de centrifugação (PRC) em um novo PT de 2 mL e descarte o PT antigo que contém o fluxo de passagem.



Pipete cuidadosamente a amostra na coluna de centrifugação (PRC) e verifique visualmente se a amostra foi completamente transferida para a coluna de centrifugação (PRC).

11. Pipete 350  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem 1 (BR3) na coluna de PRC. Centrifugue por 1 min. a 8000–20.000  $\times g$ . Coloque a coluna de centrifugação (PRC) em um novo PT de 2 mL e descarte o PT antigo que contém o fluxo de passagem.
12. Adicione 10  $\mu\text{L}$  de solução de estoque de DNase I (RNFD) a 70  $\mu\text{L}$  de tampão de digestão de DNA (RDD) em um MCT de 1,5 mL. Misture suavemente sacudindo o tubo e centrifugue brevemente para coletar o líquido residual das laterais do tubo.

Se processar, por exemplo, 10 amostras, adicione 100  $\mu\text{L}$  de solução de estoque de DNase I (RNFD) a 700  $\mu\text{L}$  de tampão de digestão de DNA (RDD). Use os MCTs de 1,5 mL fornecidos com o kit.



A DNase I é especialmente sensível à desnaturação física. A mistura deve ser realizada agitando suavemente o tubo. Não agite em vórtex.

13. Pipete a mistura de incubação de DNase I (RNFD) (80  $\mu\text{L}$ ) diretamente sobre a membrana da PRC e coloque na bancada (20–30 °C) por 15 min.



Certifique-se de que a mistura de incubação de DNase I (RNFD) seja colocada diretamente na membrana. A digestão de DNase ficará incompleta se parte da mistura for aplicada e permanecer nas paredes ou no O-ring da coluna de centrifugação (PRC).

14. Pipete 350  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem 1 (BR3) na PRC e centrifugue durante 1 min. a 8000–20.000  $\times g$ . Coloque a coluna de centrifugação (PRC) em um novo PT de 2 mL e descarte o PT antigo que contém o fluxo de passagem.
15. Pipete 500  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem 2 (BR4) na PRC e centrifugue durante 1 min. a 8000–20.000  $\times g$ . Coloque a coluna de centrifugação (PRC) em um novo PT de 2 mL e descarte o PT antigo que contém o fluxo de passagem.



O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido como um concentrado. Certifique-se de que o etanol seja adicionado ao tampão de lavagem 2 (BR4) antes do uso (consulte "O que fazer antes de começar", página 26).

16. Adicione mais 500  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem 2 (BR4) à PRC. Centrifugue por 3 min. a 8000–20.000  $\times g$ .

17. Descarte o PT que contém o fluxo de passagem e coloque a PRC em um novo PT de 2 mL. Centrifugue por 1 min. a  $8000\text{--}20.000 \times g$ .
18. Descarte o PT contendo o fluxo de passagem. Coloque a PRC em um MCT de 1,5 mL e pipete 40  $\mu\text{L}$  de tampão de eluição (BR5) diretamente sobre a membrana da PRC. Centrifugue por 1 min. a  $8000\text{--}20.000 \times g$  para eluir o RNA.  
É importante embeber toda a membrana com tampão de eluição (BR5) para obter a máxima eficiência de eluição.
19. Repita a etapa de eluição (etapa 18) conforme descrito, usando 40  $\mu\text{L}$  de tampão de eluição (BR5) e o mesmo MCT.
20. Incube o eluato por 5 min a  $65^\circ\text{C}$  no agitador-incubador (da etapa 5), sem agitar. Após a incubação, resfrie imediatamente com gelo.



Esta incubação de amostras a  $65^\circ\text{C}$  desnatura o RNA para aplicações a jusante. Mesmo que a aplicação a jusante inclua uma etapa de desnaturação por calor, não omita essa etapa. A desnaturação de RNA suficiente neste momento é essencial para a máxima eficiência em aplicações a jusante.

Não exceda o tempo de incubação ou a temperatura.

21. Se as amostras de RNA não forem usadas imediatamente, armazene a  $-20^\circ\text{C}$  ou  $-70^\circ\text{C}$ .

Como o RNA permanece desnaturado após repetidos congelamentos e descongelamentos, não é necessário repetir a incubação a  $65^\circ\text{C}$ . Se usar as amostras de RNA em um ensaio de diagnóstico, siga as instruções fornecidas pelo fabricante.

Para uma quantificação precisa do RNA por medição da absorbância a 260 nm, recomendamos a diluição de amostras com 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5.\* Diluir a amostra em água sem RNase pode levar a valores imprecisamente baixos.

\* Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre utilize um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

Zere o espectrofotômetro usando um branco consistindo na mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e tampão Tris-HCl das amostras a serem medidas. O tampão de eluição (BR5) apresenta uma absorbância alta a 220 nm, o que pode provocar níveis elevados de absorbância em segundo plano, caso o espectrômetro não seja devidamente zerado.



Para quantificação em tampão Tris-HCl, use a relação  $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/mL}$ . Consulte o Apêndice B, página 79.

22. Feche novamente todos os frascos contendo tampões e água sem RNase, frascos e tubos contendo enzimas e tampões de enzimas e sacos contendo materiais plásticos do kit utilizado para o protocolo. Armazene o conteúdo restante do kit conforme descrito na seção "Armazenamento e manuseio de reagentes" (página 23) e "Estabilidade em uso" (página 23) até o uso posterior.

# Protocolo: Isolamento automatizado de RNA total de sangue total humano coletado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

## Pontos importantes antes de iniciar

- Certifique-se de que a caixa do kit esteja intacta e sem danos e que os tampões não vazaram. Não use um kit que tenha sido danificado.
- Ao usar uma pipeta, certifique-se de que esteja ajustada no volume correto e que o líquido seja cuidadoso e completamente aspirado e dispensado.
- Para evitar a transferência de amostras para os tubos e consumíveis plásticos incorretos, certifique-se de que todos os PTs, MCTs e Rotor Adapters estejam devidamente rotulados usando uma caneta permanente. Rotule a tampa e o corpo de cada MCT, o corpo de cada PT e a parede externa de cada adaptador de rotor.
- Derramamento de amostras e tampões durante o procedimento pode reduzir o rendimento e a pureza do RNA.
- Salvo indicação em contrário, todas as etapas deste protocolo, incluindo as de centrifugação, devem ser realizadas à temperatura ambiente (15-25 °C).

Devido à sensibilidade das tecnologias de amplificação de ácido nucleico, as seguintes precauções são necessárias ao manusear amostras para evitar a contaminação cruzada:

- Pipete com cuidado a amostra no PT, no fundo do tubo, sem umedecer a borda do tubo.
- Troque sempre as ponteiros das pipetas entre as transferências de líquidos. Use ponteiros de pipetas com barreira contra aerossóis.

- Evite tocar na membrana da coluna de centrifugação (PSC, PRC) com a ponteira da pipeta.
- Após agitar em vórtex ou aquecer um MCT, centrifugue-o brevemente para remover gotas do interior da tampa.
- Use luvas durante todo o procedimento. Em caso de contato entre as luvas e a amostra, troque as luvas imediatamente.

## O que fazer antes de começar

- O sangue deve ser coletado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) de acordo com as instruções do *Manual de PAXgene Blood RNA Tube*. Se necessário, consulte o Anexo C (página 81) para obter recomendações sobre o manuseio de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Certifique-se de que os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) sejam incubados por, pelo menos, 2 h à temperatura ambiente após a coleta de sangue para garantir a lise completa das células sanguíneas e a precipitação de RNA. A incubação do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante a noite pode aumentar os rendimentos. Se o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tiver sido armazenado a 2–8 °C, -20 °C ou -70 °C após a coleta de sangue, primeiramente deixe que fique à temperatura ambiente e, em seguida, armazene-o à temperatura ambiente por 2 h antes de iniciar a procedimento.
- Leia as informações de segurança na página 19.
- Leia "Notas importantes", página 59.
- Leia as orientações sobre como manusear RNA (Apêndice A, página 78).
- Leia o Manual do usuário do QIAcube Connect MDx apropriado e qualquer informação adicional fornecida com o instrumento, prestando muita atenção às informações de segurança.
- Certifique-se de que os dispositivos e instrumentos, tais como pipetas e o QIAcube Connect MDx, tenham sido verificados e calibrados regularmente de acordo com as recomendações do fabricante.

- O tampão de ligação (BR2) pode formar um precipitado após o armazenamento. Se necessário, aqueça até 37 °C para dissolver.
- O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido como um concentrado. Antes de usar pela primeira vez, adicione o volume apropriado de etanol (96-100% v/v, grau de pureza p.a.), conforme indicado no frasco, para obter uma solução de trabalho.
- Se estiver usando o RNase-Free DNase Set pela primeira vez, prepare a solução de estoque de DNase I. Dissolva a DNase I sólida (RNFD; 1500 unidades Kunitz)\* em 550 µL do tampão de ressuspensão de DNase (DRB) fornecido com o conjunto. Tome cuidado para que nenhuma DNase I (RNFD) seja perdida ao abrir o frasco. Não agite em vórtex a DNase I reconstituída (RNFD). A DNase I é especialmente sensível à desnaturação física. A mistura deve ser realizada invertendo cuidadosamente o frasco.
- A DNase I reconstituída (RNFD) pode ser armazenada entre 2 e 8 °C no frasco de vidro original (solução de estoque) ou a -20 °C após a remoção da solução de estoque do frasco de vidro e a divisão em alíquotas de uso único (use o MCT de 1,5 mL fornecido com o kit; há tubos suficientes para 5 alíquotas). As alíquotas descongeladas podem ser armazenadas entre 2 e 8 °C. Não volte a congelar as alíquotas após o descongelamento.
- Ao reconstituir a DNase I (RNFD) e preparar alíquotas da mesma, certifique-se de que segue as diretrizes para o manuseio de RNA (Apêndice A, página 78).
- Instale o adaptador de agitador correto (incluído com o QIAcube Connect MDx; use o adaptador para tubos com trava de segurança de 2 mL, marcado com um "2") e coloque o rack do agitador na parte superior do adaptador.
- Verifique a gaveta "Waste" (Resíduos) e esvazie-a, se necessário.
- Instale os protocolos relacionados, caso isso ainda não tenha sido feito para execuções anteriores. O QIAcube Connect MDx requer que todos os protocolos encontrados no arquivo zip relacionado sejam baixados. Consulte "Instalando protocolos no QIAcube Connect MDx", página 61.

\* As unidades Kunitz são as unidades comumente usadas para medir a DNase I, definidas como a quantidade de DNase I que causa um aumento em  $A_{260}$  de 0,001 por minuto por mililitro a 25 °C, pH de 5,0, com DNA altamente polimerizado como substrato (Kunitz, M (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 e 363).

## Procedimento

1. Feche a tampa do QIAcube Connect MDx e ligue o instrumento com o interruptor de alimentação (consulte a Figura 15, página 60).

É emitido um sinal sonoro e a tela de inicialização é exibida. O instrumento realiza automaticamente testes de inicialização.

2. Abra a tampa do QIAcube Connect MDx e carregue os reagentes e materiais plásticos necessários no instrumento. Consulte "Carregando o QIAcube Connect MDx", página 62.

Para economizar tempo, o carregamento pode ser realizado durante uma ou ambas as etapas de centrifugação de 10 min. (etapas 3 e 5) seguintes.

3. Centrifugue o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) por 10 min. a 3000–5000 × g usando um rotor de movimento horizontal de recipiente.



Certifique-se de que a amostra de sangue foi incubada no PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante, pelo menos, 2 h à temperatura ambiente (15–25 °C) a fim de obter a lise completa das células sanguíneas e a precipitação de RNA.



O rotor deve conter adaptadores de tubo para tubos de fundo redondo. Se outros tipos de adaptadores de tubo forem usados, os tubos podem quebrar durante a centrifugação.

