

Febbraio 2023

PAXgene[®] Blood RNA Kit (manuale) Istruzioni per l'uso



Versione 3 (V3)

IVD

Per uso diagnostico in vitro



REF

762174



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

Prodotto da QIAGEN[®] GmbH per PreAnalytiX GmbH

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R2

MAT

1130774IT

Marchi commerciali: 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 diversamente indicato, PreAnalytiX, il logo PreAnalytiX e tutti gli altri marchi di fabbrica sono di proprietà di PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH.

Contratto di licenza limitata per PAXgene Blood RNA Kit

L'uso di questo prodotto implica l'accordo di qualsiasi acquirente o utente del prodotto ai seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al presente manuale e soltanto con i componenti contenuti nel pannello. PreAnalytiX® non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo pannello con qualsiasi componente non incluso in questo pannello fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com e www.preanalytix.com.
2. Se non espressamente dichiarato nelle licenze, PreAnalytiX non garantisce in alcun modo che questi kit e/o il relativo impiego non violino i diritti di terze parti.
3. Il presente kit è concesso in licenza per l'impiego monouso e non può essere riutilizzato, ripristinato o rivenduto.
4. PreAnalytiX esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra.
6. PreAnalytiX può imporre presso qualunque tribunale i divieti del presente Contratto di Licenza Limitato e recupererà tutte le spese di indagine e spese legali, comprese le parcelle degli avvocati, in qualunque azione per imporre il presente Contratto di Licenza Limitato o qualsiasi diritto di proprietà intellettuale correlato al kit e/o ai suoi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, consultare il sito www.qiagen.com e www.preanalytix.com.

HB-3009-002 BD-8945 1130774IT © 2023 PreAnalytiX GmbH, tutti i diritti riservati.

Distributori PreAnalytiX

I prodotti PreAnalytiX sono prodotti e distribuiti da QIAGEN e BD per PreAnalytiX.

Indice

Indice.....	3
Uso previsto.....	6
Utente previsto.....	6
Descrizione e principio.....	7
Introduzione.....	7
Principio e procedura.....	7
Prelievo e stabilizzazione del campione.....	8
Estrazione dell'RNA.....	8
Estrazione dell'RNA manuale.....	9
Estrazione dell'RNA in automatico.....	11
Materiali in dotazione.....	14
Contenuto del kit.....	14
Componenti del kit.....	15
Materiale necessario ma non in dotazione.....	16
Per tutti i protocolli.....	16
Per il protocollo manuale.....	16
Per il protocollo in automatico.....	17
Avvertenze e precauzioni.....	18
Informazioni sulla sicurezza.....	18
Informazioni di emergenza.....	18
Precauzioni.....	19
Conservazione e manipolazione dei reagenti.....	22

Stabilità durante l'uso.....	22
Prelievo, conservazione e manipolazione dei campioni	23
Protocollo: estrazione manuale dell'RNA totale da sangue umano intero raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes	24
Protocollo: estrazione in automatico dell'RNA totale da sangue umano intero raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	32
Limiti per l'uso del prodotto	39
Controllo di qualità	39
Caratteristiche delle prestazioni.....	40
Prelievo e stabilizzazione del campione	40
Estrazione dell'RNA manuale	45
Estrazione dell'RNA in automatico	53
Stabilità dell'RNA estratto	56
Note importanti.....	57
Utilizzo del QIAcube Connect MDx.....	57
Avvio del QIAcube Connect MDx.....	57
Installazione dei protocolli sul QIAcube Connect MDx.....	59
Caricamento del QIAcube Connect MDx	60
Colonne spin (PSC, PRC), MCT e materiale plastico del QIAcube Connect MDx.....	63
Smaltimento	69
Bibliografia	70
Guida alla risoluzione dei problemi	71
Simboli.....	73
Informazioni di contatto	75

Appendice A: Note generali per il trattamento dell'RNA.....	76
Appendice B: Quantificazione e determinazione della concentrazione, resa e purezza dell'RNA totale.....	77
Appendice C: Utilizzo delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	79
Informazioni per gli ordini	81
Cronologia delle revisioni del documento.....	83

Uso previsto

Per uso diagnostico in vitro.

Il PAXgene Blood RNA System consiste in una provetta di raccolta ematica (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) e kit per la purificazione degli acidi nucleici (PAXgene Blood RNA Kit). È destinato a raccolta, conservazione e trasporto del sangue e alla stabilizzazione dell'RNA intracellulare in una provetta chiusa e successivo isolamento e purificazione dell'RNA ospite dal sangue intero per RT-PCR utilizzato nei test diagnostici molecolari.

Le caratteristiche delle prestazioni di PAXgene Blood RNA System indicate in questo manuale valgono per i trascritti genetici FOS e IL1B. È responsabilità di chi utilizza il prodotto stabilire per il PAXgene Blood RNA System relative caratteristiche delle prestazioni per altri trascritti target.

Indicazioni per l'uso

Il PAXgene Blood RNA Kit è destinato alla purificazione del RNA intracellulare da sangue intero, raccolto nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Usando il kit in combinazione con la PAXgene Blood RNA Tube (BRT) il sistema fornisce RNA intracellulare purificato da sangue intero umano per i test di diagnostica clinica molecolare basati sulla RT PCR.

Utente previsto

Questo prodotto è rivolto a utenti professionisti, quali tecnici e medici esperti nelle procedure diagnostiche in vitro.

Questo kit è destinato all'uso professionale.

Descrizione e principio

Introduzione

La raccolta del sangue intero è la prima fase di molti esami molecolari utilizzati per lo studio dell'RNA cellulare. Tuttavia, uno dei problemi principali in questi casi è l'instabilità del profilo dell'RNA cellulare in vitro. Studi effettuati da PreAnalytiX hanno mostrato che il numero di copie delle singole specie di mRNA nel sangue intero può variare di oltre 1.000 volte durante la conservazione e il trasporto a temperatura ambiente (Rainen et al., 2002). Ciò è provocato dalla rapida degradazione dell'RNA e dall'espressione indotta di alcuni geni dopo il prelievo ematico. Tali modifiche nel profilo dell'RNA impediscono di effettuare studi attendibili sull'espressione genica. Per un'analisi accurata dell'espressione genica nel sangue intero umano è quindi essenziale un metodo per conservare il profilo di espressione dell'RNA durante e dopo la flebotomia.

Principio e procedura

PreAnalytiX ha sviluppato un sistema che consente il prelievo, la stabilizzazione, la conservazione e il trasporto di campioni di sangue intero umano nonché un rapido ed efficiente protocollo per l'estrazione dell'RNA intracellulare. Il sistema richiede l'uso di PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) per il prelievo del sangue e la stabilizzazione dell'RNA, seguiti da un'estrazione manuale o automatica dell'RNA mediante PAXgene Blood RNA Kit. Entrambi i protocolli, manuale e in automatico, forniscono sostanzialmente un'analoga performance per quanto riguarda la qualità e la resa dell'RNA. I dati di performance per il protocollo manuale (a partire da pag. 45) e il protocollo in automatico (a partire da pag. 53) sono inclusi in questo manuale.

Il PAXgene Blood RNA System permette la standardizzazione dei passaggi pre-analitici del flusso di lavoro, dalla raccolta del campione di sangue all'estrazione dell'RNA cellulare, come da ISO 20186-1:2019, Analisi molecolari – Specifiche per la fase pre-analitica da sangue intero venoso – Parte 1: Isolamento dell'RNA cellulare.

Prelievo e stabilizzazione del campione

Le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) contengono un reagente proprietario di stabilizzazione dell'RNA. Questo additivo protegge le molecole dell'RNA dalla degradazione causata dalla RNasi e minimizza i cambiamenti ex vivo nell'espressione genica. Le caratteristiche delle prestazioni di PAXgene Blood RNA System sono state stabilite con i trascritti genetici FOS e IL1B, visualizzabili a partire da pag. 40.

Estrazione dell'RNA

Il PAXgene Blood RNA Kit è destinato all'estrazione dell'RNA totale da 2,5 mL di sangue intero umano raccolto in una PAXgene Blood RNA Tube (BRT). La procedura è semplice e può essere realizzata in automatico o manualmente (vedere le Figure 1 e 3, rispettivamente a pagina 10 o 12). In entrambi i protocolli, l'estrazione inizia con una fase di centrifugazioni per fare precipitare gli acidi nucleici nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Il pellet viene lavato e risospeso e segue poi l'estrazione manuale o in automatico dell'RNA. Di massima, i due protocolli seguono le stesse fasi del protocollo con gli stessi componenti del kit.

Estrazione dell'RNA manuale

Dettagliatamente: il pellet risospeso viene incubato in tamponi ottimizzati con proteinasi K(PK) per la digestione delle proteine. Per omogeneizzare il lisato cellulare e rimuovere i detriti cellulari, si effettua una centrifugazione aggiuntiva utilizzando la colonna spin PAXgene Shredder (PSC). Il supernatante della frazione di flow-through viene trasferito in una provetta per microcentrifuga (MCT) pulita. Per ottimizzare le condizioni di legame si aggiunge etanolo, quindi il lisato viene introdotto nella colonna spin PAXgene RNA (PRC). Con una breve centrifugazione l'RNA si lega selettivamente alla membrana in silice PAXgene mentre i contaminanti vengono eliminati. Eventuali altri contaminanti vengono rimossi nelle successive ed efficienti fasi di lavaggio. Fra la prima e la seconda fase di lavaggio la membrana viene incubata con DNasi I (RNFD) per eliminare qualsiasi traccia di DNA legato. Dopo le fasi di lavaggio l'RNA viene eluito nel tampone di eluizione (BR5) e denaturato al caldo. Le caratteristiche delle prestazioni dell'estrazione dell'RNA manuale utilizzando il PAXgene Blood RNA System possono essere visualizzate a pag. 45.

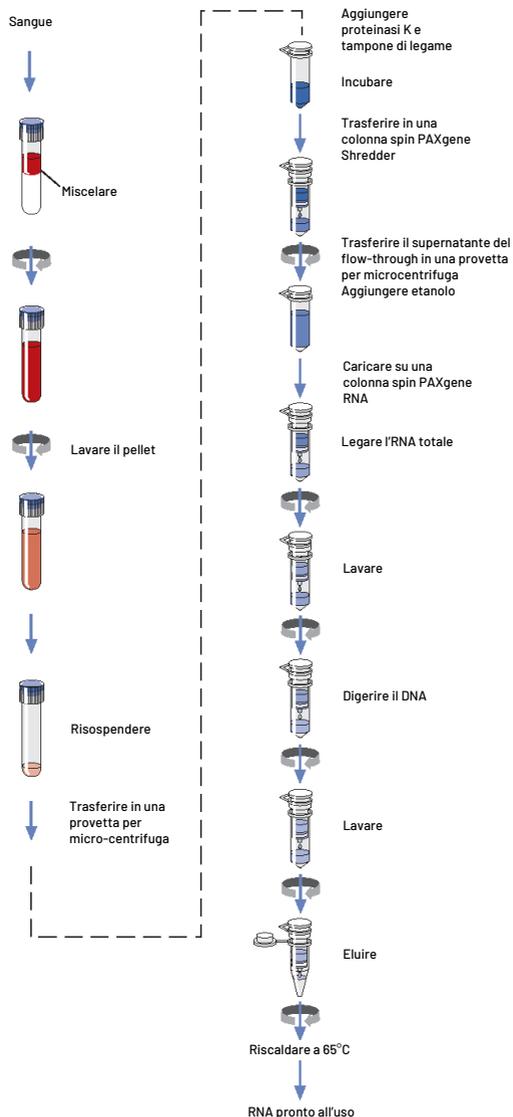


Figura 1: Procedura PAXgene Blood RNA manuale.

Estrazione dell'RNA in automatico

L'estrazione dell'RNA del sangue è automatizzata sul QIAGEN QIAcube Connect MDx. Lo strumento innovativo si avvale di una tecnologia all'avanguardia per processare le colonne spin QIAGEN, permettendo l'integrazione perfetta di una preparazione automatizzata a bassa resa dei campioni nelle procedure di lavoro del laboratorio. La preparazione dei campioni con il QIAcube Connect MDx si svolge con gli stessi passaggi della procedura manuale (cioè lisi, legame, lavaggio ed eluizione) e può essere realizzata utilizzando lo stesso PAXgene Blood RNA Kit.



Figura 2: QIAcube Connect MDx.



Il QIAGEN QIAcube Connect MDx non è disponibile in tutti i Paesi. Per ulteriori dettagli, contattare il servizio tecnico QIAGEN.

Il protocollo per l'estrazione dell'RNA in automatico consiste di 2 parti (o protocolli), il "PAXgene Blood RNA Part A" (dal sangue nel PAXgene Blood RNA Tube da eluire) e il "PAXgene Blood RNA Part B" (dopo l'eluzione a RNA pronto all'uso), con un breve intervento manuale tra le 2 parti (vedere la Figura 3).

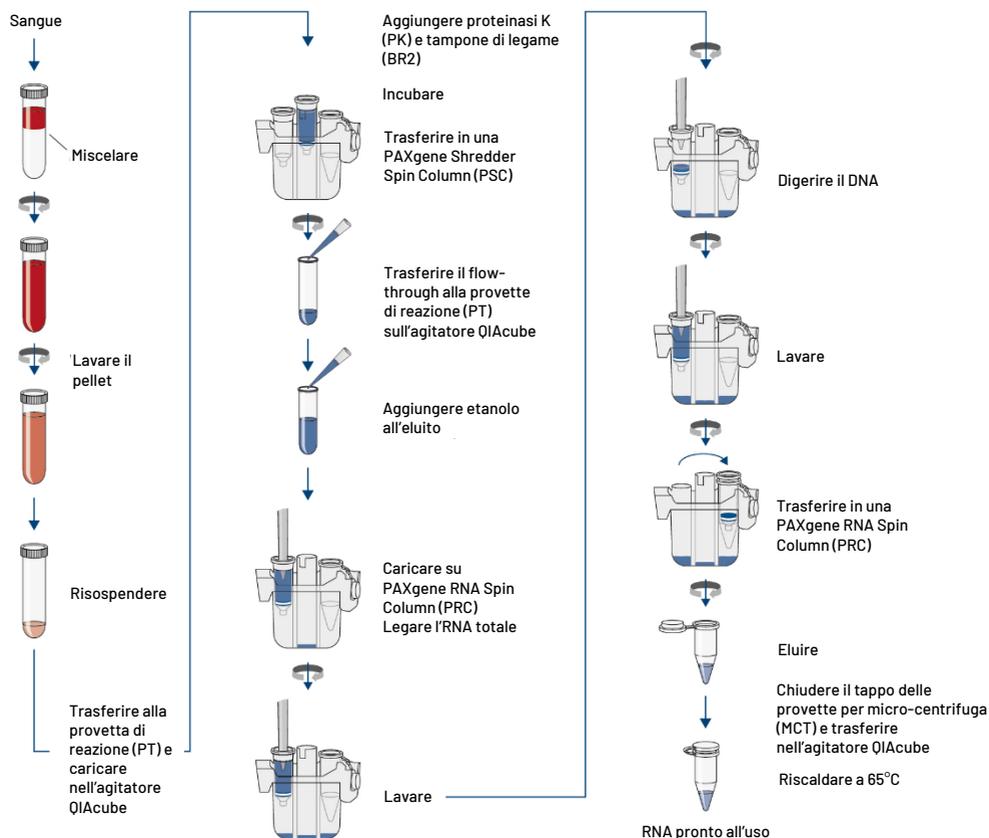


Figura 3: Procedura PAXgene Blood RNA in automatico.

Il pellet dell'acido nucleico centrifugato, lavato e risospeso (vedere "Estrazione dell'RNA", pag. 8) viene trasferito dalla PAXgene Blood RNA Tube (BRT) nelle provette di reazione (PT) che sono posizionate nell'unità termoshaker sul piano di lavoro del QIAcube Connect MDx. L'operatore seleziona e fa partire il protocollo "PAXgene Blood RNA Part B" dal menu. Il QIAcube Connect MDx esegue le fasi del protocollo attraverso l'eluizione dell'RNA nel tampone di eluizione (BR5). L'operatore trasferisce le MCT contenenti l'RNA purificato nell'unità termoshaker del QIAcube Connect MDx. L'operatore seleziona e fa partire il protocollo "PAXgene Blood RNA Part B" dal menu e QIAcube Connect MDx esegue la denaturazione a caldo. Le caratteristiche delle prestazioni dell'estrazione dell'RNA in automatico utilizzando il PAXgene Blood RNA System sul QIAcube Connect MDx possono essere visualizzate a pag. 53.

Materiali in dotazione

Contenuto del kit

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Numero di catalogo			762174
Numero di dispositivi di raccolta			50
Nome componente	Descrizione	Simbolo	Quantità
BR1	Resuspension Buffer (Tampone di risospensione)	RES BUF	20 mL
BR2	Binding Buffer (Tampone di legame)*	BIND BUF	18 mL
BR3	Wash Buffer 1* (Tampone di lavaggio 1*)	WASH BUF 1	45 mL
BR4	Tampone di lavaggio 2 (concentrato)†	WASH BUF 2 CONC	11 mL
BR5	Elution Buffer (Tampone di eluizione)	ELU BUF	6 mL
RNFW	RNase-Free Water (bottle)(Acqua priva di RNasi (flacone))	PEL WASH	2 × 125 mL
PK	Proteinase K (green lid)(Proteinasi K (tappo verde))	PROTK	2 × 1,4 mL
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (Colonne spin PAXgene RNA (rosse))‡	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Provette di reazione (2 mL)§	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard™	Chiusure secondarie BD Hemogard	SEC CLOS	50
MCT	Provette per microcentrifuga (1,5 mL)§	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNasi I, priva di RNasi (liofilizzata))	DNA REM	1500 unità Kunitz¶
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (Tampone di digestione DNA (tappo bianco))	DNA DIG BUF	2 × 2 mL
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (Tampone di risospensione DNasi (provetta, tappo lilla))	DNase RES BUF	2 mL
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (Colonne PAXgene Shredder) (lilla)‡	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Manuale	Manuale del PAXgene Blood RNA Kit (Versione 3)		1

* Non compatibile con disinfettanti a base di candeggina. Contiene un sale di guanidina. Per Informazioni sulla sicurezza, vedere pagina 18.

[†] Il tampone di lavaggio 2 (BR4) viene fornito come concentrato. Per ottenere una soluzione di lavoro, al primo utilizzo aggiungere 4 volumi di etanolo (96-100%, v/v, grado di purezza p. a. - per analisi), come indicato sul flacone.

[‡] Ogni colonna è confezionata in un blister esclusivamente monouso. Consultare le informazioni sulla sicurezza per le istruzioni di smaltimento.

[§] Le provette sono disponibili in sacchetti di plastica e ogni provetta è esclusivamente monouso. Consultare le informazioni sulla sicurezza per le istruzioni di smaltimento.

[¶] L'unità Kunitz viene normalmente utilizzata per misurare la DNasi I. Un'unità Kunitz si definisce come la quantità di DNasi I che provoca in A_{260} un aumento dell'assorbanza di 0,001 per minuto e millilitro a 25°C e pH 5,0, utilizzando come substrato DNA altamente polimerizzato (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* 33, 349 e 363).

Componenti del kit

Nome componente	Descrizione	Principio attivi	Concentrazione
BR1	Resuspension Buffer (Tampone di risospensione)	Nessuno	-
BR2	Binding Buffer (Tampone di legame)	Guanidina tiocianato	Da ≥ 30 a $< 50\%$ w/w
BR3	Wash Buffer 1 (Tampone di lavaggio 1)	Guanidina tiocianato Etanolo	Da ≥ 10 a $< 20\%$ w/w Da ≥ 3 a $< 10\%$ w/w
BR4	Tampone di lavaggio 2 (concentrato)	Nessuno	-
BR5	Elution Buffer (Tampone di eluizione)	Nessuno	-
RNFW	RNase-Free Water (bottle) (Acqua priva di RNasi (flacone))	Nessuno	-
PK	Proteinase K (green lid) (Proteinasi K (tappo verde))	Proteinasi K	Da ≥ 1 a $< 3\%$ w/w
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNasi I, priva di RNasi (liofilizzata))	DNasi	Da ≥ 90 a $\leq 100\%$ w/w
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (Tampone di digestione DNA (tappo bianco))	Nessuno	-
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (Tampone di risospensione DNasi (provetta, tappo lilla))	Nessuno	-

Materiale necessario ma non in dotazione

Quando si utilizzano sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio adeguato, guanti monouso e occhiali di protezione. Per maggiori informazioni, consultare le schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

Per tutti i protocolli

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; n. cat. 762165)
- Etanolo (96–100% v/v, grado di purezza p.a.)
- Pipette* (10 μ L – 4 mL)
- Puntali sterili privi di RNasi con barriere aerosol anticontaminazione[†]
- Cilindro graduato[‡]
- Centrifuga* in grado di raggiungere 3.000–5.000 \times g, con rotore basculante con scomparti per le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Miscelatore vortex*
- Ghiaccio tritato
- Pennarello indelebile per scrivere sulle etichette

Per il protocollo manuale

- Microcentrifuga* a velocità variabile capace di raggiungere almeno 1.000–8.000 \times g, sebbene sia possibile applicare forze g inferiori e superiori (per informazioni dettagliate, vedere le fasi del protocollo), dotata di rotore per MCT da 2 mL

* Assicurarsi che i dispositivi e gli strumenti siano stati revisionati, sottoposti a manutenzione e calibrati regolarmente secondo le raccomandazioni del produttore.

[†] Assicurarsi di avere familiarità con le linee guida per il trattamento dell'RNA (Appendice A, pag. 75).

[‡] Per l'aggiunta di etanolo al tampone BR4 concentrato.

- Incubatore-agitatore* in grado di incubare a 55°C e 65°C e di miscelare a ≥ 400 rpm; max. 1.400 rpm (ad es. Eppendorf® Thermomixer Compact o equivalente)

Per il protocollo in automatico

- Forbici
- QIAcube Connect MDx* (QIAGEN, n. cat. 9003070)

Materiali di consumo del QIAcube Connect MDx:

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

Accessori del QIAcube Connect MDx:

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, n. cat. 990392)†

Pacchetti di servizi per QIAcube Connect MDx:

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

* Assicurarsi che il dispositivo e lo strumento siano stati revisionati, sottoposti a manutenzione e calibrati regolarmente secondo le raccomandazioni del produttore.

† Incluso anche nello Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, n. cat. 990395).

Avvertenze e precauzioni

I clienti nell'Unione Europea devono tenere presente che potrebbe essere richiesto di segnalare al produttore e all'autorità competente dello Stato membro in cui si trova l'utente e/o il paziente qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo.

Per i clienti al di fuori dell'Unione Europea, tenere presente che potrebbe essere richiesto di consultare le norme locali per la segnalazione al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità di regolamentazione del Paese dell'utente e/o del paziente di gravi incidenti verificatisi in relazione al dispositivo.

Informazioni sulla sicurezza

Durante la manipolazione di sostanze chimiche e materiale a rischio biologico, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le corrispondenti schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS). Le schede sono disponibili online nel pratico formato PDF sul sito www.qiagen.com/safety, dove è possibile cercare, visualizzare e stampare la scheda SDS di ogni kit e di ogni componente del kit QIAGEN.

- Tutte le sostanze chimiche e i materiali biologici sono potenzialmente pericolosi. I campioni di sangue e i campioni analitici sono potenzialmente infettivi e devono essere trattati come materiale a rischio biologico.
- Smaltire rifiuti a rischio biologico e materiali di scarto del kit nel rispetto delle procedure di sicurezza locali.

Informazioni di emergenza

CHEMTREC

Al di fuori di USA e Canada +1 703-527-3887

Precauzioni

Quando si lavora con il sangue, adottare precauzioni universali per evitare il rischio di potenziale esposizione a patogeni a trasmissione ematica (ad es. HIV, epatite B e altri virus a trasmissione ematica). Utilizzare guanti, camice, occhiali protettivi, altri dispositivi di protezione individuale e controlli tecnici a protezione dall'esposizione ematica. Per maggiori informazioni, consultare le corrispondenti schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS). Le schede sono disponibili online in un pratico formato PDF sul sito www.preanalytix.com, dove è possibile cercare, visualizzare e stampare le schede SDS di questo kit.

CAUTELA



NON aggiungere candeggina o soluzioni acide direttamente nelle preparazioni di campione da eliminare.

Il tampone di legame (BR2) e quello di lavaggio 1 (BR3) contengono guanidina tiocianato, che può formare composti altamente reattivi in combinazione con la candeggina. Se si rovescia liquido contenente il tampone di legame (BR2) o il tampone di lavaggio 1 (BR3), pulire con un idoneo detergente da laboratorio e acqua. Se il liquido contiene agenti potenzialmente infettivi, innanzitutto pulire l'area interessata con acqua e detergente da laboratorio, e successivamente con una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% (candeggina).

La soluzione di stabilizzazione per l'RNA e il sangue contenuto nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT) possono essere disinfettati utilizzando 1 volume di una soluzione di candeggina disponibile in commercio (ipoclorito di sodio al 5%) per 9 volumi di soluzione di stabilizzazione per l'RNA e di sangue.

I residui della preparazione dei campioni, ad esempio i supernatanti provenienti dalle fasi di centrifugazione delle procedure di estrazione dell'RNA, devono essere considerati sempre potenzialmente infettivi. Per lo smaltimento dei materiali biologici, utilizzare contenitori per il rischio biologico. Lo smaltimento deve essere effettuato nell'osservanza dei regolamenti locali e delle procedure previste dal laboratorio.