4. Remova o sobrenadante por meio de decantação ou pipetagem. Se o sobrenadante for decantado, tome cuidado para não perturbar o pellet e seque a borda do tubo com uma toalha de papel limpa. Adicione 4 mL de água sem RNase (RNFW) ao pellet e feche o tubo usando um novo fecho secundário BD Hemogard (fornecido com o kit).
5. Agite em vórtex até que o pellet esteja visivelmente dissolvido e centrifugue por 10 min. a 3000–5000 × g usando um rotor de movimento horizontal de recipiente. Remova e descarte todo o sobrenadante.

Restarão pequenos detritos no sobrenadante após a agitação em vórtex, mas, antes da centrifugação, não afetarão o procedimento.

-  A remoção incompleta do sobrenadante inibirá a lise e diluirá o lisado, o que afeta as condições de ligação do RNA à membrana PAXgene.
6. Adicione 350 µL de tampão de ressuspensão (BR1) e agite em vórtex até que o pellet esteja visivelmente dissolvido.
7. Pipete a amostra em um PT de 2 mL.
-  Use os PTs de 2 mL incluídos no PAXgene Blood RNA Kit.
8. Coloque os PTs abertos contendo a amostra no agitador QIAcube Connect MDx (consulte a Figura 18, página 64). As posições de amostra são numeradas para facilitar o carregamento. Insira os plugues do rack do agitador (incluídos com o QIAcube Connect MDx) nas fendas na borda do rack do agitador ao lado de cada PT. Isso permite a detecção de amostras durante a verificação de carga.
-  Certifique-se de que o adaptador de agitador correto (adaptador de agitador, 2 mL, tubos com trava de segurança, marcados com um "2", incluídos com o QIAcube Connect MDx) esteja instalado.
-  Se processar menos de 12 amostras, certifique-se de que carrega o rack do agitador conforme mostrado na Figura 22, página 68. Não é possível processar uma (1) amostra ou 11 amostras. Os números das posições no rack do agitador correspondem aos números das posições na centrífuga.
9. Feche a tampa do QIAcube Connect MDx (consulte a Figura 15, página 60).
10. Selecione o protocolo "PAXgene Blood RNA – Parte A" e inicie o protocolo.
- Siga as instruções dadas na tela sensível ao toque do QIAcube Connect MDx.
-  Certifique-se de que ambas as partes do programa (parte A e parte B) estejam instaladas no QIAcube Connect MDx (consulte "Instalando protocolos no QIAcube Connect MDx", página 61).
-  O instrumento fará verificações de carga para amostras, ponteiras, Rotor Adapters e frascos de reagentes.

11. Após o término do protocolo "PAXgene Blood RNA – Parte A", abra a tampa do QIAcube Connect MDx (consulte a Figura 15, página 60). Remova e descarte as PRCs dos Rotor Adapters e os PTs vazios do agitador.



Durante a execução, as colunas de centrifugação são transferidas da posição 1 (posição de tampa L1) para a posição 3 (posição de tampa L2) do adaptador de rotor pelo instrumento (consulte a Figura 20, página 66).

12. Feche as tampas de todos os MCTs de 1,5 mL contendo o RNA purificado nos Rotor Adapters (posição 3, posição de tampa L3; consulte a Figura 20, página 66). Transfira os MCTs de 1,5 mL para o adaptador do agitador QIAcube Connect MDx (consulte a Figura 18, página 64).

13. Feche a tampa do QIAcube Connect MDx (consulte a Figura 15, página 60).

14. Selecione o protocolo "PAXgene Blood RNA – Parte B" e inicie o protocolo.

Siga as instruções exibidas na tela sensível ao toque do QIAcube Connect MDx.



Este programa incuba as amostras a 65 °C e desnatura o RNA para aplicações a jusante. Mesmo que a aplicação a jusante inclua uma etapa de desnaturação por calor, não omita essa etapa. A desnaturação de RNA suficiente neste momento é essencial para a máxima eficiência em aplicações a jusante.

15. Após o término do programa "PAXgene Blood RNA – Parte B", abra a tampa do QIAcube Connect MDx (consulte a Figura 15, página 60). Coloque imediatamente os MCTs contendo o RNA purificado no gelo.



**AVISO:** Superfície quente. O agitador pode atingir temperaturas de até 70 °C. Evite tocá-lo enquanto estiver quente.



Não deixe o RNA purificado permanecer no QIAcube Connect MDx. Como as amostras não são resfriadas, o RNA purificado pode ser degradado. Por conseguinte, não são recomendadas execuções de preparação de amostra não assistidas durante a noite.

16. Se as amostras de RNA não forem usadas imediatamente, armazene a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Como o RNA permanece desnaturado após congelado e descongelado repetidamente, não é necessário repetir o protocolo de incubação por meio de calor ("PAXgene Blood RNA – Parte B"). Se usar as amostras de RNA em um ensaio de diagnóstico, siga as instruções fornecidas pelo fabricante.

Para uma quantificação precisa do RNA por medição da absorbância a 260 nm, recomendamos a diluição de amostras em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5. \* Diluir a amostra em água sem RNase pode levar a valores imprecisamente baixos.

Zere o espectrofotômetro usando um branco consistindo na mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e tampão Tris-HCl das amostras a serem medidas. O tampão de eluição (BR5) apresenta uma absorbância alta a 220 nm, o que pode provocar níveis elevados de absorbância em segundo plano, caso o espectrômetro não seja devidamente zerado.



Para quantificação em tampão Tris-HCl, use a relação

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/mL}$ . Consulte o Apêndice B, página 79.

17. Remova o rack de frascos de reagente da mesa de trabalho do QIAcube Connect MDx (consulte a Figura 18, página 64) e feche todos os frascos com as tampas devidamente rotuladas. Feche novamente todos os frascos contendo tampões e água sem RNase, frascos e tubos contendo enzimas e tampões de enzimas e sacos contendo materiais plásticos do kit utilizado para o protocolo. Armazene o conteúdo restante do kit e os frascos de reagente conforme descrito na seção "Armazenamento e manuseio de reagentes" (página 23) e "Estabilidade em uso" (página 23) até o uso posterior.

Remova e descarte os reagentes restantes nos PTs nas fendas para MCTs do QIAcube Connect MDx. Remova e descarte os Rotor Adapters da centrífuga. Esvazie a gaveta "Waste" (Resíduos) do QIAcube Connect MDx (consulte a Figura 15, página 60). Feche a tampa do instrumento e desligue o instrumento com o interruptor de alimentação.

\* Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre utilize um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

## Limitações de uso do produto

O PAXgene Blood RNA Kit se destina ao isolamento de RNA intracelular de sangue total humano ( $4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$  leucócitos/mL) para aplicações de diagnóstico in vitro. Não se destina ao isolamento do DNA genômico ou ácidos nucleicos virais de sangue total humano. Devido ao número limitado de transcritos validados para as especificações de estabilização (transcritos dos genes FOS e IL1B), as características de desempenho não foram estabelecidas para todos os transcritos. Os usuários devem revisar os dados do fabricante e seus próprios dados para determinar se a validação é necessária para outros transcritos. Os componentes do kit destinam-se apenas ao uso no protocolo manual e automático descrito nestas instruções de uso.

Consulte o *Manual do PAXgene Blood RNA Tube* para obter informações sobre o uso de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

## Controle de qualidade

De acordo com o sistema de gestão da qualidade com certificação ISO da QIAGEN, cada lote do PAXgene Blood RNA Kit é testado de acordo com especificações predeterminadas para garantir a qualidade consistente do produto.

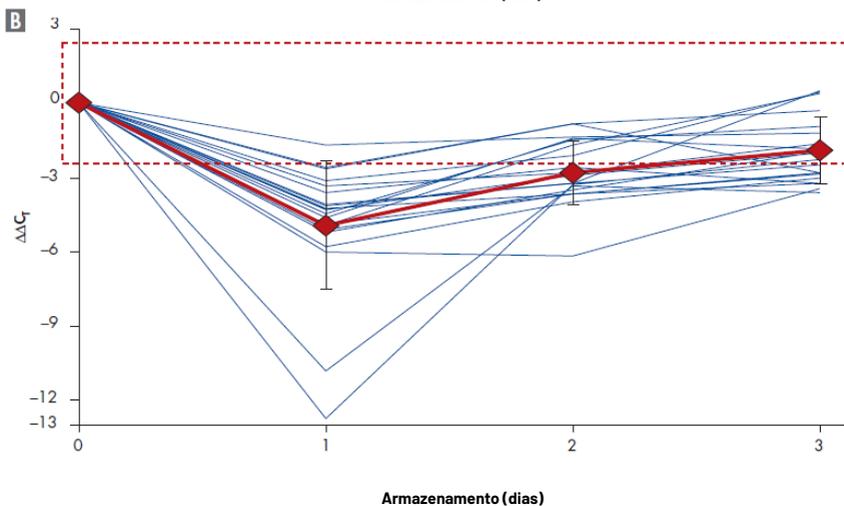
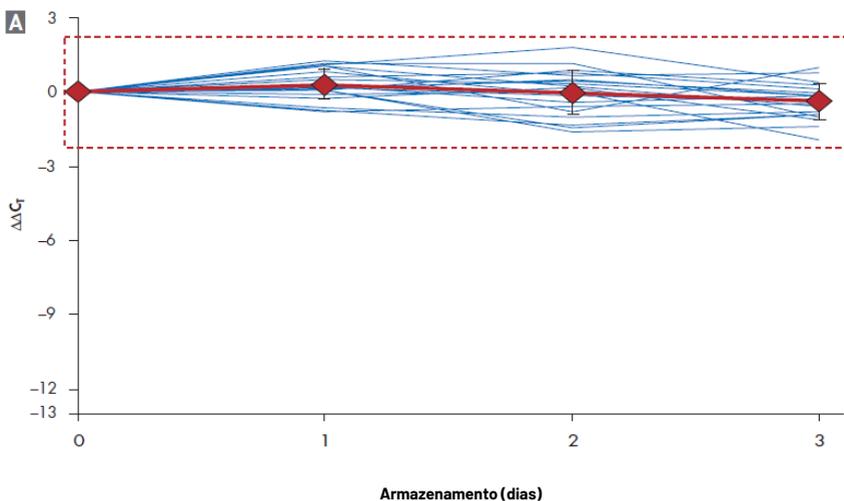
# Características de desempenho