I componenti specifici del PAXgene Blood RNA Kit sono esclusivamente monouso. Per le informazioni sui singoli componenti, si vedere Contenuto del kit a pagina 14.

Ai componenti del PAXgene Blood RNA Kit sono associate le seguenti informazioni su rischi e misure precauzionali. Per informazioni sulla sicurezza relative a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), consultare il *manuale PAXgene Blood RNA Tube*.

Buffer BR2



Contiene guanidina tiocianato. Pericolo! Nocivo se ingerito. Può essere nocivo in caso di contatto con la pelle o se inalato. Causa grave danno oculare. Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. A contatto con acidi libera gas molto tossico. Evitare l'immissione nell'ambiente. Indossare guanti protettivi/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. IN CASO di esposizione o di possibile esposizione: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto ufficialmente approvato per lo smaltimento dei rifiuti.

Buffer BR3



Contiene etanolo, guanidina tiocianato. Pericolo! Liquido e vapore infiammabile. Causa grave danno oculare. A contatto con acidi libera gas molto tossico. Conservare lontano da fonti di calore/scintille/fiamme libere/superfici molto calde. Non fumare. Indossare guanti protettivi/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

DNasi I



Contiene: DNasi. Pericolo! Può provocare una reazione allergica cutanea. Se inalato, può causare sintomi di asma e allergia o difficoltà respiratorie. Evitare di respirare la polvere. Indossare guanti protettivi/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso. Indossare una protezione per la respirazione. IN CASO di esposizione o di possibile esposizione: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Portare la persona all'aria aperta e mantenerla tranquilla in posizione confortevole per la respirazione. Lavare gli indumenti contaminati prima di riutilizzarli.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Le colonne spin PAXgene RNA (PRC), le colonne spin PAXgene Shredder (PSC), nonché la proteinasi K (PK) e i tamponi (BR1, BR2, BR3, BR4 e BR5) devono essere conservati in un luogo asciutto alla temperatura indicata sull'etichetta del kit.

L'RNase-Free DNase Set, che contiene DNasi I (RNFD), tampone di digestione DNA (RDD) e tampone di risospensione della DNasi (DRB), viene fornito a temperatura ambiente. Alla consegna, conservare tutti i componenti dell'RNase-Free DNase Set alla temperatura indicata in etichetta. Se conservato correttamente, il kit è stabile fino alla data di scadenza riportata sulla rispettiva scatola.

Prestare attenzione alle date di scadenza e alle condizioni di conservazione stampate sulla confezione e sulle etichette di tutti i componenti. Non utilizzare componenti scaduti o conservati in modo scorretto.

Stabilità durante l'uso

Dopo il primo utilizzo del kit, i reagenti restano stabili nei flaconi originali alla temperatura e fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione del kit.

I reagenti inseriti nei flaconi per reagenti del QIAcube Connect MDx restano stabili per 3 mesi di conservazione a temperatura ambiente (15–25°C).

La DNasi I ricostituita (RNFD) resta stabile a 2–8°C per 6 settimane nella fiala in vetro originale (soluzione concentrata).

Le aliquote monouso della soluzione concentrata in MCT da 1,5 mL (in dotazione con il kit) restano stabili per 9 mesi di conservazione a -20°C. Dopo lo scongelamento, le aliquote monouso restano stabili per 6 settimane di conservazione a 2-8°C.

Prelievo, conservazione e manipolazione dei campioni

Il PAXgene Blood RNA Kit è destinato all'uso con sangue raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes. Il sangue deve essere raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) secondo le istruzioni riportate nella relativa descrizione nel manuale PAXgene Blood RNA Tube. Se necessario, per consigli sull'uso delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) consultare l'Appendice C (pag. 79). Tutti i campioni devono essere considerati potenzialmente pericolosi. Le caratteristiche delle prestazioni di PAXgene Blood RNA System sono state stabilite con i trascritti genetici FOS e IL1B, visualizzabili alle pagg. 41-44.

Protocollo: estrazione manuale dell'RNA totale da sangue umano intero raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes

Punti importanti prima di iniziare

- Assicurarsi che la confezione del kit sia intatta e non danneggiata e che la provette dei tamponi non mostrino perdite. Non utilizzare un kit danneggiato.
- Quando si utilizza una pipetta, assicurarsi che sia impostata sul volume corretto e che il liquido venga aspirato e dispensato completamente.
- Per evitare di trasferire un campione alla provetta o alla colonna spin sbagliata, assicurarsi che tutte le provette e le colonne spin siano etichettate in modo appropriato con un pennarello indelebile. Applicare un'etichetta al tappo e alla parete esterna (PT, MCT). Per le colonne spin applicare un'etichetta alla parete esterna della rispettiva PT. Dopo avervi trasferito il liquido chiudere sempre ogni provetta e ogni colonna spin.
- Versamenti di campioni e tamponi durante la procedura possono ridurre resa e purezza dell'RNA.
- Se non indicato diversamente, tutte le fasi di questo protocollo, incluse quelle di centrifugazione, devono essere effettuate a temperatura ambiente (15–25°C).

A causa della sensibilità delle tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici, durante la manipolazione dei campioni è necessario attenersi alle seguenti precauzioni per evitare contaminazioni crociate:

- Pipettare con attenzione il campione nella colonna spin (PSC, PRC) senza bagnarne il bordo.
- Fra un trasferimento di liquido e l'altro, sostituire sempre i puntali delle pipette. Utilizzare puntali per pipetta con barriera aerosol anticontaminazione.

- Non toccare la membrana della colonna spin (PSC, PRC) con il puntale della pipetta.
- Dopo la miscelazione con vortex o il riscaldamento di una MCT, centrifugare brevemente per rimuovere le gocce all'interno del tappo della provetta.
- Indossare i guanti per tutta la durata della procedura. In caso di contatto fra guanti e campione, sostituire immediatamente i guanti.
- Chiudere sempre la colonna spin (PSC, PRC) prima di posizionarla nella microcentrifuga. Centrifugare come descritto nel protocollo.
- Aprire una colonna spin (PSC, PRC) per volta, facendo attenzione a non creare aerosol.
- Per un trattamento in parallelo efficiente di campioni multipli, preparare un rack con PT in cui trasferire le colonne spin (PSC, PRC) dopo la centrifugazione. Smaltire le PT usate contenenti flow-through, quindi posizionare le colonne spin (PSC, PRC) in nuove PT prima di trasferirle nuovamente nella microcentrifuga.

Operazioni da eseguire prima di iniziare

- Il sangue deve essere raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) secondo le istruzioni riportate nella relativa descrizione nel manuale PAXgene Blood RNA Tube. Se necessario, per consigli sull'uso delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) consultare l'Appendice C (pag. 79).
- Assicurarsi che le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) vengano incubate per almeno 2 h a temperatura ambiente dopo il prelievo di sangue, per garantire la completa lisi delle cellule ematiche e la precipitazione dell'RNA. L'incubazione delle PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per tutta la notte può aumentare la resa. Se l'incubazione iniziale del sangue a temperatura ambiente per 2 h non è stata effettuata prima della conservazione a 2–8°C, -20°C o -70°C, per prima cosa equilibrare la PAXgene Blood RNA Tube (BRT) a temperatura ambiente, quindi incubarla a questa temperatura per 2 h prima di iniziare la procedura.
- Leggere le informazioni sulla sicurezza a pag. 18.

- Leggere le linee guida sulla manipolazione dell'RNA (Appendice A, pag. 76).
- Assicurarsi che gli strumenti, ad esempio, pipette e incubatore-agitatore, vengano controllati e calibrati regolarmente in base alle indicazioni del produttore.
- Per le fasi 5 e 20 è necessario un incubatore-agitatore. Impostare la temperatura di questo strumento a 55°C.
- Dopo una lunga conservazione il tampone di legame (BR2) può formare un precipitato. Se necessario, riscaldare a 37°C per discioglierlo.
- Il tampone di lavaggio 2 (BR4) viene fornito come concentrato. Per ottenere una soluzione di lavoro, al primo utilizzo aggiungere 4 volumi di etanolo (96–100%, v/v, grado di purezza p. a. – per analisi), come indicato sul flacone.
- Se si usa per la prima volta l'RNase-Free DNase Set, preparare una soluzione concentrata di DNasi I. Sciogliere la DNasi I solida (RNFD; 1.500 unità Kunitz)* in 550 µL di tampone di risospensione DNasi (DRB) presente nel set. Assicurarsi di non disperdere la DNasi I (RNFD) aprendo la fiala. La DNasi I (RNFD) ricostituita non deve essere miscelata su vortex. La DNasi è particolarmente sensibile alla denaturazione fisica. Miscelare la soluzione con cautela capovolgendo la fiala.
- La DNasi I ricostituita (RNFD) può essere conservata a 2–8°C nella fiala di vetro originale (soluzione concentrata) o a -20°C dopo aver rimosso la soluzione concentrata dalla fiala in vetro e averla suddivisa in aliquote monouso (utilizzare le MCT da 1,5 mL in dotazione con il kit; ve ne sono a sufficienza per 5 aliquote). Le aliquote scongelate possono essere conservate a 2–8°C. Non ricongelare le aliquote dopo il scongelamento.
- Quando si ricostituisce e si aliquota la DNasi I (RNFD), attenersi alle "Note generali per il trattamento dell'RNA" (Appendice A, pag. 76).

* L'unità Kunitz viene normalmente utilizzata per misurare la DNasi I. Un'unità Kunitz si definisce come la quantità di DNasi I che provoca in A₂₆₀ un aumento dell'assorbanza di 0,001 per minuto e millilitro a 25°C e pH 5,0, utilizzando come substrato DNA altamente polimerizzato (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 e 363).

Procedura

1. Centrifugare la PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per 10 minuti a $3.000\text{--}5.000 \times g$ utilizzando un rotore basculante con scomparti.



Assicurarsi che il campione di sangue sia stato incubato nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per almeno 2 h temperatura ambiente ($15\text{--}25^\circ\text{C}$) per garantire la completa lisi delle cellule ematiche e la precipitazione dell'RNA.



Il rotore deve contenere adattatori per provette a fondo arrotondato. Se si utilizzano altri tipi di adattatori le provette possono danneggiarsi durante la centrifugazione.

2. Rimuovere il supernatante per decantazione o pipettamento. Aggiungere al pellet 4 mL di acqua priva di RNasi (RNFW) e chiudere la provetta con una nuova chiusura secondaria BD Hemogard (fornita con il kit).

Se il supernatante viene eliminato per decantazione attenzione a non staccare il pellet e asciugare il bordo della provetta con carta assorbente pulita.

3. Miscelare con il vortex finché il pellet non si scioglie e centrifugare per 10 minuti a $3.000\text{--}5.000 \times g$ utilizzando un rotore basculante con scomparti. Rimuovere ed eliminare tutto il supernatante.

Eventuali detriti cellulari che rimangono nel supernatante dopo la miscelazione con vortex non influenzano la procedura.



La rimozione incompleta del supernatante inibisce la lisi e diluisce il lisato, compromettendo le condizioni di legame dell'RNA alla membrana PAXgene.

4. Aggiungere 350 μL di tampone di risospensione (BR1) e miscelare su vortex fino alla completa dissoluzione del pellet.
5. Pipettare il campione in una MCT da 1,5 mL. Aggiungere 300 μL di tampone di legame (BR2) e 40 μL di proteinasi K (PK). Miscelare su vortex per 5 s e incubare a 55°C per 10 minuti utilizzando un incubatore-agitatore a 400–1.400 rpm. Dopo l'incubazione, impostare la temperatura dell'incubatore-agitatore a 65°C (per la fase 20).



Non mescolare il tampone di legame (BR2) e la proteinasi K (PK) prima di aggiungerli al campione.

6. Pipettare il lisato direttamente in una PSC (lilla) posta in una PT da 2 mL e centrifugare per 3 minuti alla velocità massima (non superiore a $20.000 \times g$).



Pipettare con attenzione il lisato nella colonna (PSC) e controllare che il lisato sia trasferito completamente alla colonna spin (PSC).

Per evitare danni a colonne (PSC) e provette di reazione (PT), non superare $20.000 \times g$.



Alcuni campioni possono uscire dalla PSC senza centrifugazione. Questo è dovuto alla bassa viscosità di alcuni campioni e non dovrebbe essere considerato un difetto del prodotto.

7. Con la massima cura, trasferire tutto il supernatante della frazione eluita in una MCT pulita da 1,5 mL senza interferire con il pellet nella PT.
8. Aggiungere 350 μL di etanolo (96–100% v/v, grado di purezza p.a.). Miscelare su vortex e centrifugare brevemente (1–2 s a $500\text{--}1.000 \times g$) per rimuovere le gocce all'interno del tappo della provetta.



La durata della centrifugazione non deve superare 1–2 s in caso contrario gli acidi nucleici possono precipitare riducendo la resa dell'RNA totale.

9. Pipettare 700 μL di campione nella PRC (rossa) posta in una PT da 2 mL e centrifugare per 1 minuto a $8.000\text{--}20.000 \times g$. Collocare la colonna spin (PRC) in una nuova PT da 2 mL e smaltire la vecchia PT contenente il flow-through.
10. Pipettare il rimanente campione nella PRC e centrifugare per 1 minuto a $8.000\text{--}20.000 \times g$. Collocare la colonna spin (PRC) in una nuova PT da 2 mL e smaltire la vecchia PT contenente il flow-through.



Pipettare con attenzione il campione nella colonna spin (PRC) e controllare visivamente che esso sia completamente trasferito nella colonna spin (PRC).

11. Pipettare 350 μ L di tampone di lavaggio 1 (BR3) nella PRC. Centrifugare per 1 minuto a 8.000–20.000 \times g. Collocare la colonna spin (PRC) in una nuova PT da 2 mL e smaltire la vecchia PT contenente il flow-through.
12. Aggiungere 10 μ L di soluzione concentrata di DNasi I (RNFD) a 70 μ L di tampone di digestione DNA (RDD) in una MCT da 1,5 mL. Miscelare dando leggeri colpetti con le dita alla provetta e centrifugare brevemente per raccogliere il liquido residuo dalle pareti interne della provetta.

Se si opera, ad esempio, su 10 campioni, aggiungere 100 μ L di soluzione concentrata di DNasi I (RNFD) a 700 μ L di tampone di digestione DNA (RDD). Utilizzare le MCT da 1,5 mL in dotazione con il kit.



La DNasi è particolarmente sensibile alla denaturazione fisica. Per questo motivo miscelare la soluzione solo dando leggeri colpetti con le dita alla provetta. Non utilizzare il vortex.

13. Pipettare la miscela di incubazione DNasi I (RNFD) (80 μ L) direttamente sulla membrana della PRC e lasciare sul banco (20–30°C) per 15 minuti.



Assicurarsi di pipettare la miscela di incubazione di DNasi I (RNFD) direttamente sulla membrana. Se parte della miscela rimane sulle pareti o sull'O-ring della colonna spin (PRC), la digestione della DNasi può risultare incompleta.

14. Pipettare 350 μ L di tampone di lavaggio 1 (BR3) nella PRC e centrifugare per 1 minuto a 8.000–20.000 \times g. Collocare la colonna spin (PRC) in una nuova PT da 2 mL e smaltire la vecchia PT contenente il flow-through.
15. Pipettare 500 μ L di tampone di lavaggio 2 (BR4) nella PRC e centrifugare per 1 minuto a 8.000–20.000 \times g. Collocare la colonna spin (PRC) in una nuova PT da 2 mL e smaltire la vecchia PT contenente il flow-through.



Il tampone di lavaggio 2 (BR4) viene fornito come concentrato. Assicurarsi di avere aggiunto etanolo al tampone di lavaggio 2 (BR4) prima dell'uso (vedere "Operazioni da eseguire prima di iniziare", pag. 25).

16. Aggiungere altri 500 μL di tampone di lavaggio 2 (BR4) nella PRC. Centrifugare per 3 minuti a $8.000\text{--}20.000 \times g$.
17. Smaltire la PT contenente il flow-through a collocare la PRC in una nuova PT da 2 mL. Centrifugare per 1 minuto a $8.000\text{--}20.000 \times g$.
18. Smaltire la PT contenente il flow-through. Collocare la PRC in una MCT da 1,5 mL e pipettare 40 μL di tampone di eluizione (BR5) direttamente sulla membrana della PRC. Centrifugare per 1 minuto a $8.000\text{--}20.000 \times g$ per eluire l'RNA.
Per la massima efficienza di eluizione, è importante bagnare l'intera membrana con il tampone di eluizione (BR5).
19. Ripetere la fase di eluizione (fase 18) come descritto, utilizzando 40 μL di tampone di eluizione (BR5) e la stessa MCT.
20. Incubare l'eluato per 5 minuti a 65°C nell'incubatore-agitatore (vedere fase 5), senza agitare. Dopo l'incubazione raffreddare immediatamente in ghiaccio.



Questa incubazione dei campioni a 65°C denatura l'RNA per applicazioni downstream. Se l'applicazione downstream comprende una fase di denaturazione a caldo non saltare questa fase. Una sufficiente denaturazione dell'RNA a questo punto è essenziale per ottenere la massima efficacia nelle applicazioni downstream.

Non superare tempo e temperatura di incubazione.

21. Se i campioni di RNA non vengono utilizzati subito, conservare a -20°C o -70°C .
Poiché l'RNA rimane denaturato dopo ripetuti passaggi di congelamento/ scongelamento, non è necessario ripetere l'incubazione a 65°C . Se si utilizzano i campioni di RNA per esami diagnostici, attenersi alle istruzioni fornite dal produttore.
Per una quantificazione dell'RNA più precisa e attendibile, misurando l'assorbanza a 260 nm, consigliamo di diluire i campioni con 10 mM di Tris-HCl, pH

7,5.* Una diluizione del campione con acqua priva di RNasi potrebbe portare a risultati imprecisi o troppo bassi.

Per azzerare lo spettrofotometro, utilizzare un bianco contenente la stessa proporzione di tampone di eluizione (BR5) e tampone Tris-HCl presenti nel campione da misurare. Il tampone di eluizione (BR5) assorbe intensamente a 220 nm, e questo può portare ad alti valori di assorbanza di sfondo, se lo spettrofotometro non è stato azzerato correttamente.



Per la quantificazione in tampone Tris-HCl, usare la relazione $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/mL}$. Vedere Appendice B, pag. 77.

22. Richiudere tutti i flaconi contenenti tamponi e acqua priva di RNasi, le fiale e le provette contenenti enzimi e tamponi enzimatici, oltre che i sacchetti contenenti materiali plastici del kit usato per il protocollo. Conservare il contenuto restante del kit come descritto nella sezione "Conservazione e manipolazione dei reagenti" (pag. 22) e "Stabilità durante l'uso" (pag. 22) fino all'uso successivo.

* Quando si utilizzano sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio adeguato, guanti monouso e occhiali di protezione. Per maggiori informazioni, consultare le schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

Protocollo: estrazione in automatico dell'RNA totale da sangue umano intero raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Punti importanti prima di iniziare

- Assicurarsi che la confezione del kit sia intatta e non danneggiata e che la provette dei tamponi non mostrino perdite. Non utilizzare un kit danneggiato.
- Quando si utilizza una pipetta, assicurarsi che sia impostata sul volume corretto e che il liquido venga aspirato e dispensato completamente.
- Per evitare di trasferire un campione alla provetta o al materiale di laboratorio in plastica sbagliato, assicurarsi che tutte le PT, le MCT e gli adattatori per rotore siano etichettati in modo appropriato con un pennarello indelebile. Applicare un'etichetta al tappo e alla parete esterna di ogni MCT, alla parete esterna di ogni PT e di ogni adattatore per rotore.
- Versamenti di campioni e tamponi durante la procedura possono ridurre resa e purezza dell'RNA.
- Se non indicato diversamente, tutte le fasi di questo protocollo, incluse quelle di centrifugazione, devono essere effettuate a temperatura ambiente (15–25°C).

A causa della sensibilità delle tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici, durante la manipolazione dei campioni è necessario attenersi alle seguenti precauzioni per evitare contaminazioni crociate:

- Pipettare con attenzione il campione dentro la PT sul fondo della provetta, senza bagnarne il bordo.
- Fra un trasferimento di liquido e l'altro, sostituire sempre i puntali delle pipette. Utilizzare puntali per pipetta con barriera aerosol anticontaminazione.

- Non toccare la membrana della colonna spin (PSC, PRC) con il puntale della pipetta.
- Dopo la miscelazione con vortex o il riscaldamento di una MCT, centrifugare brevemente per rimuovere le gocce all'interno del tappo della provetta.
- Indossare i guanti per tutta la durata della procedura. In caso di contatto fra guanti e campione, sostituire immediatamente i guanti.

Operazioni da eseguire prima di iniziare

- Il sangue deve essere raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) secondo le istruzioni riportate nella relativa descrizione nel manuale PAXgene Blood RNA Tube. Se necessario, per consigli sull'uso delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) consultare l'Appendice C (pag. 79).
- Assicurarsi che le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) vengano incubate per almeno 2 h a temperatura ambiente dopo il prelievo di sangue, per garantire la completa lisi delle cellule ematiche e la precipitazione dell'RNA. L'incubazione delle PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per tutta la notte può aumentare la resa. Se una delle PAXgene Blood RNA Tube (BRT) è stata conservata a 2–8°C o –20°C o –70°C dopo il prelievo del sangue, innanzitutto equilibrarla a temperatura ambiente e incubarla sempre a temperatura ambiente per almeno 2 ore prima di iniziare la procedura.
- Leggere le informazioni sulla sicurezza a pag. 18.
- Leggere "Note importanti", pag. 57.
- Leggere le linee guida sulla manipolazione dell'RNA (Appendice A, pag. 76).
- Leggere il manuale utente relativo al QIAcube Connect MDx e ogni ulteriore informazione fornita con lo strumento, prestando particolare attenzione alle informazioni sulla sicurezza.
- Assicurarsi che i dispositivi e gli strumenti, come le pipette e il QIAcube Connect MDx, siano stati controllati e calibrati regolarmente secondo le raccomandazioni del produttore.

- Dopo una lunga conservazione il tampone di legame (BR2) può formare un precipitato. Se necessario, riscaldare a 37°C per scioglierlo.
- Il tampone di lavaggio 2 (BR4) viene fornito come concentrato. Per ottenere una soluzione di lavoro, al primo utilizzo aggiungere il volume di etanolo appropriato (96–100% v/v, grado di purezza p. a. – per analisi), come indicato sul flacone.
- Se si usa per la prima volta l’RNase-Free DNase Set, preparare una soluzione concentrata di DNasi I. Sciogliere la DNasi I solida (RNFD; 1.500 unità Kunitz)* in 550 µL di tampone di risospensione DNasi (DRB) presente nel set. Assicurarsi di non disperdere la DNasi I (RNFD) aprendo la fiala. La DNasi I (RNFD) ricostituita non deve essere miscelata su vortex. La DNasi è particolarmente sensibile alla denaturazione fisica. Miscelare la soluzione con cautela capovolgendo la fiala.
- La DNasi I ricostituita (RNFD) può essere conservata a 2–8°C nella fiala di vetro originale (soluzione concentrata) o a -20°C dopo aver rimosso la soluzione concentrata dalla fiala in vetro e averla suddivisa in aliquote monouso (utilizzare le MCT da 1,5 mL in dotazione con il kit; ve ne sono a sufficienza per 5 aliquote). Le aliquote scongelate possono essere conservate a 2–8°C. Non ricongelare le aliquote dopo il scongelamento.
- Quando si ricostituisce e si aliquota la DNasi I (RNFD), attenersi alle “Note generali per il trattamento dell’RNA” (Appendice A, pag. 76).
- Installare il corretto adattatore per agitatore (incluso con il QIAcube Connect MDx; usare l’adattatore per provette safe-lock da 2 mL, segnato con un “2”) e porre il rack dell’agitatore sopra l’adattatore.
- Controllare il cassetto rifiuti e se necessario svuotarlo.
- Installare gli idonei protocolli se non lo si è già fatto per i processi precedenti. Il QIAcube Connect MDx richiede il download di tutti i protocolli che si trovano nel relativo file zip. Vedere “Installazione dei protocolli sul QIAcube Connect MDx”, pag. 59.

* L’unità Kunitz viene normalmente utilizzata per misurare la DNasi I. Un’unità Kunitz si definisce come la quantità di DNasi I che provoca in A₂₆₀ un aumento dell’assorbanza di 0,001 per minuto e millilitro a 25°C e pH 5,0, utilizzando come substrato DNA altamente polimerizzato (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 e 363).

Procedura

1. Chiudere il coperchio del QIAcube Connect MDx e accendere lo strumento con l'interruttore di alimentazione (vedere Figura 15, pag. 58).

Si sentirà un beep e apparirà la schermata di avvio. Lo strumento eseguirà automaticamente i test di inizializzazione.

2. Aprire il coperchio del QIAcube Connect MDx e caricare i reagenti e il materiale in plastica necessari nello strumento. Vedere "Caricamento del QIAcube Connect MDx", pag. 60.

Per guadagnare tempo si può caricare durante uno o entrambe le successive fasi di centrifugazione da 10 minuti (fasi 3 e 5).

3. Centrifugare la PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per 10 minuti a $3.000\text{--}5.000 \times g$ utilizzando un rotore basculante con scomparti.



Assicurarsi che il campione di sangue sia stato incubato nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per almeno 2 h temperatura ambiente ($15\text{--}25^\circ\text{C}$) per garantire la completa lisi delle cellule ematiche e la precipitazione dell'RNA.