## Coleta e estabilização de amostras

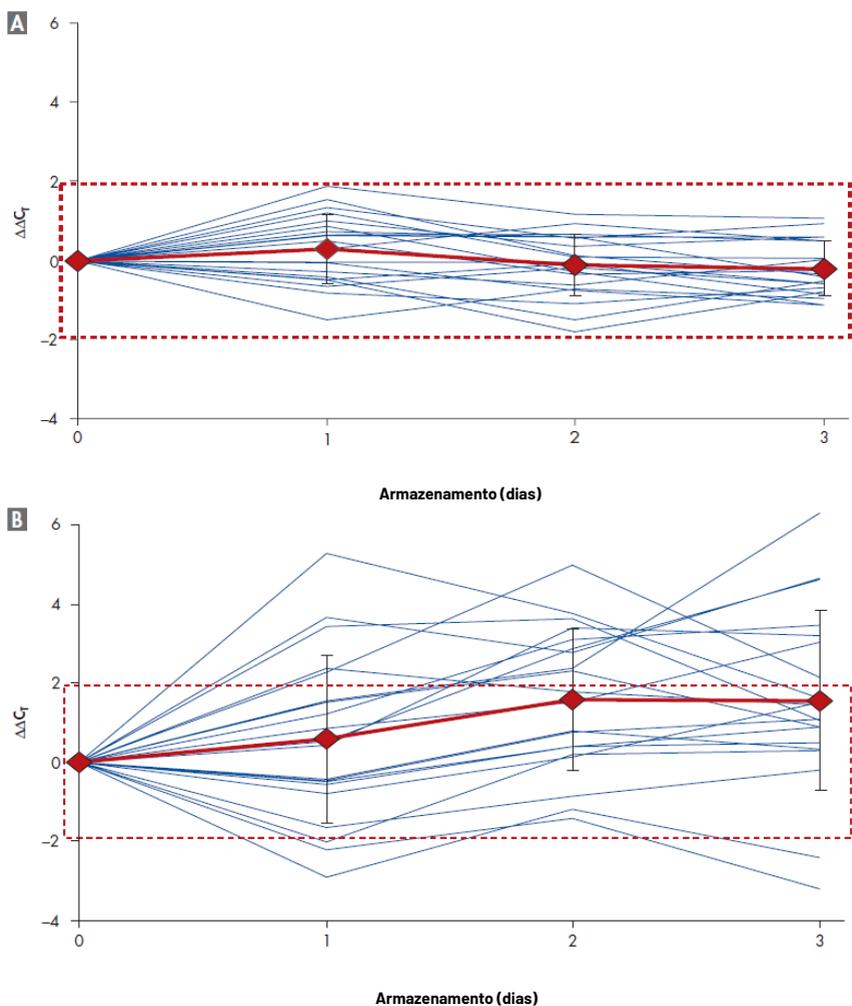
Os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) contêm um reagente proprietário de estabilização de RNA. Este aditivo protege as moléculas de RNA da degradação por RNases e minimiza as mudanças ex vivo na expressão gênica. Os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) se destinam à coleta de sangue total humano e à estabilização de RNA celular por até 3 dias a 18–25 °C (Figuras 4 e 5, páginas 42 e 43, respectivamente) ou até 5 dias a 2–8 °C (Figuras 6 e 7, páginas 44 e 45). Além disso, o sangue estabilizado pode ser armazenado congelado. Dados atualmente disponíveis mostram estabilização de RNA celular por, pelo menos, 11 anos a -20 °C ou -70 °C\*. Para obter mais informações de estudos em andamento que avaliem a estabilidade por períodos mais longos, visite [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) ou entre em contato com a Assistência Técnica da QIAGEN.

A duração real da estabilização de RNA pode variar de acordo com as espécies de RNA celular e com a aplicação a jusante usada. Devido ao número limitado de transcritos validados para as especificações de estabilização (transcritos dos genes FOS e IL1B), as características de desempenho não foram estabelecidas para todos os transcritos. Os usuários devem revisar os dados do fabricante e seus próprios dados para determinar se a validação é necessária para outros transcritos.

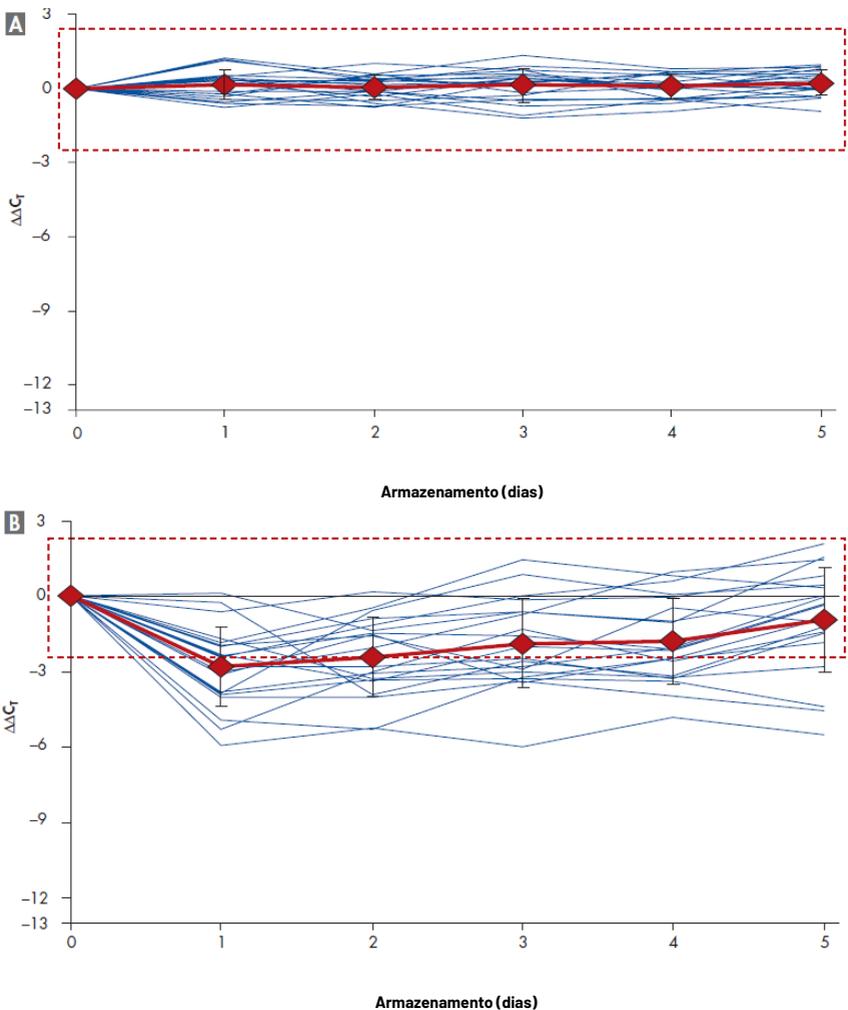
\* Um estudo de longo prazo sobre armazenamento de sangue em PAXgene Blood RNA Tubes está em andamento.



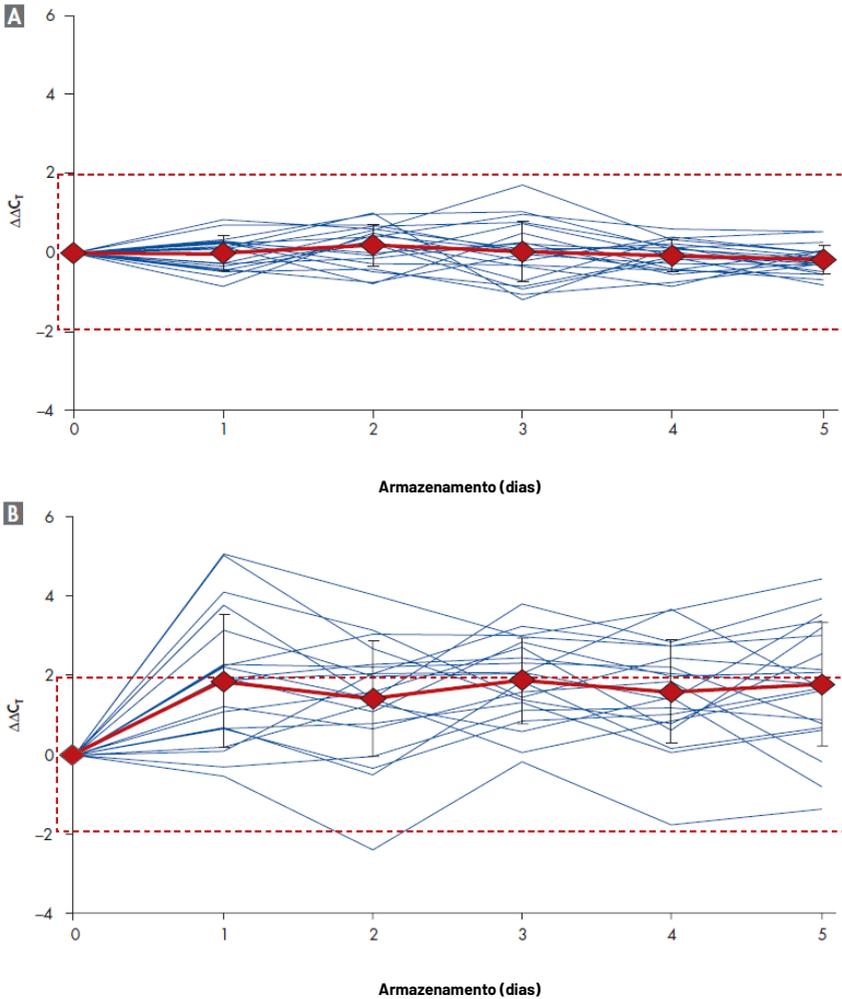
**Figura 4: Estabilidade do RNA em amostras de sangue a 18-25 °C: FOS.** O sangue foi extraído de 10 doadores aparentemente saudáveis, com amostras duplicadas e armazenado a 18-25 °C durante o número indicado de dias, seguido de isolamento de RNA total. **[A]** O sangue foi coletado e armazenado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) e o RNA total foi purificado usando o PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** O sangue foi coletado e armazenado em tubos de coleta de sangue padrão, com EDTA como anticoagulante e o RNA total foi purificado usando um método padrão de isolamento orgânico com limpeza de RNA baseada em membrana de sílica. Os níveis de transcritos relativos de FOS foram determinados por RT-PCR duplex em tempo real, usando rRNA 18S como um padrão interno. Os valores de todas as amostras encontram-se representados graficamente, com médias e desvios padrão de todas as amostras apresentadas. As linhas tracejadas indicam a precisão total de  $\pm 3 \times$  do ensaio (2,34 Ct).



**Figura 5: Estabilidade do RNA em amostras de sangue a 18-25 °C: IL1B.** O sangue foi extraído e o RNA total purificado, após armazenamento a 18-25 °C, conforme descrito na Figura 4. Os níveis de transcritos relativos de IL1B foram determinados por RT-PCR duplex em tempo real, usando rRNA 18S como um padrão interno. Os valores de todas as amostras encontram-se representados graficamente, com médias e desvios padrão de todas as amostras apresentadas. As linhas tracejadas indicam a precisão total de  $\pm 3 \times$  do ensaio ( $1,93 C_T$ ).



**Figura 6: Estabilidade do RNA em amostras de sangue a 2-8 °C: FOS.** O sangue foi extraído de 10 doadores, com amostras duplicadas, e armazenado a 2-8 °C durante o número indicado de dias, seguido de isolamento de RNA total. **[A]** O sangue foi coletado e armazenado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) e o RNA total foi purificado usando o PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** O sangue foi coletado e armazenado em tubos de coleta de sangue padrão, com EDTA como anticoagulante e o RNA total foi purificado usando um método padrão de isolamento orgânico com limpeza de RNA baseada em membrana de sílica. Os níveis de transcritos relativos de FOS foram determinados por RT-PCR duplex em tempo real, usando rRNA 18S como um padrão interno. Os valores de todas as amostras encontram-se representados graficamente, com médias e desvios padrão de todas as amostras apresentadas. As linhas tracejadas indicam a precisão total de  $\pm 3\sigma$  do ensaio (2,34  $C_t$ ).



**Figura 7: Estabilidade do RNA em amostras de sangue a 2-8 °C: IL1B.** O sangue foi extraído e o RNA total purificado, após armazenamento a 2-8 °C, conforme descrito na Figura 6. Os níveis de transcritos relativos de IL1B foram determinados por RT-PCR duplex em tempo real, usando rRNA 18S como um padrão interno. Os valores de todas as amostras encontram-se representados graficamente, com médias e desvios padrão de todas as amostras apresentadas. As linhas tracejadas indicam a precisão total de  $\pm 3 \times$  do ensaio ( $1,93 C_T$ ).

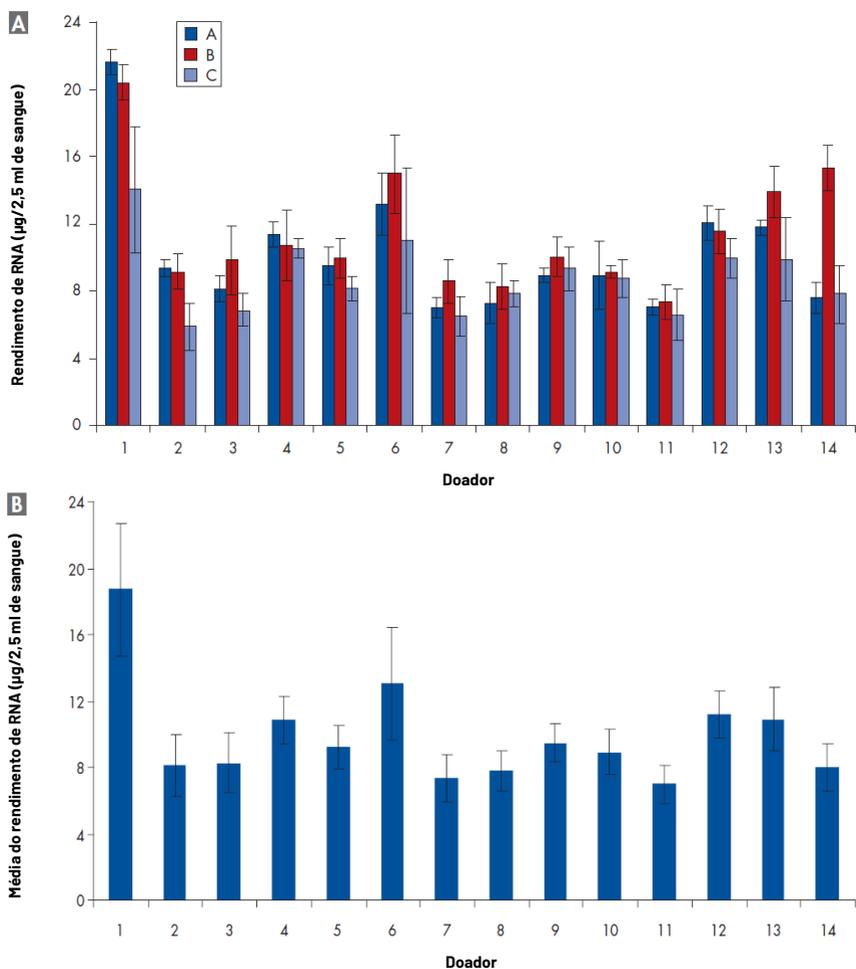
## Isolamento manual de RNA

O RNA total isolado usando o PAXgene Blood RNA System é puro. Usando o protocolo manual, os valores de  $A_{260}/A_{280}$  ficam entre 1,8 e 2,2, sendo que o DNA genômico  $\leq 1\%$  (w/w) se encontra em  $\geq 95\%$  de todas as amostras, conforme medido por real-time PCR quantitativa de uma sequência do gene de beta-actina. Pelo menos 95% das amostras não apresentam inibição na RT-PCR, quando o eluato representa até 30% do volume de reação de RT-PCR.

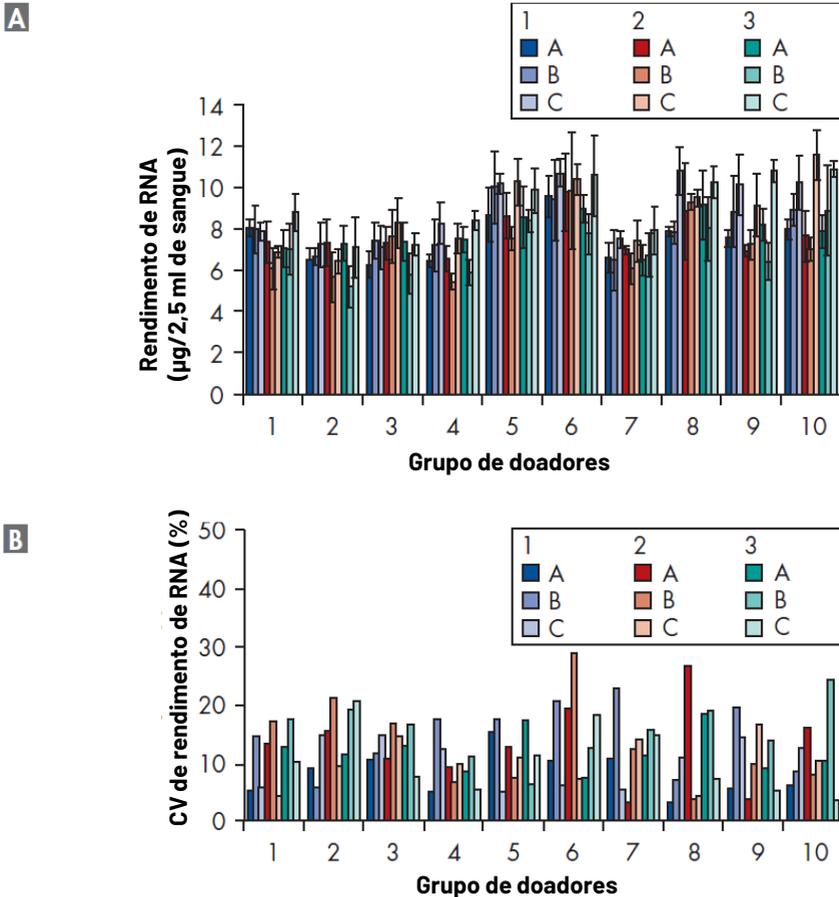
Usando o protocolo manual, o tempo médio de preparação da amostra (com base nos dados das 12 execuções de preparação de amostra) é de aproximadamente 90 min.\*, com apenas 40 min. de tempo de manipulação. Os rendimentos de RNA de 2,5 mL de sangue total humano saudável são  $\geq 3 \mu\text{g}$  para  $\geq 95\%$  das amostras processadas. Como os rendimentos são altamente dependentes dos doadores, os rendimentos individuais podem variar. Para doadores individuais, o PAXgene Blood RNA System fornece rendimentos altamente reprodutíveis e repetíveis (Figuras 8 e 9, páginas 47 e 48, respectivamente) e RT-PCR reprodutível e repetível (Figuras 10 e 11, páginas 53 e 54, respectivamente), tornando-o altamente robusto para testes de diagnóstico clínico.

A Figura 8 (página 47) indica a repetibilidade e reprodutibilidade globais do PAXgene Blood RNA System. Estudos adicionais foram conduzidos para mostrar a influência de diferentes lotes do PAXgene Blood RNA Kit e diferentes operadores na reprodutibilidade do rendimento de RNA e no desempenho de RT-PCR em tempo real. Como foram usadas amostras de sangue agrupadas para esses estudos, em vez de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) individuais, os resultados não refletem a repetibilidade do sistema, incluindo a flutuação entre coletas individuais de sangue, mas apenas a repetibilidade do preparo de amostras (consulte a Figura 9, página 48).

\* Tempo de execução total do protocolo, incluindo o manuseio antecipado dos PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugações, lavagem e ressuspensão de pellets).



**Figura 8: Isolamento de RNA reprodutível e repetível.** Amostras de sangue quadruplicadas de 14 doadores foram processadas manualmente por cada um dos 3 técnicos (A, B, C). Foram usados três conjuntos de equipamento e todas as amostras preparadas por um único técnico foram processadas usando o mesmo equipamento. [A] São exibidos os desvios padrão e as médias de rendimento de RNA por amostras replicadas dos mesmos doadores e de técnicos diferentes. [B] Doze amostras de sangue replicadas de cada um dos 14 doadores foram processadas por 3 técnicos diferentes. São apresentados os desvios padrão e as médias de rendimento de RNA por amostras dos mesmos doadores e de todos os técnicos. Para todas as amostras de RNA, as relações de  $A_{260}/A_{280}$  variaram de 1,8 a 2,2.



**Figura 9: Repetibilidade e reprodutibilidade do rendimento de RNA para diferentes operadores e lotes do PAXgene Blood RNA Kit, usando amostras de sangue agrupadas.** Amostras de sangue de 30 doadores diferentes foram coletadas em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 tubos por doador, 360 tubos no total). O conteúdo dos tubos de 3 doadores foi agrupado e subsequentemente dividido em alíquotas para 36 amostras. Essas 36 amostras por grupo de 3 doadores foram processadas manualmente por 3 operadores diferentes. Cada operador usou 3 lotes diferentes do PAXgene Blood RNA Kit para o isolamento de RNA e processou amostras quadruplicadas de cada um dos 10 grupos de doadores. **[A]** Rendimento de RNA e desvio padrão para cada combinação operador-lote. Amostras de sangue quadruplicadas dos 10 grupos de doadores foram processadas por 3 operadores diferentes (A, B, C) com cada um dos 3 lotes do kit (1, 2, 3). São apresentados os rendimentos médios (colunas) e desvios padrão (barras de erro) por amostra quadruplicada do mesmo grupo de doadores para um operador diferente e um lote diferente do kit. **[B]** CV do rendimento de RNA por grupo de doadores para todas as combinações operador-lote (A, B, C; 1, 2, 3), conforme calculado a partir do rendimento médio e desvio padrão do rendimento mostrado na Figura 9A.

**Tabela 1A: Reprodutibilidade em cada lote e de cada usuário para os grupos de doadores selecionados (1, 6, 9, 10)**

Combinação de dados	Grupo de doadores 1 ( $5,1 \times 10^6$ células/mL)			Grupo de doadores 6 ( $6,5 \times 10^6$ células/mL)		
	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Lote 1, usuário A	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
Lote 1, usuário B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
Lote 1, usuário C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
Lote 2, usuário A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
Lote 2, usuário B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
Lote 2, usuário C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
Lote 3, usuário A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
Lote 3, usuário B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
Lote 3, usuário C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
	Grupo de doadores 9 ( $8,4 \times 10^6$ células/mL)			Grupo de doadores 10 ( $10,2 \times 10^6$ células/mL)		
	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Lote 1, usuário A	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
Lote 1, usuário B	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Lote 1, usuário C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Lote 2, usuário A	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Lote 2, usuário B	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Lote 2, usuário C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Lote 3, usuário A	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Lote 3, usuário B	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Lote 3, usuário C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3

**Tabela 1B: Reprodutibilidade de cada usuário e entre todos os lotes dos grupos de doadores selecionados (1, 6, 9, 10)**

Combinação de dados	Grupo de doadores 1 ( $5,1 \times 10^6$ células/mL)			Grupo de doadores 6 ( $6,5 \times 10^6$ células/mL)		
	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Usuário A, todos os lotes	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Usuário B, todos os lotes	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Usuário C, todos os lotes	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
	Grupo de doadores 9 ( $8,4 \times 10^6$ células/mL)			Grupo de doadores 10 ( $10,2 \times 10^6$ células/mL)		
	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Usuário A, todos os lotes	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Usuário B, todos os lotes	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Usuário C, todos os lotes	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

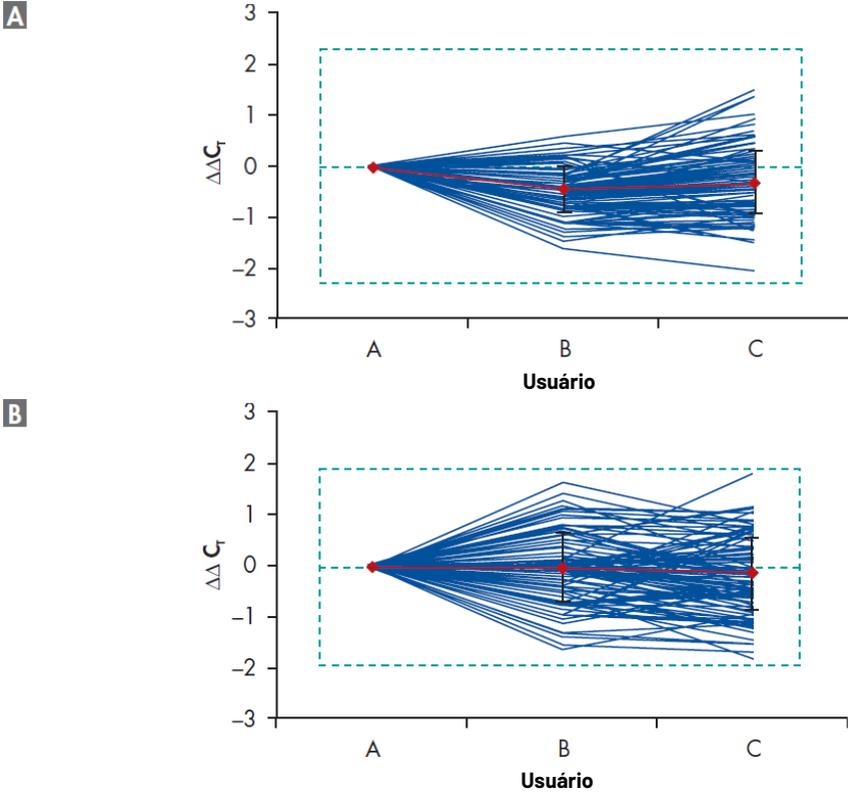
**Tabela 1C: Reprodutibilidade em cada lote e entre todos os usuários dos grupos de doadores selecionados (1, 6, 9, 10)**