Il rotore deve contenere adattatori per provette a fondo arrotondato. Se si utilizzano altri tipi di adattatori le provette possono danneggiarsi durante la centrifugazione.

4. Rimuovere il supernatante per decantazione o pipettamento. Se il supernatante viene eliminato per decantazione attenzione a non staccare il pellet e asciugare il bordo della provetta con carta assorbente pulita. Aggiungere al pellet 4 mL di acqua priva di RNasi (RNFW) e chiudere la provetta con una nuova chiusura secondaria BD Hemogard (fornita con il kit).
5. Miscelare con il vortex finché il pellet non si scioglie e centrifugare per 10 minuti a $3.000\text{--}5.000 \times g$ utilizzando un rotore basculante con scomparti. Rimuovere ed eliminare tutto il supernatante.

Eventuali detriti cellulari che rimangono nel supernatante dopo la miscelazione con vortex non influenzano la procedura.



La rimozione incompleta del supernatante inibisce la lisi e diluisce il lisato, compromettendo le condizioni di legame dell'RNA alla membrana PAXgene.

6. Aggiungere 350 µL di tampone di risospensione (BR1) e miscelare su vortex fino alla completa dissoluzione del pellet.

7. Pipettare il campione in una PT da 2 mL.



Usare le PT da 2 mL incluse nel PAXgene Blood RNA Kit.

8. Caricare le PT aperte contenenti il campione nell'agitatore del QIAcube Connect MDx (vedere Figura 18, pag. 62). Le posizioni del campione sono numerate per agevolare il caricamento. Inserire gli innesti per i rack dell'agitatore (inclusi con il QIAcube Connect MDx) negli slot sul bordo del rack dell'agitatore vicino a ogni PT. Questo permette la rilevazione dei campioni durante il controllo del caricamento.



Assicurarsi che sia installato il corretto adattatore per agitatore (adattatore agitatore, 2 mL, provette safe-lock, contrassegnate con un "2", incluse con QIAcube Connect MDx).



Se si processano meno di 12 campioni, assicurarsi di caricare il rack dell'agitatore come mostrato in Figura 22, pag. 66. Uno (1) o undici (11) campioni non possono essere processati. I numeri di posizione nel rack dell'agitatore corrispondono ai numeri di posizione nella centrifuga.

9. Chiudere il coperchio del QIAcube Connect MDx (vedere Figura 15, pag. 58).

10. Selezionare il protocollo "PAXgene Blood RNA Part A" e far partire il protocollo.

Seguire le istruzioni fornite sul touch screen del QIAcube Connect MDx.



Assicurarsi che le due parti del programma (parte A e B) siano installate sul QIAcube Connect MDx (vedere "Installazione dei protocolli sul QIAcube Connect MDx", pag. 59).



Lo strumento eseguirà i controlli del caricamento dei campioni, dei puntali, degli adattatori del rotore e dei flaconi per reagenti.

11. Al termine del protocollo "PAXgene Blood RNA Part A", aprire il coperchio del QIAcube Connect MDx (vedere Figura 15, pag. 58). Rimuovere e scartare le PRC dagli adattatori del rotore e le PT vuote dall'agitatore.



Durante il processo le colonne spin vengono trasferite dalla posizione 1 (posizione tappo L1) alla posizione 3 dell'adattatore del rotore (posizione tappo L2) tramite lo strumento (vedere Figura 20, pag. 64).

12. Chiudere i tappi di tutte le MCT da 1,5 mL contenenti l'RNA purificato negli adattatori del rotore (posizione 3, posizione tappo L3, vedere Figura 20, pag. 64). Trasferire le MCT da 1,5 mL in un adattatore per agitatore del QIAcube Connect MDx (vedere Figura 18, pag. 62).

13. Chiudere il coperchio del QIAcube Connect MDx (vedere Figura 15, pag. 58).

14. Selezionare il protocollo "PAXgene Blood RNA Part B" e far partire il protocollo.

Seguire le istruzioni fornite sul touch screen del QIAcube Connect MDx.



Questo programma incuba i campioni a 65°C e denatura l'RNA per applicazioni downstream dell'RNA. Se l'applicazione downstream comprende una fase di denaturazione a caldo non saltare questa fase. Una sufficiente denaturazione dell'RNA a questo punto è essenziale per ottenere la massima efficacia nelle applicazioni downstream.

15. Al termine del programma "PAXgene Blood RNA Part B", aprire il coperchio del QIAcube Connect MDx (vedere Figura 15, pag. 58). Posizionare immediatamente le MCT contenenti l'RNA purificato sul ghiaccio.



AVVERTENZA: superficie rovente. L'agitatore può raggiungere temperature superiori a 70°C. Evitare di toccarlo quando è bollente.



Non lasciare l'RNA purificato nel QIAcube Connect MDx. Poiché i campioni non sono raffreddati, l'RNA purificato può essere degradato. Si sconsiglia per questo la preparazione dei campioni durante la notte senza opportuna sorveglianza.

16. Se i campioni di RNA non vengono utilizzati subito, conservare a -20°C o -70°C .

Poiché l'RNA rimane denaturato dopo ripetuti congelamenti e scongelamenti, non è necessario ripetere il protocollo di incubazione a caldo ("PAXgene Blood RNA Part B"). Se si utilizzano i campioni di RNA per esami diagnostici, attenersi alle istruzioni fornite dal produttore.

Per una quantificazione dell'RNA più precisa e attendibile misurando l'assorbanza a 260 nm, consigliamo di diluire i campioni in 10 mM di Tris-HCl, pH 7,5.* Una diluizione del campione con acqua priva di RNasi potrebbe portare a risultati imprecisi o troppo bassi.

Per azzerare lo spettrofotometro, utilizzare un bianco contenente la stessa proporzione di tampone di eluizione (BR5) e tampone Tris-HCl presenti nel campione da misurare. Il tampone di eluizione (BR5) assorbe intensamente a 220 nm, e questo può portare ad alti valori di assorbanza di sfondo, se lo spettrofotometro non è stato azzerato correttamente.



Per la quantificazione in tampone Tris-HCl, usare la relazione

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/mL}$. Vedere Appendice B, pag. 77.

17. Rimuovere il rack per flaconi per reagenti dal piano di lavoro del QIAcube Connect MDx (vedere Figura 18, pag. 62) e chiudere tutti i flaconi dei reagenti con i tappi opportunamente etichettati. Richiudere tutti i flaconi contenenti tamponi e acqua priva di RNasi, le fiale e le provette contenenti enzimi e tamponi enzimatici, oltre che i sacchetti contenenti materiali plastici del kit usato per il protocollo. Conservare il restante contenuto del kit e i flaconi per reagenti come descritto nella sezione "Conservazione e manipolazione dei reagenti" (pag. 22) e "Stabilità durante l'uso" (pag. 22) fino all'uso successivo.

Rimuovere e gettare i reagenti rimasti nelle PT negli slot per MCT del QIAcube Connect MDx. Rimuovere e gettare gli adattatori del rotore dalla centrifuga. Svuotare il cassetto rifiuti del QIAcube Connect MDx (vedere Figura 15, pag. 58). Chiudere il coperchio dello strumento e spegnere lo strumento con l'interruttore di alimentazione.

* Quando si utilizzano sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio adeguato, guanti monouso e occhiali di protezione. Per maggiori informazioni, consultare le schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

Limiti per l'uso del prodotto

Il PAXgene Blood RNA Kit è concepito per l'estrazione dell'RNA intracellulare da sangue intero umano ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leucociti/mL) per applicazioni di diagnostica in vitro. Non è destinato all'estrazione del DNA genomico o di acidi nucleici virali da sangue intero umano. A causa del numero limitato di trascritti validati per le specifiche di stabilizzazione (trascritti genetici FOS e IL1B), le caratteristiche delle prestazioni del kit non sono state definite per tutti i trascritti. È compito di chi utilizza il prodotto verificare se per altri trascritti sia necessaria una validazione. I componenti del kit sono destinati esclusivamente all'uso descritto nel protocollo manuale e automatico descritto nelle presenti istruzioni per l'uso.

Per informazioni sull'impiego di PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), vedere il manuale *PAXgene Blood RNA Tube*.

Controllo di qualità

In conformità al sistema di gestione della qualità secondo le norme ISO di QIAGEN, ogni lotto del PAXgene Blood RNA Kit viene testato in base a criteri di controllo prestabiliti, rispetto a specifiche prestabilite, per garantire la costante qualità del prodotto.

Caratteristiche delle prestazioni

Prelievo e stabilizzazione del campione

Le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) contengono un reagente proprietario di stabilizzazione dell'RNA. Questo additivo protegge le molecole dell'RNA dalla degradazione causata dalla RNasi e minimizza i cambiamenti ex vivo nell'espressione genica. Le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) per il prelievo di sangue intero umano garantiscono la stabilizzazione dell'RNA cellulare fino a 3 giorni a 18–25°C (Figura 4 e Figura 5, rispettivamente alle pagg. 41 e 42) o fino a 5 giorni a 2–8°C (Figura 6 e Figura 7, pagg. 43 e 44). Inoltre, il sangue stabilizzato può essere conservato congelato. I dati attualmente disponibili mostrano che a -20°C o -70°C* l'RNA cellulare rimane stabile per almeno 11 anni. Per ulteriori informazioni su periodi di stabilizzazione più lunghi, visitare il sito www.preanalytix.com oppure contattare i servizi tecnici QIAGEN.

La durata reale della stabilizzazione dell'RNA può variare in base alla specie di RNA cellulare e dall'applicazione downstream. A causa del numero limitato di trascritti validati per le specifiche di stabilizzazione (trascritti genetici FOS e IL1B), le caratteristiche delle prestazioni del kit non sono state definite per tutti i trascritti. È compito di chi utilizza il prodotto verificare se per altri trascritti sia necessaria una validazione.

* È in corso uno studio a lungo termine sulla conservazione del sangue nelle PAXgene Blood RNA Tubes.

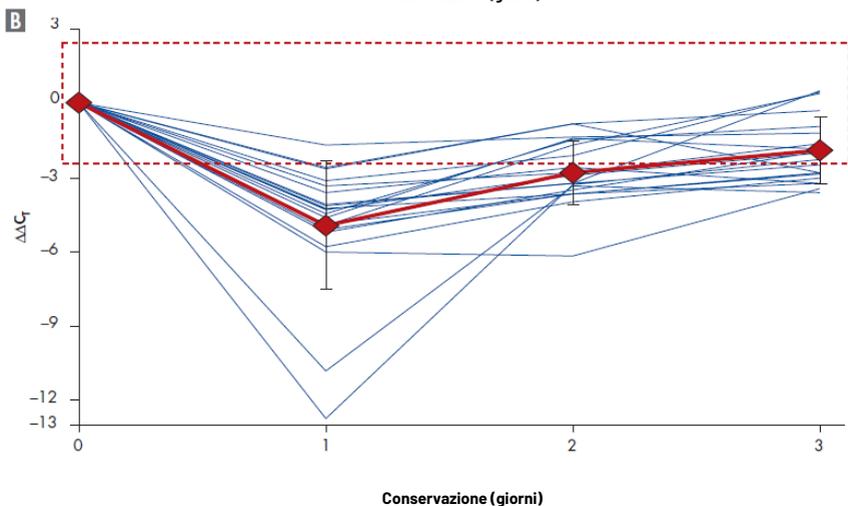
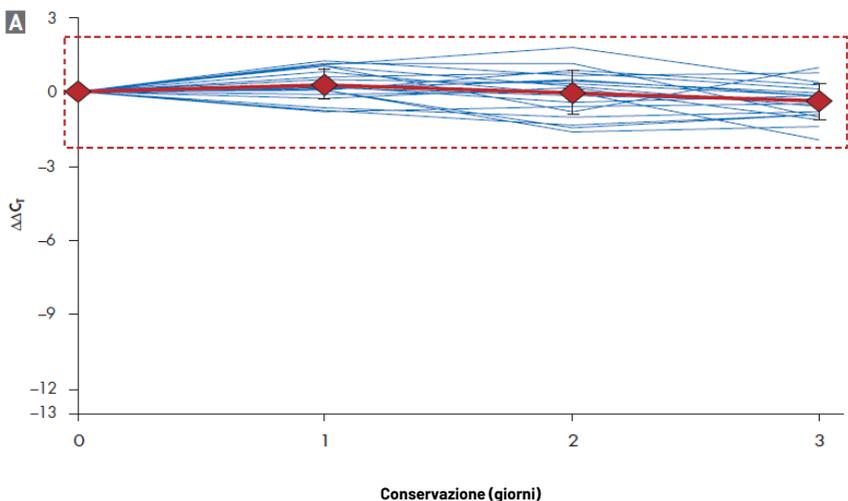


Figura 4: Stabilità dell'RNA in campioni di sangue a 18–25°C: FOS. Il sangue è stato prelevato da 10 donatori apparentemente sani, con campioni in duplicato, e conservato a 18–25°C per il numero di giorni indicato. Quindi è stata eseguita l'estrazione dell'RNA totale. **[A]** Il sangue è stato prelevato e conservato nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) e l'RNA totale è stato purificato con il PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Il sangue è stato prelevato e conservato in provette standard per il prelievo ematico trattate con EDTA come anticoagulante. L'RNA totale è stato purificato utilizzando un metodo standard di estrazione organica con purificazione dell'RNA basata su membrane di silice. I livelli relativi di trascrizione del gene FOS sono stati determinati mediante RT PCR duplex in tempo reale utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Nel grafico sono riportati i valori per tutti i campioni analizzati, con le medie e le deviazioni standard. Le linee tratteggiate indicano la precisione totale $\pm 3\times$ dell'esame (2,34 C_T).

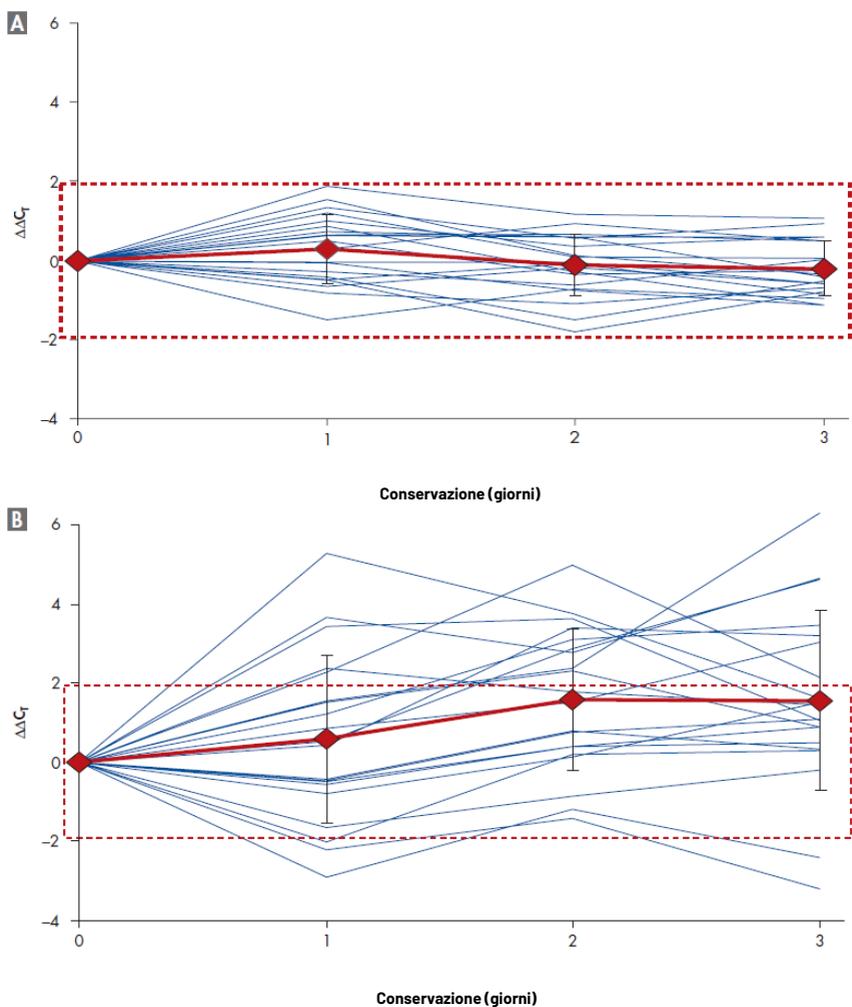


Figura 5: Stabilità dell'RNA in campioni di sangue a 18-25°C: IL1B. Il prelievo del sangue e la purificazione dell'RNA totale sono avvenuti, dopo conservazione a 18-25°C, come descritto nella Figura 4. I livelli relativi di trascrizione di IL1B sono stati determinati mediante RT PCR duplex in tempo reale utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Nel grafico sono riportati i valori per tutti i campioni analizzati, con le medie e le deviazioni standard. Le linee tratteggiate indicano la precisione totale $\pm 3 \times$ dell'esame (1,93 C_T).

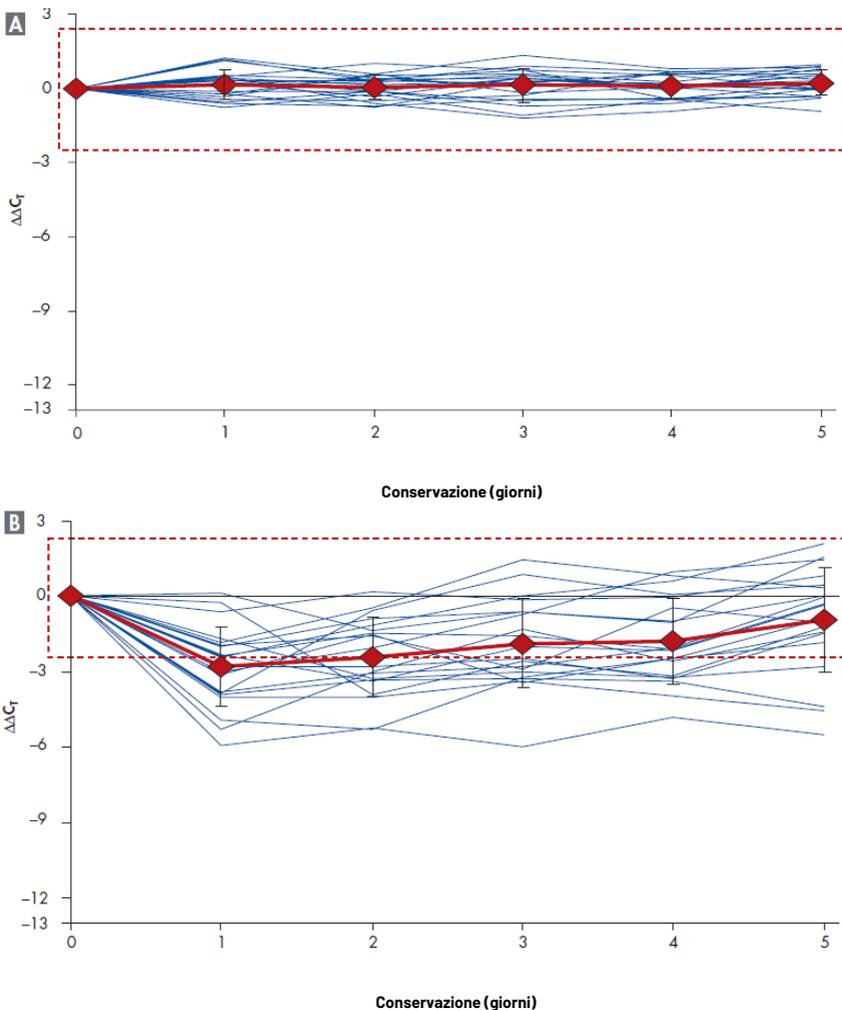


Figura 6: Stabilità dell'RNA in campioni di sangue a 2–8°C: FOS. Il sangue è stato prelevato da 10 donatori, con campioni in duplicato, e conservato a 2–8°C per il numero di giorni indicato. Quindi è stata eseguita l'estrazione dell'RNA totale. **[A]** Il sangue è stato prelevato e conservato nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) e l'RNA totale è stato purificato con il PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Il sangue è stato prelevato e conservato in provette standard per il prelievo ematico trattate con EDTA come anticoagulante. L'RNA totale è stato purificato utilizzando un metodo standard di estrazione organica con purificazione dell'RNA basata su membrane di silice. I livelli relativi di trascrizione del gene FOS sono stati determinati mediante RT-PCR duplex in tempo reale utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Nel grafico sono riportati i valori per tutti i campioni analizzati, con le medie e le deviazioni standard. Le linee tratteggiate indicano la precisione totale $\pm 3\times$ dell'esame ($2,34 C_t$).

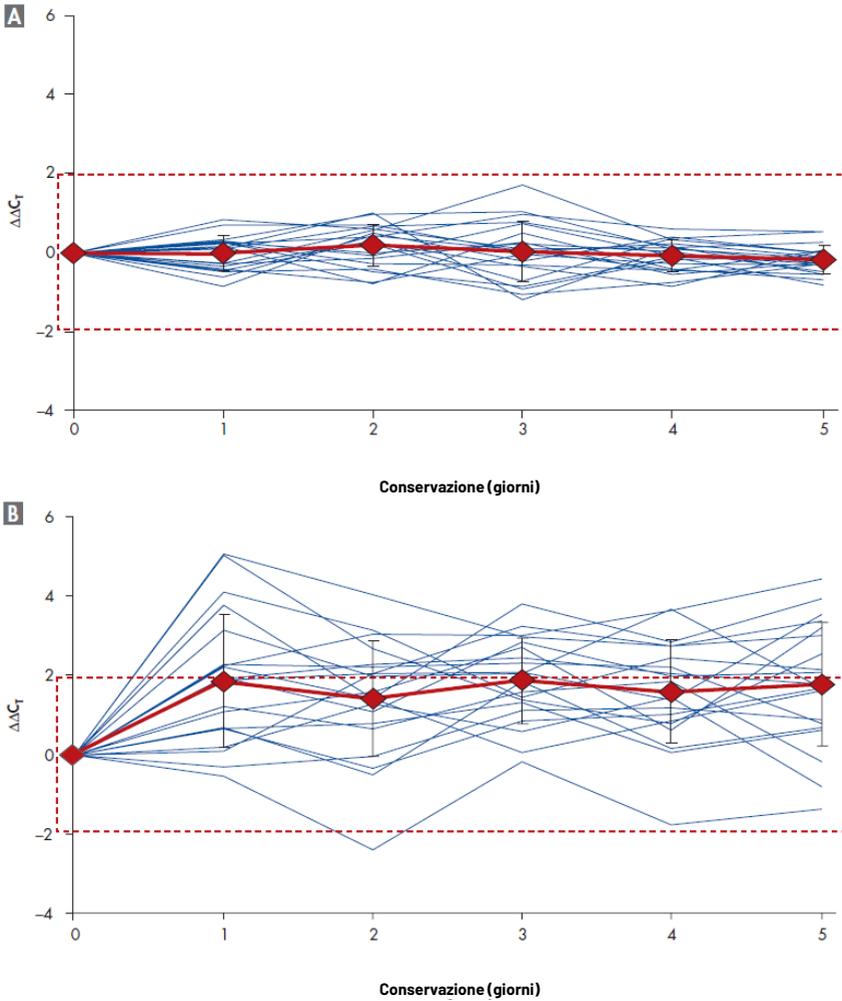


Figura 7: Stabilità dell'RNA in campioni di sangue a 2-8°C: IL1B. Il prelievo del sangue e la purificazione dell'RNA totale sono avvenuti, dopo conservazione a 2-8°C, come descritto nella Figura 6. I livelli relativi di trascrizione di IL1B sono stati determinati mediante RT PCR duplex in tempo reale utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Nel grafico sono riportati i valori per tutti i campioni analizzati, con le medie e le deviazioni standard. Le linee tratteggiate indicano la precisione totale $\pm 3 \times$ dell'esame (1,93 Ct).

Estrazione dell'RNA manuale

L'RNA totale isolato usando il PAXgene Blood RNA System è puro. Usando il protocollo manuale, i valori A_{260}/A_{280} sono compresi tra 1,8 e 2,2, e $\leq 1\%$ (w/w) di DNA genomico è presente in $\geq 95\%$ di tutti i campioni, come misurato da PCR quantitativa in tempo reale di una sequenza del gene beta-actin. Almeno il 95% dei campioni non mostra inibizione nella RT-PCR quando l'eluato ammonta fino al 30% del volume di reazione della RT-PCR.

Usando il protocollo manuale, il tempo medio di preparazione dei campioni (in base ai dati da 12 preparazioni dei campioni) è circa 90 minuti*, con soli 40 minuti di passaggi manuali. Le rese dell'RNA da 2,5 mL di sangue intero umano da donatori sani sono $\geq 3 \mu\text{g}$ per il $\geq 95\%$ dei campioni processati. Le rese sono in ogni caso strettamente legate allo stato di salute del donatore e possono variare da un individuo all'altro. Per le analisi di singoli donatori, il PAXgene Blood RNA System fornisce rese altamente riproducibili e ripetibili (Figura 8 e Figura 9, rispettivamente alle pagg. 46 e 47) e risultati per la RT-PCR riproducibili e ripetibili (Figura 10 e Figura 11, rispettivamente alle pagg. 51 e 52), dimostrandosi quindi l'ideale per i test di diagnostica clinica.