Combinação de dados	Grupo de doadores 1 ( $5,1 \times 10^6$ células/mL)			Grupo de doadores 6 ( $6,5 \times 10^6$ células/mL)		
	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Lote 1, todos os usuários	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Lote 2, todos os usuários	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Lote 3, todos os usuários	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
	Grupo de doadores 9 ( $8,4 \times 10^6$ células/mL)			Grupo de doadores 10 ( $10,2 \times 10^6$ células/mL)		
	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Lote 1, todos os usuários	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Lote 2, todos os usuários	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Lote 3, todos os usuários	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

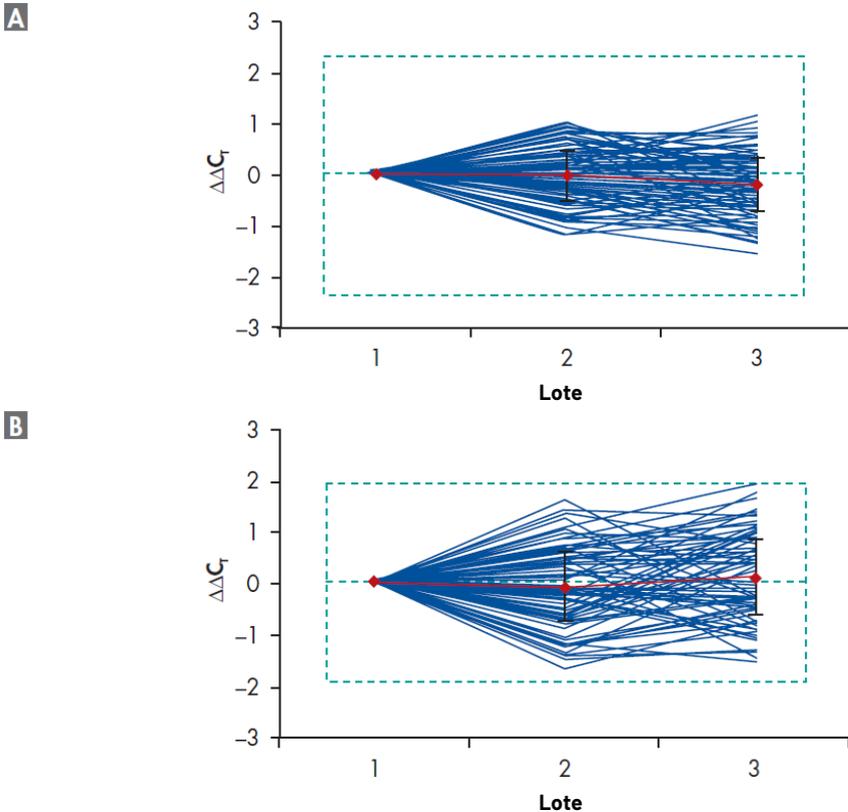
**Tabela 1D: Reprodutibilidade entre todos os lotes e todos os usuários dos grupos de doadores selecionados (1, 6, 9, 10)**

Combinação de dados	Grupo de doadores 1 ( $5,1 \times 10^6$ células/mL)			Grupo de doadores 6 ( $6,5 \times 10^6$ células/mL)		
	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Lote 1, todos os usuários	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
	Grupo de doadores 9 ( $8,4 \times 10^6$ células/mL)			Grupo de doadores 10 ( $10,2 \times 10^6$ células/mL)		
	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Lote 1, todos os usuários	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Análise detalhada de 4 grupos de doadores representativos. Os grupos foram selecionados de acordo com a contagem de leucócitos e refletem os valores superior, médio e inferior da faixa normal das contagens de leucócitos ( $4,8 \times 10^6$  -  $1,1 \times 10^7$  leucócitos/mL). A contagem de glóbulos brancos representa o valor médio das 3 contagens de glóbulos brancos dos 3 doadores por grupo de doadores.



**Figura 10: Reprodutibilidade de RT-PCR – entre usuários.** O RNA purificado no experimento descrito na Figura 9 foi usado para RT-PCR em tempo real. Os níveis de transcritos relativos de [A] FOS e [B] IL1B foram determinados por RT-PCR duplex em tempo real, usando rRNA 18S como um padrão interno. Os valores de todas as amostras encontram-se representados graficamente, relativamente aos valores do usuário A (10 grupos de doadores × 3 lotes de kit × 4 réplicas = 120 conjuntos de dados para cada gene), com médias (linhas vermelhas) e desvios padrão (barras pretas) para todas as amostras apresentadas. As linhas tracejadas indicam a precisão total de  $\pm 3\sigma$  dos ensaios (FOS: 2,34  $C_T$ ; IL1B: 1,93  $C_T$ ).



**Figura 11: Reprodutibilidade de RT-PCR – entre lotes de kit.** O RNA purificado no experimento descrito na Figura 9 foi usado para RT-PCR em tempo real. Os níveis de transcritos relativos de **[A] FOS** e **[B] IL1B** foram determinados por RT-PCR duplex em tempo real, usando rRNA 18S como um padrão interno. Os valores de todas as amostras encontram-se representados graficamente, relativamente aos valores do lote de kit 1 (10 grupos de doadores × 3 usuários × 4 réplicas = 120 conjuntos de dados para cada gene), com desvios médios (linhas vermelhas) e padrão (barras pretas) para todas as amostras exibidas. As linhas tracejadas indicam a precisão total de  $\pm 3x$  dos ensaios (FOS: 2,34  $C_T$ ; IL1B: 1,93  $C_T$ ).

Tabela 2: Resumo dos dados de RT-PCR das Figuras 10 e 11

Sistema de teste	Ensaio FOS/18S rRNA		Ensaio IL1B/18S rRNA	
Comparação de dados	Média ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ DP ( $\Delta\Delta C_T$ )	Média ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ DP ( $\Delta\Delta C_T$ )
<b>Reprodutibilidade de cada usuário e entre todos os lotes</b>				
Todos os usuários, lote 1-lote 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Todos os usuários, lote 1-lote 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Todos os usuários, lote 1-lote 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
<b>Reprodutibilidade de cada usuário e entre todos os lotes</b>				
Todos os lotes, usuário A-usuário A	0,00	0,00	0,00	0,00
Todos os lotes, usuário A-usuário B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Todos os lotes, usuário A-usuário C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Usuário: técnico, realizou o estudo.

Lote: número do lote de kit usado neste estudo.

DP: desvio padrão.

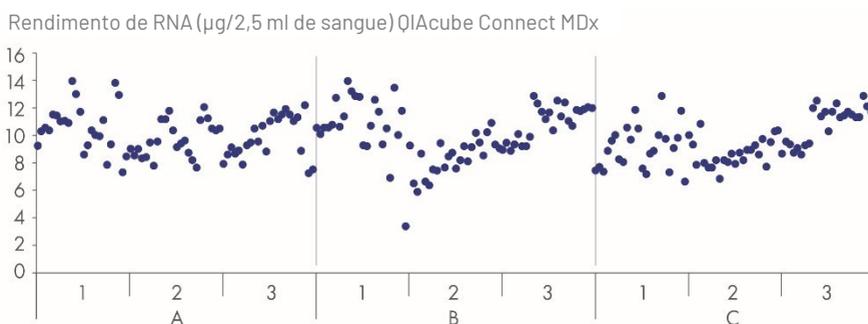
Os valores de média  $\Delta\Delta C_T$  (N = 120) e desvios padrão são mostrados para os dados apresentados nas Figuras 10 e 11.

## Isolamento automatizado de RNA

Os rendimentos de RNA de 2,5 mL de sangue total humano saudável são  $\geq 3 \mu\text{g}$  para  $\geq 95\%$  das amostras processadas. A Figura 12 (página 56) indica os rendimentos de RNA de um total de 216 amostras preparadas usando o protocolo automatizado com 3 lotes de kit por 3 operadores. Como foram usadas amostras de sangue agrupadas em vez de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) individuais para estes estudos, os resultados não refletem o rendimento de RNA esperado de amostras únicas de coletas de sangue individuais. Uma vez que os rendimentos são altamente dependentes dos dados, os rendimentos individuais podem variar (Figura 12, página 56).

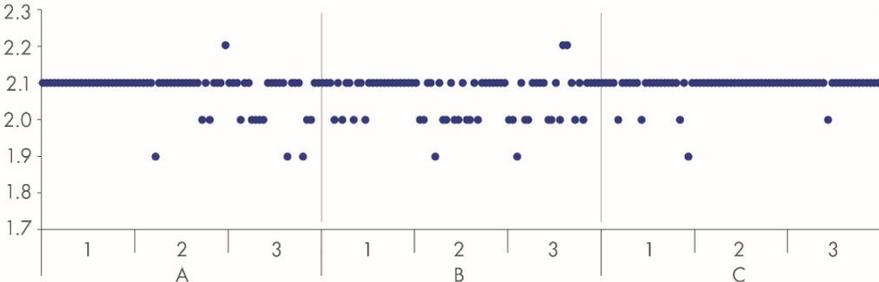
Pelo menos 95% das amostras não apresentam inibição na RT-PCR, quando o eluato representa até 30% do volume de reação de RT-PCR. Usando o protocolo automatizado, a contaminação cruzada entre amostras é indetectável, conforme medido pela RT-PCR quantitativa e em tempo real de sequências dos transcritos de ABL1 e FOS em amostras negativas para RNA (água) pareadas com amostras positivas para RNA (sangue total humano) na mesma execução.

O RNA isolado com o PAXgene Blood RNA System e o protocolo automatizado é puro, conforme mostrado pela falta de inibição de RT-PCR e valores de  $A_{260}/A_{280}$  entre 1,8 e 2,2. O DNA genômico está presente a  $\leq 1\%$  (w/w) em  $\geq 95\%$  de todas as amostras, conforme medição por real-time PCR quantitativa de uma sequência do gene de beta-actina. As Figuras 13 e Figure 14 (página 57) mostram os valores de  $A_{260}/A_{280}$  e DNA genômico relativo de um total de 216 amostras preparadas usando o protocolo automatizado com 3 lotes de kit por 3 operadores.



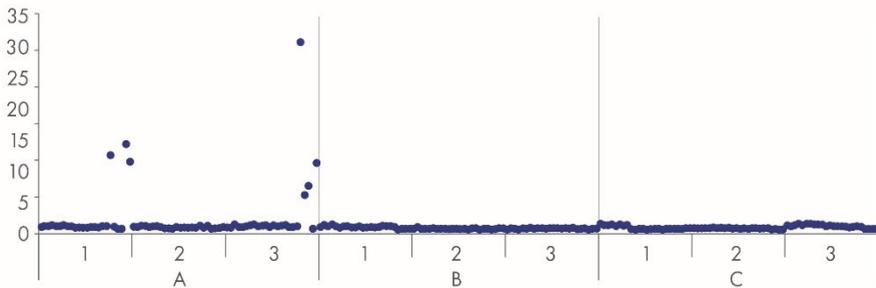
**Figura 12: Rendimento de RNA – processamento automatizado com o QIAcube Connect MDx.** Amostras de sangue de doadores individuais foram coletadas em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). O conteúdo dos tubos foi agrupado em 6 grupos de doadores e subsequentemente dividido em aliquotas. Um total de 216 tubos (ou seja, 36 tubos por grupo) foi processado por 3 operadores diferentes (A, B, C). Cada operador usou 3 lotes diferentes (1, 2, 3) do PAXgene Blood RNA Kit para o isolamento automatizado com o QIAcube Connect MDx e processou amostras quadruplicadas de cada um dos 6 grupos de doadores. Os rendimentos de RNA de todas as amostras individuais são mostrados para cada combinação operador-lote.

Pureza de RNA ( $A_{260}/A_{280}$ ) QIAcube Connect MDx



**Figura 13: Pureza de RNA (valores  $A_{260}/A_{280}$ ) – processamento automatizado com o QIAcube Connect MDx.** O RNA foi purificado por 3 operadores diferentes (A, B, C) usando 3 lotes diferentes (1, 2, 3) do PAXgene Blood RNA Kit com QIAcube Connect MDx no experimento descrito na Figura 12. Os valores  $A_{260}/A_{280}$  de todas as amostras individuais são mostrados para cada combinação operador-lote.

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



**Figura 14: Pureza de RNA (% de contaminação do DNA genômico) – processamento automatizado com o QIAcube Connect MDx.** O RNA foi purificado por 3 operadores diferentes (A, B, C) usando 3 lotes diferentes (1, 2, 3) do PAXgene Blood RNA Kit com QIAcube Connect MDx no experimento descrito na Figura 12. As quantidades de DNA genômico (w/w) em todas as amostras individuais são mostradas para cada combinação operador-lote.

O protocolo automatizado de isolamento de RNA usando o PAXgene Blood RNA System fornece resultados de RT-PCR altamente reproduzíveis e repetíveis tornando-o altamente robusto para testes de diagnóstico clínico.

## Estabilidade do RNA isolado

As amostras de RNA isoladas a partir de PAXgene Blood RNA Tubes contendo sangue com o PAXgene Blood RNA Kit ficam estáveis durante cinco anos de armazenamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  e durante sete anos de armazenamento a  $-70^{\circ}\text{C}$  (ponto final de estudo).

# Notas importantes

## Usando o QIAcube Connect MDx

Certifique-se de estar familiarizado com o funcionamento do QIAcube Connect MDx. Leia o Manual do usuário do instrumento e qualquer informação adicional fornecida com o instrumento, prestando muita atenção às informações de segurança, antes de iniciar o protocolo PAXgene Blood RNA automatizado.

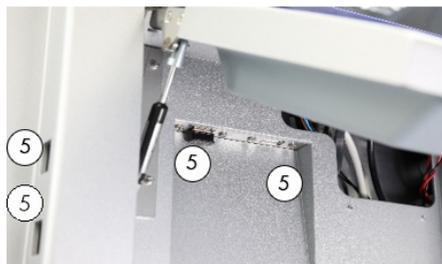
## Iniciando o QIAcube Connect MDx

Feche a tampa do QIAcube Connect MDx e ligue o instrumento com o interruptor de alimentação (consulte a Figura 15, página 60).

É emitido um sinal sonoro e a tela de inicialização é exibida. O instrumento realiza automaticamente testes de inicialização.



Vista frontal do QIAcube Connect MDx



Tela sensível ao toque levantada



Vista traseira do QIAcube Connect MDx (lado esquerdo)



Vista traseira do QIAcube Connect MDx (lado direito)

Figura 15: Recursos externos do QIAcube Connect MDx.

- |   |   |
|---|---|
| <p>(1) Tela sensível ao toque</p> <p>(2) Tampa</p> <p>(3) Gaveta "Waste" (Resíduos)</p> <p>(4) Interruptor de alimentação</p> | <p>(5) 2 portas USB no lado esquerdo da tela sensível ao toque; 2 portas USB atrás da tela sensível ao toque (módulo Wi-Fi conectado a 1 porta USB)</p> <p>(6) Porta Ethernet RJ-45</p> <p>(7) Soquete do cabo de alimentação</p> <p>(8) Saída de ar frio</p> |
|---|---|

## Tela sensível ao toque

O QIAcube Connect MDx é controlado por meio de uma tela sensível ao toque. Essa tela permite que o usuário opere o instrumento e o orienta durante a configuração da mesa de trabalho. Durante o processamento da amostra, a tela sensível ao toque exibe o status do protocolo e o tempo restante.



Figura 16: Tela sensível ao toque do QIAcube Connect MDx levantada.

## Instalando protocolos no QIAcube Connect MDx

Poderá ser necessária uma instalação inicial dos protocolos antes de realizar a primeira execução do preparo de RNA no QIAcube Connect MDx. Instale os protocolos "PAXgene Blood RNA – Parte A" e "PAXgene Blood RNA – Parte B".

Os protocolos para o QIAcube Connect MDx são fornecidos em **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)** e precisam ser baixados para o pen drive fornecido com o instrumento. Esses protocolos serão transferidos para o instrumento por meio da porta USB.

A porta USB (localizada na lateral da tela sensível ao toque, consulte a Figura 15, página 60), permite a conexão do QIAcube Connect MDx ao pen drive fornecido com o instrumento. Arquivos de dados, como arquivos de log ou arquivos de relatório, também podem ser transferidos por meio da porta USB do instrumento para o pen drive.

-  A porta USB deve ser usada somente com o pen drive fornecido pela QIAGEN. Não conecte outros dispositivos a esta porta.
-  Não remova o pen drive enquanto estiver baixando protocolos ou transferindo arquivos de dados, nem durante uma execução de protocolo.

Para obter mais detalhes sobre o processo de carregamento de protocolos para o QIAcube Connect MDx, consulte o manual do usuário do instrumento.

## Carregando o QIAcube Connect MDx

Para economizar tempo, o carregamento pode ser realizado durante uma ou ambas as etapas de centrifugação de 10 min. (etapas 3 e 5) em "Protocolo: Isolamento automatizado de RNA total de sangue total humano coletado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)", página 33.

### Frascos de reagente

Antes de cada execução no QIAcube Connect MDx, encha cuidadosamente os 4 frascos de reagente com os reagentes listados na Tabela 3 (página 63) até o nível indicador máximo ou, se isso não for possível, até o nível permitido pelos volumes de tampão fornecidos no PAXgene Blood RNA Kit. Rotule os frascos e tampas de forma clara com os nomes dos tampões e coloque os frascos de reagente cheios nas posições apropriadas do rack de frascos de reagente. Carregue o rack na mesa de trabalho do instrumento conforme mostrado (Figuras 17 e 18, páginas 63 e 64, respectivamente).

-  O volume fornecido de tampão BR2 não encherá um frasco de reagente até o nível indicador. Os tampões BR3 e BR4 podem não encher o frasco até o nível indicador depois de processar várias amostras em execuções anteriores.
-  Certifique-se de remover as tampas dos frascos antes de colocá-los na mesa de trabalho.



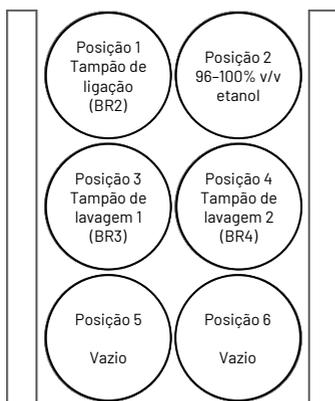
Os volumes de tampão fornecidos no PAXgene Blood RNA Kit (50) são suficientes para um máximo de 7 execuções de preparo de RNA no QIAcube Connect MDx com 2 a 12 amostras por execução. Geralmente, as execuções com um número pequeno de amostras por execução devem ser evitadas para processar um total de 50 amostras por kit. Mais de 7 execuções de preparo de RNA podem levar a volumes de tampão insuficientes para processar as últimas amostras.

**Tabela 3: Posições no rack de frascos de reagente**

Posição	Reagente
1	Tampão de ligação (BR2)
2	Etanol (96-100% v/v)
3	Tampão de lavagem 1 (BR3)
4	Tampão de lavagem 2 (BR4)*
5	– (deixar vazio)
6	– (deixar vazio)

\* O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido como um concentrado. Antes de usar pela primeira vez, adicione 4 volumes de etanol (96-100% v/v, grau de pureza p.a.), conforme indicado no frasco, para obter uma solução de trabalho.

**A**



**B**



**Figura 17: Carregando o rack de frascos de reagente. [A]** Esquema das posições e do conteúdo dos frascos no rack de frascos de reagente. **[B]** Carregando o rack no QIAcube Connect MDx.

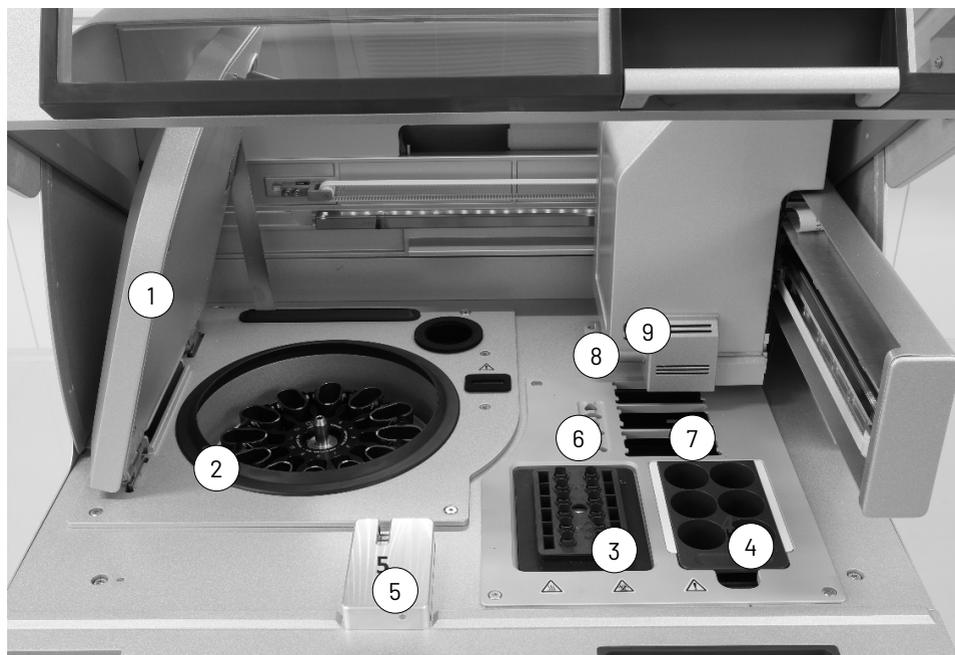


Figura 18: Vista interna do QIAcube Connect MDx.

- |   |                                      |   |  |
|---|--------------------------------------|---|--|
| ① | Tampa de centrifuga                  | ⑥ | Fendas para MCT  |
| ② | Centrifuga                           | ⑦ | 3 fendas para racks de ponteiras   |
| ③ | Agitador                             | ⑧ | Fendas para descarte de ponteiras e colunas  |
| ④ | Rack de frascos de reagente          | ⑨ | Braço robótico (inclui pipetador de 1 canal, garra, sensor ultrassônico e óptico e LED UV) |
| ⑤ | Sensor de ponteiras e trava da tampa |   |  |

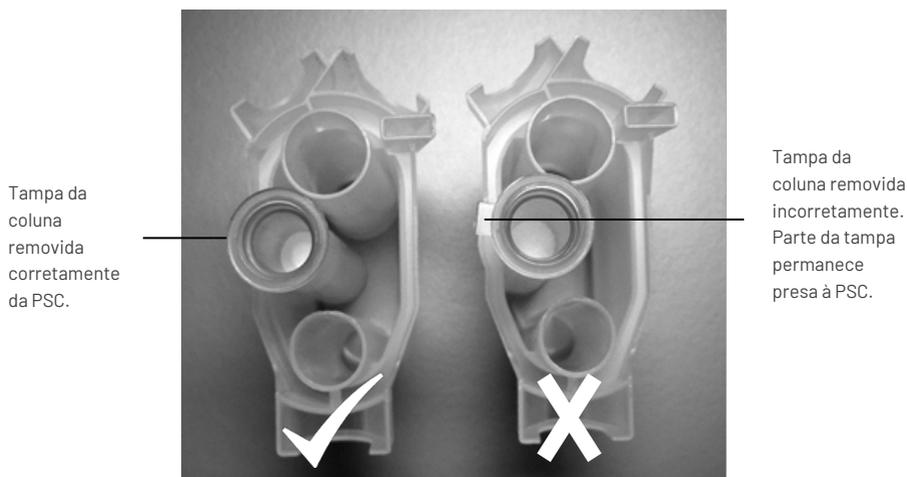
## Material plásticos de colunas de centrifugação (PSC, PRC), MCT e QIAcube Connect MDx

Coloque 2 racks de ponteiras preenchidas de ponteiras com filtro de 1000  $\mu$ L no QIAcube Connect MDx (consulte a Figura 18, página 64). Preencha os racks com ponteiras quando necessário.