La Figura 8 (pag. 46) mostra la riproducibilità e la ripetibilità complessive di PAXgene Blood RNA System. Sono stati condotti ulteriori studi per mostrare quanto i diversi lotti del PAXgene Blood RNA Kit e i diversi operatori possano influire sulla riproducibilità della resa dell'RNA e dei risultati per la RT-PCR in tempo reale. Poiché per queste analisi sono stati utilizzati campioni di sangue analizzati in pool – anziché campioni raccolti singolarmente con le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) – i risultati di tali esperimenti non rispecchiano la precisione della ripetibilità del sistema, che tiene conto anche delle differenze nel prelievo del sangue, ma solamente la precisione della ripetibilità nella preparazione dei campioni (vedere Figura 9, pag. 47).

* Durata totale di esecuzione, inclusa la manipolazione iniziale delle PAXgene Blood RNA Tubes (centrifughe, lavaggio e risospensione del pellet).

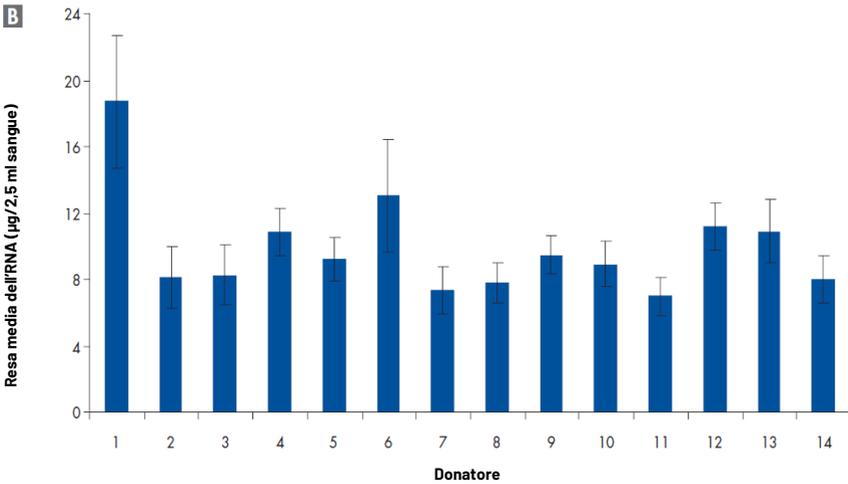
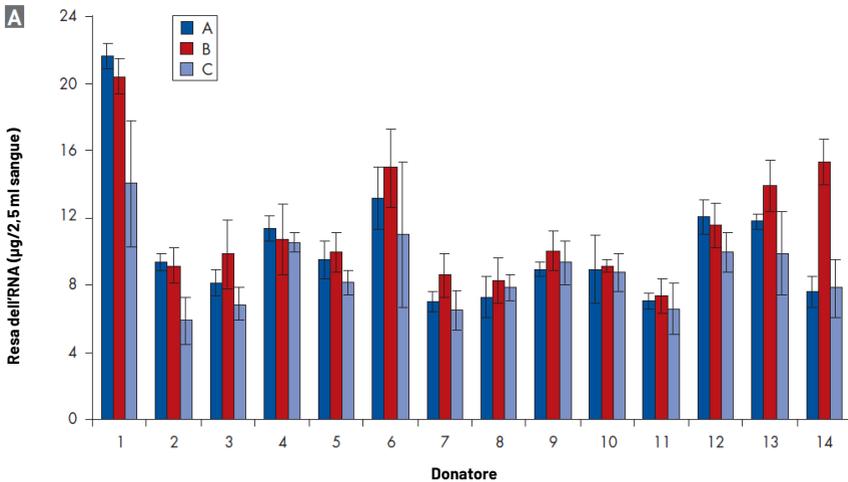


Figura 8: Estrazione dell'RNA riproducibile e ripetibile. Campioni di sangue di 14 donatori sono stati processati manualmente in quadruplicato da 3 tecnici (A, B, C). Sono stati utilizzati tre set di strumenti di laboratorio e tutti i campioni preparati da un tecnico sono stati processati con gli stessi strumenti. [A] Sono rappresentate medie e deviazioni standard della resa dell'RNA per campioni replicati dello stesso donatore e con tecnici diversi. [B] Dodici campioni di sangue in replica da ciascuno dei 14 donatori sono stati processati da 3 tecnici diversi. Sono rappresentate medie e deviazioni standard della resa dell'RNA per campioni dello stesso donatore e con tutti i tecnici. Per tutti i campioni di RNA, il rapporto A_{280}/A_{260} era compreso tra 1,8 e 2,2.

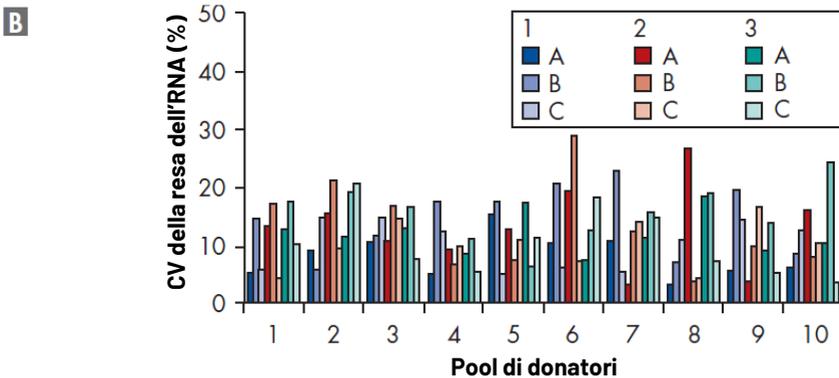
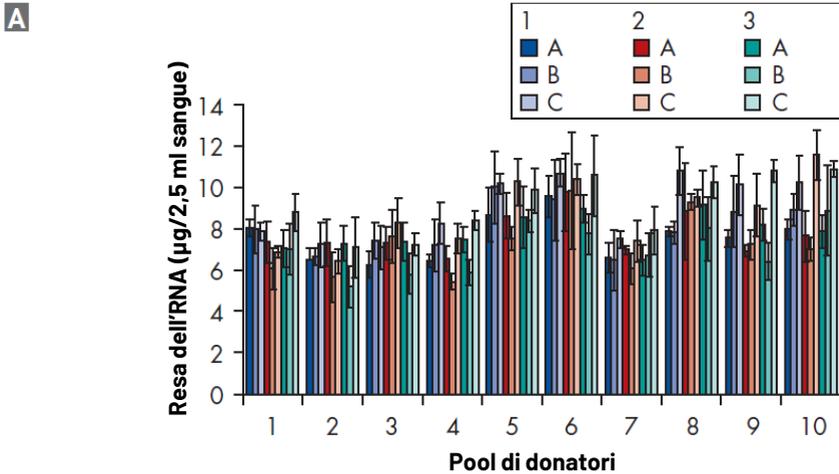


Figura 9: Ripetibilità e riproducibilità della resa dell'RNA con differenti operatori e diversi lotti del PAXgene Blood RNA Kit impiegando campioni di sangue in pool. Campioni di sangue di 30 differenti donatori sono stati raccolti nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 provette per donatore, 360 provette in totale). Il contenuto dei campioni da 3 donatori è stato messo in pool e rialiquotato in 36 campioni. Questi 36 campioni per ogni pool di 3 donatori sono stati processati manualmente da 3 diversi operatori. Ogni operatore ha utilizzato il PAXgene Blood RNA Kit da 3 diversi lotti per l'estrazione dell'RNA e da quadruplicati già processati da ognuno dei 10 pool. **[A]** Resa dell'RNA e deviazione standard di ogni combinazione lotto-operatore. I campioni di sangue di 10 pool di donatori sono stati processati da 3 diversi operatori (A, B e C) con ognuno dei 3 lotti di kit (1, 2 e 3). Sono riportate le rese medie (colonne) e le deviazioni standard (barre di errore) per quadruplicato di campione dello stesso pool di donatori per diversi operatori e lotti di kit. **[B]** Coefficiente di variazione (CV) della resa dell'RNA per pool di donatori di tutte le combinazioni operatore-lotto (A, B e C; 1, 2 e 3), calcolato dalla resa media e dalla deviazione standard riportate nella Figura 9A.

Tabella 1A: Riproducibilità nell'ambito di ogni lotto e per ogni tecnico per pool di donatori selezionati (1, 6, 9, 10)

Combinazione di dati	Pool donatori 1 ($5,1 \times 10^6$ cellule/mL)			Pool donatori 6 ($6,5 \times 10^6$ cellule/mL)		
	Resa media (μg)	DS (μg)	CV (%)	Resa media (μg)	DS (μg)	CV (%)
Lotto 1, tecnico A	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
Lotto 1, tecnico B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
Lotto 1, tecnico C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
Lotto 2, tecnico A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
Lotto 2, tecnico B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
Lotto 2, tecnico C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
Lotto 3, tecnico A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
Lotto 3, tecnico B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
Lotto 3, tecnico C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
	Pool donatori 9 ($8,4 \times 10^6$ cellule/mL)			Pool donatori 10 ($10,2 \times 10^6$ cellule/mL)		
	Resa media (μg)	DS (μg)	CV (%)	Resa media (μg)	DS (μg)	CV (%)
Lotto 1, tecnico A	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
Lotto 1, tecnico B	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Lotto 1, tecnico C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Lotto 2, tecnico A	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Lotto 2, tecnico B	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Lotto 2, tecnico C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Lotto 3, tecnico A	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Lotto 3, tecnico B	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Lotto 3, tecnico C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3

Tabella 1B: Riproducibilità per ogni tecnico e tra tutti i lotti per pool di donatori selezionati (1, 6, 9, 10)

Combinazione di dati	Pool donatori 1 ($5,1 \times 10^6$ cellule/mL)			Pool donatori 6 ($6,5 \times 10^6$ cellule/mL)		
	Resa media (μg)	DS (μg)	CV (%)	Resa media (μg)	DS (μg)	CV (%)
Tecnico A, tutti i lotti	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Tecnico B, tutti i lotti	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Tecnico C, tutti i lotti	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
	Pool donatori 9 ($8,4 \times 10^6$ cellule/mL)			Pool donatori 10 ($10,2 \times 10^6$ cellule/mL)		
	Resa media (μg)	DS (μg)	CV (%)	Resa media (μg)	DS (μg)	CV (%)
Tecnico A, tutti i lotti	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Tecnico B, tutti i lotti	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Tecnico C, tutti i lotti	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

Tabella 1C: Riproducibilità nell'ambito di ogni lotto e tra tutti i tecnici per pool di donatori selezionati (1, 6, 9, 10)

Combinazione di dati	Pool donatori 1 ($5,1 \times 10^6$ cellule/mL)			Pool donatori 6 ($6,5 \times 10^6$ cellule/mL)		
	Resa media (μg)	DS (μg)	CV (%)	Resa media (μg)	DS (μg)	CV (%)
Lotto 1, tutti i tecnici	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Lotto 2, tutti i tecnici	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Lotto 3, tutti i tecnici	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
	Pool donatori 9 ($8,4 \times 10^6$ cellule/mL)			Pool donatori 10 ($10,2 \times 10^6$ cellule/mL)		
	Resa media (μg)	DS (μg)	CV (%)	Resa media (μg)	DS (μg)	CV (%)
Lotto 1, tutti i tecnici	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Lotto 2, tutti i tecnici	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Lotto 3, tutti i tecnici	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

Tabella 1D: Riproducibilità tra tutti i lotti e tutti i tecnici per pool di donatori selezionati (1, 6, 9, 10)

Combinazione di dati	Pool donatori 1 ($5,1 \times 10^6$ cellule/mL)			Pool donatori 6 ($6,5 \times 10^6$ cellule/mL)		
	Resa media (μg)	DS (μg)	CV (%)	Resa media (μg)	DS (μg)	CV (%)
Lotto 1, tutti i tecnici	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
	Pool donatori 9 ($8,4 \times 10^6$ cellule/mL)			Pool donatori 10 ($10,2 \times 10^6$ cellule/mL)		
	Resa media (μg)	DS (μg)	CV (%)	Resa media (μg)	DS (μg)	CV (%)
Lotto 1, tutti i tecnici	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Analisi dettagliata di 4 pool di donatori. I pool sono stati scelti in base al numero di leucociti e indicano il valore superiore, medio e inferiore del normale range del numero di leucociti ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leucociti/mL). I numeri di leucociti sono stati determinati dalla media dei 3 numeri di leucociti dei 3 donatori di ogni pool.