**i** Use apenas ponteiras com filtro de 1000  $\mu$ L projetadas para uso com o QIAcube Connect MDx.

Rotule os Rotor Adapters e os MCTs para cada amostra usando uma caneta permanente. Abra a PSC a ser usada e corte completamente a tampa usando uma tesoura (consulte a Figura 19).

**i** Para um funcionamento adequado da garra robótica do QIAcube Connect MDx, remova completamente (corte) as tampas e todas as peças plásticas que conectam a tampa à PSC (consulte a Figura 19). Caso contrário, a garra robótica não consegue segurar a PSC corretamente.



**Figura 19: Carregando a PSC.** A PSC é carregada na posição central do adaptador de rotor. Corte a tampa da PSC antes de carregar a coluna.

Carregue a PSC (sem tampa, consulte a Figura 19, página 65) a PRC e o MCT rotulado nas posições apropriadas em cada adaptador de rotor rotulado, conforme mostrado na Tabela 4 e na Figura 20.

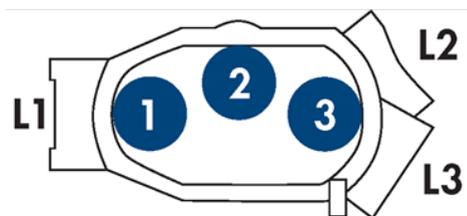


Certifique-se de que as tampas da coluna de centrifugação (PRC) e do MCT sejam empurradas até o fundo das fendas na extremidade do adaptador do rotor. Caso contrário, as tampas se quebrarão durante a centrifugação.

**Tabela 4: Consumíveis de plástico no adaptador do rotor**

Posição	Reagente	Posição da tampa
1	Coluna de centrifugação PAXgene RNA (vermelho, PRC)	L1
2	Coluna de centrifugação PAXgene Shredder (lilás, PSC)(tampa cortada antes da colocação no adaptador de rotor)	–
3	MCT*	L3

\* Use o MCT (1,5 mL) incluído no PAXgene Blood RNA Kit.



**Figura 20: Posições no adaptador de rotor.** O adaptador de rotor tem três posições de tubo (1–3) e três posições de tampa (L1–L3).

## Carregando a centrífuga

Carregue os Rotor Adapters montados nos recipientes do QIAcube Connect MDx, conforme mostrado na Figura 21 abaixo.



Se processar menos de 12 amostras, certifique-se de carregar o rotor de centrifuga balanceado radialmente (consulte a Figura 22, página 68). Todos os recipientes da centrífuga devem estar montados antes de iniciar uma execução de protocolo, mesmo que menos de 12 amostras sejam processadas. Não é possível processar uma única amostra ou 11 amostras.



**Figura 21:** Carregando a centrífuga no QIAcube Connect MDx. Carregue os Rotor Adapters montados nos recipientes da centrífuga.

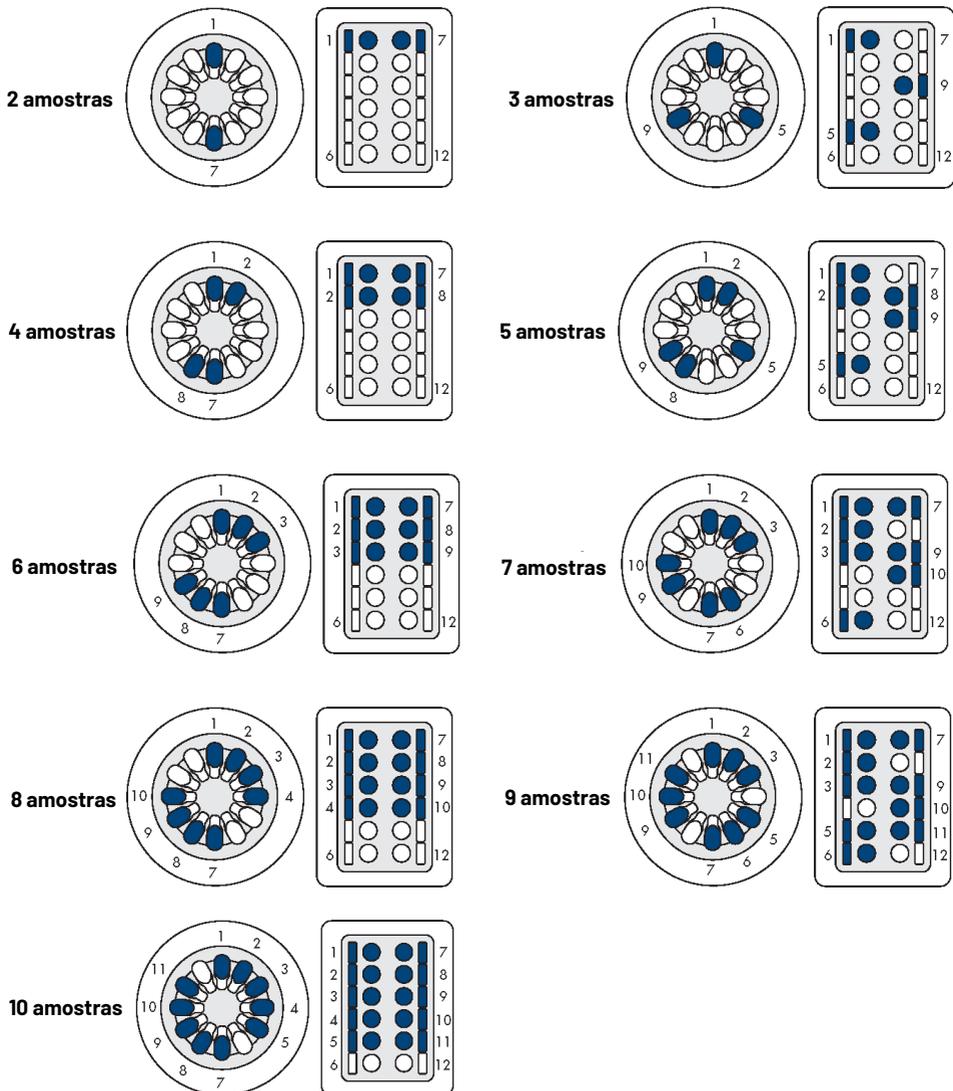


Figura 22: Carregando a centrífuga e o agitador. As posições da centrífuga e do agitador são mostradas para o processamento de duas (2) a dez (10) amostras. Não é possível processar uma (1) amostra ou 11 amostras. Para processar 12 amostras, todas as posições da centrífuga e do agitador devem ser carregadas (imagem não mostrada).

## Tubos de processamento

Remova quaisquer PTs deixados nas fendas para MCTs das execuções anteriores (consulte a Figura 18, página 64). Encha três PTs com a quantidade de reagentes indicada na Tabela 5 de acordo com o número de amostras na execução.

Para a mistura de incubação com DNase I, pipete o volume indicado de tampão de digestão de DNA (RDD) em um PT e adicione o volume indicado de solução de estoque de DNase I (RNFD). Misture pipetando suavemente a mistura completa para cima e para baixo 3 vezes usando uma ponteira de pipeta de 1000 µL.



Use os PTs de 2 mL incluídos no PAXgene Blood RNA Kit. Rotule os tubos claramente com os nomes dos reagentes e coloque-os na posição apropriada nas fendas para MCTs, conforme indicado na Tabela 6 (página 70).



A DNase I (RNFD) é especialmente sensível à desnaturação física. Misture apenas por pipetagem, usando as ponteiras de pipeta com orifício largo para reduzir o cisalhamento. Não agite em vórtex.

Certifique-se de pipetar somente o volume requerido, conforme indicado na Tabela 5 abaixo.

**Tabela 5: Volume de reagente necessário em PTs nas fendas para MCT**

Número de amostras	Volume de reagente para o número indicado de amostras (µL)		
	Proteinase K (PK)	Mistura de incubação de DNase I	Tampão de eluição (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

**Tabela 6: Fendas para MCT**

	Posição		
	A	B	C
Conteúdo	Proteinase K	Mistura de incubação de DNase I	Tampão de eluição (BR5)
Vaso	Tubo de processamento*	Tubo de processamento*	Tubo de processamento*

\* Use os PTs de 2 mL incluídos no PAXgene Blood RNA Kit.

# Descarte

Para o descarte seguro após a coleta do espécime e do isolamento manual de RNA, consulte as informações e precauções de segurança nas páginas 19 e 20, respectivamente.

Além disso, para o isolamento automatizado de RNA usando QIAcube Connect MDx, consulte as Figuras 21 e 22, páginas 67 e 68, respectivamente, que indicam fendas dedicadas de ponteiros e colunas usadas para o descarte.

# Referências

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.

# Guia de solução de problemas

Este guia de solução de problemas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para obter mais informações, consulte a página de perguntas frequentes (Frequently Asked Questions, FAQ) no nosso Centro de Suporte Técnico: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Os cientistas de Assistência Técnica da QIAGEN estão sempre disponíveis para responder a quaisquer questões que você possa ter sobre as informações e os protocolos contidos neste manual ou sobre as tecnologias de amostragem e ensaio (para obter informações de contato, consulte a última página ou visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

Comentários e sugestões	
<b>RNA degradado</b>	
a) Contaminação por RNase	 Tenha cuidado para não introduzir quaisquer RNases nos reagentes durante o procedimento ou manuseio posterior (consulte o Apêndice A, página 78).
<b>Baixo rendimento de RNA</b>	
b) Menos de 2,5 mL de sangue coletado no PAXgene Blood RNA Tube (BRT)	 Certifique-se de que coleta 2,5 mL de sangue no PAXgene Blood RNA Tube (BRT; consulte o <i>Manual de PAXgene Blood RNA Tube</i> )
c) Concentração de RNA medida em água	 O RNA deve ser diluído em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5*, para uma quantificação precisa (consulte o Apêndice B, página 79).
d) Resíduos celulares transferidos para a PRC nas etapas 9 e 10 do protocolo manual	 Evite a transferência de partículas grandes ao pipetar o sobrenadante na etapa 7 do protocolo manual (a transferência de pequenos detritos não afetará o procedimento).
e) Sobrenadante não completamente removido na etapa 3	 Assegure-se de que todo o sobrenadante seja removido. Se o sobrenadante for decantado, remova as gotas da borda do PAXgene Blood RNA Tube (BRT), passando por uma toalha de papel. Tome as devidas precauções para evitar a contaminação cruzada.
f) Após a coleta no PAXgene Blood RNA Tube (BRT), o sangue é incubado por menos de 2 h	 Incube o sangue no PAXgene Blood RNA Tube (BRT) por, pelo menos, 2 h após a coleta.

\* Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre utilize um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

Comentários e sugestões	
<b>Valor <math>A_{260}/A_{280}</math> baixo</b>	
g) Água usada na diluição de RNA para a medição de $A_{260}/A_{280}$	 Use 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, para diluir o RNA antes de medir a pureza* (consulte o Apêndice B, página 79).
h) Espectrofotômetro zerado incorretamente	 Zere o espectrofotômetro usando um branco consistindo na mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, como nas amostras a serem medidas. O tampão de eluição (BR5) apresenta uma absorbância alta a 220 nm, o que pode provocar níveis elevados de absorbância em segundo plano, caso o espectrômetro não seja devidamente zerado.
<b>Mau funcionamento do instrumento</b>	
i) O QIAcube Connect MDx não funciona corretamente	Leia o <i>Manual de usuário do QIAcube Connect MDx</i> , prestando muita atenção à seção de solução de problemas. Certifique-se de que a manutenção do instrumento tenha sido devidamente realizada, conforme descrito no manual do usuário.

\* 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.

# Símbolos

Os seguintes símbolos podem aparecer nas instruções de uso ou na embalagem e no rótulo. Os símbolos adicionais são explicados no Conteúdo do kit (página 6).

Símbolo	Definição do símbolo
V<N1>	Versão <N1> do produto
 <N2>	Contém reagentes suficientes para <N2> testes
	Consulte as instruções de uso
	Data de validade
<b>IVD</b>	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
<b>REF</b>	Número de referência
<b>LOT</b>	Número de lote
<b>MAT</b>	Número de material
<b>COMP</b>	Componentes
<b>NUM</b>	Número
<b>KU</b>	Unidades Kunitz
<b>ADD</b>	Adição
<b>CONT</b>	Contém
<b>RCNS</b>	Reconstituído

**DNase**

Desoxirribonuclease I

**EtOH**

Etanol

**GITC**

Isotiocianato de guanidina

**RNase-Free DNase Set**

RNase-Free DNase Set

**GTIN**

Número global de item comercial



Limites de temperatura



Limite superior de temperatura



Fabricante

**EC REP**

Representante europeu autorizado em conformidade com o Regulamento (UE) 2017/746



Nota importante



Adição de etanol



Marca CE. Este produto atende aos requisitos do Regulamento (UE) 2017/746 para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

**UDI**

Identificador único do dispositivo



Cuidado



AVISO: Superfície quente

## Informações de contato

Na QIAGEN, temos orgulho da qualidade e da disponibilidade do nosso suporte técnico. Nossos Departamentos de Assistência Técnica são compostos por cientistas experientes com ampla experiência prática e teórica em biologia molecular e no uso de produtos da PreAnalytiX. Se você tiver alguma dúvida sobre o PAXgene Blood RNA Kit, não hesite em nos contatar.

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de Suporte Técnico no site [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), ligue 00800-22-44-6000 ou entre em contato com um dos Departamentos de Assistência Técnica da QIAGEN ou os distribuidores locais (consulte o verso do manual ou acesse [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Anexo A: Observações gerais sobre o manuseio de RNA

## Manuseio de RNA



As ribonucleases (RNases) são enzimas muito estáveis e ativas que, geralmente, não precisam de cofatores para funcionar. Como as RNases são difíceis de desativar e até uma quantidade mínima é suficiente para degradar o RNA, não use utensílios de plástico ou de vidro sem primeiro eliminar a possível contaminação por RNases. Muito cuidado deve ser tomado, para evitar introduzir, sem querer, RNases na amostra de RNA durante ou depois do procedimento de isolamento. Para criar e manter um ambiente sem RNase, deverão ser tomadas precauções durante o pré-tratamento e o uso de vasos e soluções descartáveis e não descartáveis ao trabalhar com RNA.

## Manuseio geral



Use sempre uma técnica asséptica e microbiológica adequada ao trabalhar com RNA. Partículas das mãos e de pó carregam bactérias e mofo e são as fontes mais comuns de contaminação por RNase. Sempre use luvas de látex ou vinil durante o manuseio de reagentes e amostras de RNA para evitar contaminações por RNase por superfície da pele ou por poeira do equipamento de laboratório. Troque as luvas com frequência e mantenha os tubos fechados, sempre que possível. Mantenha o RNA purificado no gelo, quando as alíquotas forem pipetadas para aplicações descendentes.

Protocolos para a remoção de contaminação por RNase de vidros e soluções podem ser encontrados em guias gerais de biologia molecular, como Sambrook, J. e Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

# Anexo B: Quantificação e determinação da qualidade de RNA total

## Quantificação de RNA

A concentração de RNA deve ser determinada através da medição da absorbância a 260 nm ( $A_{260}$ ) em um espectrofotômetro. Para garantir a significância, as leituras devem estar no intervalo linear do espectrofotômetro. Uma absorbância de 1 unidade a 260 nm corresponde a 44 µg de RNA por mL ( $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/mL}$ ). Esta relação é válida apenas para medições em 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, \*. Portanto, se for necessário diluir a amostra de RNA, isso deve ser feito em 10 mM de Tris-HCl. Conforme discutido abaixo (consulte "Pureza do RNA", página 80), a relação entre os valores de absorbância a 260 e 280 nm dá uma estimativa da pureza do RNA. Quando medir amostras de RNA, certifique-se de que as cubetas estejam isentas de RNase. Zere o espectrofotômetro usando um branco consistindo na mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e tampão Tris-HCl das amostras a serem medidas. O tampão de eluição (BR5) apresenta uma absorbância alta a 220 nm, o que pode provocar níveis elevados de absorbância em segundo plano, caso o espectrômetro não seja devidamente zerado. Um exemplo do cálculo envolvido na quantificação de RNA é mostrado abaixo.

Volume da amostra de RNA = 80 µL  
Diluição (1/15) = 10 µL de amostra de RNA + 140 µL de 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5  
Meça a absorbância da amostra diluída em uma cubeta (sem RNase).  
 $A_{260}$  = 0,3  
Concentração de amostra =  $44 \times A_{260} \times \text{fator de diluição}$   
=  $44 \times 0,3 \times 15$   
= 198 µg/mL

\* Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre utilize um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

$$\begin{aligned} \text{Rendimento total} &= \text{concentração} \times \text{volume de amostra em mililitros} \\ &= 198 \mu\text{g/mL} \times 0,08 \text{ mL} \\ &= 15,8 \mu\text{g RNA} \end{aligned}$$

## Pureza do RNA

A relação das leituras a 260 e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) fornece uma estimativa da pureza do RNA em relação aos contaminantes que absorvem em UV, como a proteína. No entanto, a relação de  $A_{260}/A_{280}$  é influenciada consideravelmente pelo pH. Um pH mais baixo resulta em uma menor relação de  $A_{260}/A_{280}$  e em sensibilidade reduzida à contaminação proteica.\* Para valores precisos, recomendamos a medição da absorbância em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5. O RNA puro tem uma relação de  $A_{260}/A_{280}$  de 1,8–2,2 em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5. Zere o espectrofotômetro usando um branco consistindo na mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e tampão Tris-HCl das amostras a serem medidas. O tampão de eluição (BR5) apresenta uma absorbância alta a 220 nm, o que pode provocar níveis elevados de absorbância em segundo plano, caso o espectrômetro não seja devidamente zerado.

\* 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.

# Anexo C: Manuseando PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



As seguintes recomendações da BD podem ser úteis ao manusear PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Consulte o *Manual de PAXgene Blood RNA Tube* para obter mais informações sobre PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

## Instruções para remoção do fecho BD Hemogard

1. Segure o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) com uma mão, colocando o polegar sob o fecho BD Hemogard. (Para maior estabilidade, coloque o braço na superfície sólida.) Com a outra mão, gire o fecho BD Hemogard enquanto empurra simultaneamente para cima com o polegar da outra mão, apenas até que a rolha do tubo se solte.
2. Afaste o polegar antes de levantar o fecho. Não use o polegar para empurrar o fecho do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) para fora. Cuidado: se o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) contiver sangue, existe um risco de exposição. Para ajudar a evitar ferimentos durante a remoção do fecho, é importante que o polegar usado para empurrar o fecho para cima não esteja em contato com o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) após o fecho BD Hemogard ser solto.
3. Levante o fecho do PAXgene Blood RNA Tube (BRT). No caso improvável de a proteção plástica se separar da rolha de borracha, não recoloque o fecho. Remova cuidadosamente a rolha de borracha do PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

## Instruções para inserção do fecho BD Hemogard secundário

1. Substitua o fecho sobre o PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Gire e pressione firmemente para baixo até que a rolha esteja totalmente recolocada. A reinserção completa da rolha é necessária para que o fecho permaneça seguro no PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante o manuseio.

# Informações para pedidos

Produto	Conteúdo	Nº de ref.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, tubos de processamento, DNase I sem RNase, reagentes e tampões sem RNase. Para uso em conjunto com PAXgene Blood RNA Tubes.	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 tubos de coleta de sangue	762165
<b>Produtos relacionados que podem ser encomendados à QIAGEN para o isolamento automatizado de RNA no QIAcube</b>		
Starter Pack, QIAcube	A embalagem inclui: racks de frascos de reagente (3); tiras de rotulagem de rack (8); ponteiros com filtro de 200 µL (1024); ponteiros com filtro de 1000 µL (1024); ponteiros com filtro de 1000 µL de orifício largo (1024); frascos de reagente de 30 mL (18); adaptadores de rotor (240); suporte do adaptador de rotor	990395
Filter-Tips, 1000 µL (1024)	Disposable filter-tips estéreis, com rack	990352
Reagent Bottles, 30 mL (6)	Frascos de reagente (30 mL) com tampas; embalagem de 6; para uso com a rack de frascos de reagente do QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 × 24)	Para 240 preparos: 240 Rotor Adapters descartáveis; para uso com o QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Rack para acomodação de frascos de reagente, 6 × 30 mL, na mesa de trabalho do QIAcube	9026197
Rotor Adapter Holder	Suporte para 12 Rotor Adapters descartáveis; para uso com o QIAcube	990392

Produto	Conteúdo	Nº de ref.
<b>Produtos relacionados que podem ser encomendados à BD* para a coleta de sangue com PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)*</b>		
BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set	Agulha 21G de 0,75 polegadas (0,8 x 19 mm), tubo de 12 polegadas (305 mm) com adaptador luer; 50 por caixa, 200 por embalagem	367286/367281
BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set	Agulha 21G de 3/4 polegadas (0,8 x 19 mm), tubo de 12 polegadas (305 mm) com adaptador luer. 50/Caixa, 200/embalagem	367344
BD Vacutainer One-Use Holder	Embalagem apenas para 13 mm e 16 mm de diâmetro; 1000/embalagem	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	Sachê de 13 x 75 mm de 4,0 mL com fecho vermelho BD Hemogard e etiqueta de papel; 100/caixa, 1000/embalagem	368975/367812
BD Vacutainer EST Tube	Sachê de 13 x 75 mm de 3,0 mL com fecho transparente BD Hemogard e -etiqueta transparente; 100/caixa, 1000/embalagem	362725
BD Vacutainer No Additive (Z) Tube	Sachê de 13 x 75 mm de 3,0 mL com fecho transparente BD Hemogard e etiqueta de papel; 100/caixa, 1000/embalagem	366703

\* Esses acessórios de coleta de sangue representam produtos típicos que podem ser usados com PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Para saber mais sobre esses acessórios, bem como para encomendá-los, visite [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

## Histórico de revisões do documento

Data	Alterações
[R1] abril de 2022	Lançamento de IVDR inicial
[R2] fevereiro de 2023	O endereço da PreAnalytiX GmbH mudou de "Feldbachstrasse" para "Garstligweg 8". Adição de produtos BD nas informações sobre pedidos. Atualização das informações de segurança.

## Notas



Para obter informações de licenciamento atualizadas e isenções de responsabilidade específicas do produto, consulte o manual do usuário ou o manual do kit PreAnalytiX ou QIAGEN correspondente. Os manuais do usuário e dos kits PreAnalytiX e QIAGEN estão disponíveis em [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) e [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ou podem ser solicitados à Assistência Técnica da QIAGEN ou ao distribuidor local.

**Better samples  
More to explore**



Saiba mais em: [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)

HB-3009-002 02/2023