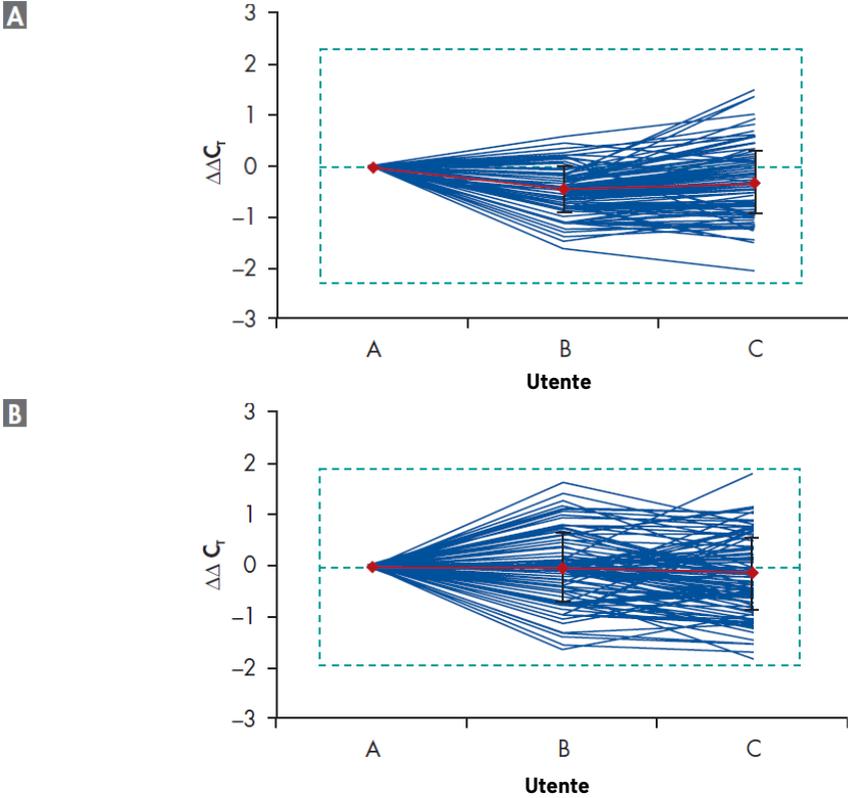


Figura 10: Riproducibilità della RT-PCR – tra tecnici. I campioni di RNA isolati nell'esperimento della Figura 9 sono stati impiegati nella RT-PCR in tempo reale. I livelli relativi dei trascritti di **[A]** FOS e **[B]** IL1B sono stati determinati per RT-PCR duplex in tempo reale utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Sono riportati i valori di tutti i campioni, relativamente ai valori per il tecnico A (10 pool di donatori × 3 lotti di kit × 4 ripetizioni = 120 set di dati per ogni gene) con valori medi (linee rosse) e deviazioni standard (barre nere). Le linee tratteggiate indicano la precisione totale $\pm 3x$ degli esami (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

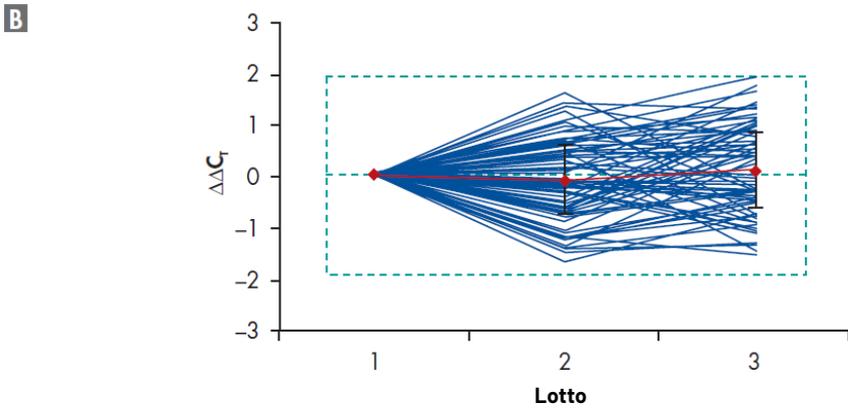
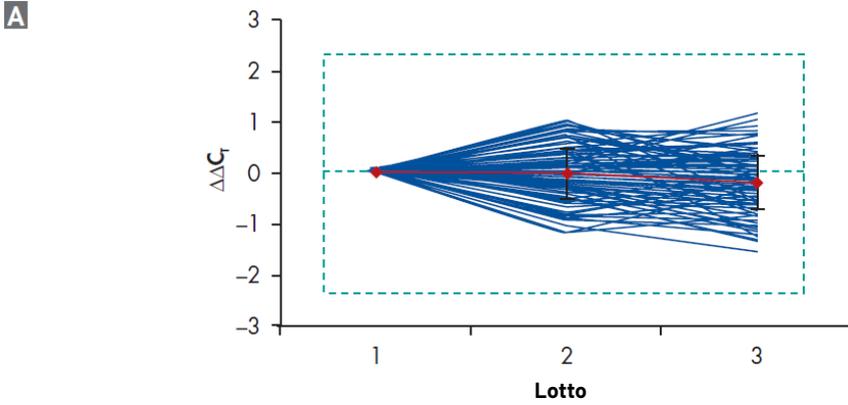


Figura 11: Riproducibilità della RT-PCR – tra lotti di kit. I campioni di RNA isolati nell'esperimento della Figura 9 sono stati impiegati nella RT-PCR in tempo reale. I livelli relativi dei trascritti di **[A]** FOS e **[B]** IL1B sono stati determinati per RT-PCR duplex in tempo reale utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Sono riportati i valori di tutti i campioni, relativamente ai valori per lotto 1 (10 pool di donatori × 3 tecnici × 4 ripetizioni = 120 set di dati per ogni gene) con valore medio (linea rossa) e deviazione standard (barra nera). Le linee tratteggiate indicano la precisione totale $\pm 3x$ degli esami (FOS: $2,34 C_T$; IL1B: $1,93 C_T$).

Tabella 2: Riepilogo dei risultati RT-PCR riportati nella Figura 10 e Figura 11

Sistema del test	Esame FOS/rRNA 18S		Esame IL1B/rRNA 18S	
Confronto tra i dati	Valori medi ($\Delta\Delta C_T$)	\pm DS ($\Delta\Delta C_T$)	Valori medi ($\Delta\Delta C_T$)	\pm DS ($\Delta\Delta C_T$)
Riproducibilità tra tutti i lotti per ogni tecnico				
Tutti i tecnici, lotto 1-lotto 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Tutti i tecnici, lotto 1-lotto 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Tutti i tecnici, lotto 1-lotto 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Riproducibilità tra tutti i lotti per ogni tecnico				
Tutti i lotti, tecnico A-tecnico A	0,00	0,00	0,00	0,00
Tutti i lotti, tecnico A-tecnico B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Tutti i lotti, tecnico A-tecnico C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Utente: assistente tecnico che ha eseguito lo studio.

Lotto: numero di lotto del kit impiegato.

DS: Deviazione standard.

Vengono mostrati i valori $\Delta\Delta C_T$ medi (N = 120) e le deviazioni standard per i dati presentati nella Figura 10 e Figura 11.

Estrazione dell'RNA in automatico

Le rese dell'RNA da 2,5 mL di sangue intero umano da donatori sani sono $\geq 3 \mu\text{g}$ per il $\geq 95\%$ dei campioni processati. La Figura 12 (pag. 54) indica le rese dell'RNA da un totale di 216 campioni preparati usando il protocollo automatico con 3 lotti di kit con 3 diversi operatori. Quando per questi studi sono stati usati campioni di sangue in pool invece delle singole PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), i risultati non riflettono la resa dell'RNA attesa dai singoli campioni degli estratti di sangue individuali. Poiché le rese dipendono molto dal donatore, le singole rese possono variare (Figura 12, pag. 54).

Almeno il 95% dei campioni non mostra inibizione nella RT-PCR quando l'eluato ammonta fino al 30% del volume di reazione della RT-PCR. Usando il protocollo in automatico, non sono rilevabili contaminazioni crociate tra i campioni, come misurato con la RT-PCR quantitativa in tempo reale di sequenze di ABL1 e dei trascritti FOS in campioni RNA-negativi (acqua) insieme a campioni RNA-positivi (campioni di sangue intero) nello stesso processo.

L'RNA isolato con il PAXgene Blood RNA System e il protocollo in automatico è puro, come risulta evidente dall'assenza di un'inibizione di RT-PCR e dai valori A_{260}/A_{280} compresi tra 1,8 e 2,2. Il DNA genomico è presente a $\leq 1\%$ (w/w) in $\geq 95\%$ di tutti i campioni, come misurato dalla PCR quantitativa in tempo reale di una sequenza del gene beta-actin. Le Figure 13 e 14 (pagg. 55 e) mostrano i valori A_{260}/A_{280} e il DNA genomico relativo di un totale di 216 campioni preparati usando il protocollo in automatico con 3 lotti di kit usati da 3 operatori.

Resa dell'RNA ($\mu\text{g}/2,5 \text{ mL}$ sangue) QIAcube Connect MDx

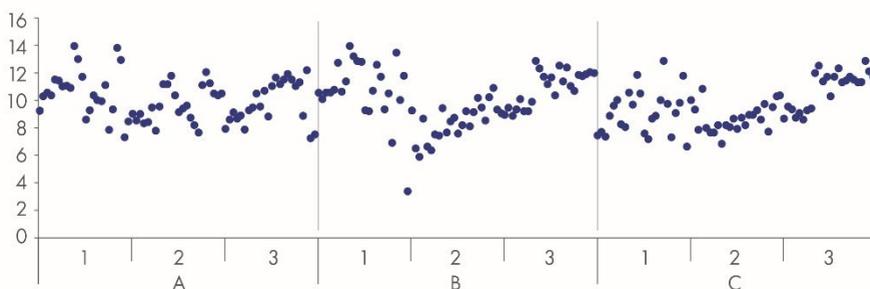


Figura 12: Resa dell'RNA – Procedura in automatico con QIAcube Connect MDx. Sono stati raccolti campioni di sangue da singoli donatori in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Il contenuto delle provette è stato raccolto in 6 pool di donatori e successivamente rialiquotato. Sono state processate in totale 216 provette (ossia, 36 per pool) di 3 diversi operatori (A, B, C). Ogni operatore ha usato 3 lotti differenti (1, 2, 3) del PAXgene Blood RNA Kit per l'estrazione in automatico con QIAcube Connect MDx e ha processato campioni quadruplicati da ognuno dei 6 pool di donatori. Le rese dell'RNA per tutti i singoli campioni sono mostrati per ogni combinazione operatore-lotto.

Stabilità dell'RNA estratto

I campioni di RNA estratti dalle PAXgene Blood RNA Tubes riempite di sangue con il PAXgene Blood RNA Kit sono stabili per 5 anni di conservazione a -20°C e 7 anni di conservazione a -70°C (endpoint degli studi).

Note importanti

Utilizzo del QIAcube Connect MDx

Assicurarsi di avere familiarità con l'uso del QIAcube Connect MDx. Prima di iniziare il protocollo PAXgene Blood RNA in automatico, leggere il manuale utente dello strumento e ogni informazione ulteriore fornita con lo strumento, ponendo particolare attenzione alle informazioni sulla sicurezza.

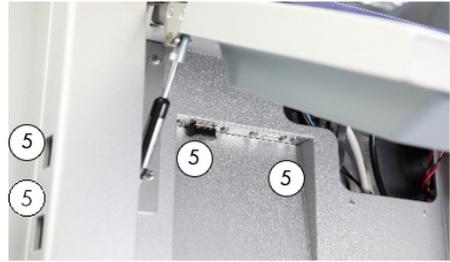
Avvio del QIAcube Connect MDx

Chiudere il coperchio del QIAcube Connect MDx e accendere lo strumento con l'interruttore di alimentazione (vedere Figura 15, pag. 58).

Si sentirà un beep e apparirà la schermata di avvio. Lo strumento eseguirà automaticamente i test di inizializzazione.



Parte anteriore del QIAcube Connect MDx



Touch screen estratto



Parte posteriore del QIAcube Connect MDx (lato sinistro)



Parte posteriore del QIAcube Connect MDx (lato destro)

Figura 15: Caratteristiche esterne del QIAcube Connect MDx.

- ① Touch screen
 - ② Coperchio
 - ③ Cassetto materiali di scarto
 - ④ Interruttore di alimentazione
- ⑤ 2 porte USB sul lato sinistro del touch screen; 2 porte USB dietro il touch screen (modulo Wi-Fi collegato a 1 porta USB)
 - ⑥ Porta ethernet RJ-45
 - ⑦ Presa del cavo di alimentazione
 - ⑧ Uscita aria di raffreddamento

Touch screen

Il QIAcube Connect MDx si comanda mediante un touch screen. Il touch screen consente all'utente di utilizzare lo strumento e guidare l'utente nella preparazione del piano di lavoro. Durante il trattamento dei campioni, sul touch screen sono visualizzati lo stato del protocollo e il tempo rimanente.



Figura 16: Touch screen estratto del QIAcube Connect MDx.

Installazione dei protocolli sul QIAcube Connect MDx

Prima di eseguire il primo processo di preparazione dell'RNA sul QIAcube Connect MDx, potrebbe essere richiesta l'installazione iniziale di un protocollo. Installare sia il protocollo "PAXgene Blood RNA Part A" che il protocollo "PAXgene Blood RNA Part B".

I protocolli per il QIAcube Connect MDx sono disponibili su www.qiagen.com e devono essere scaricati sulla penna USB in dotazione con lo strumento. Questi protocolli verranno trasferiti allo strumento tramite la porta USB.

La porta USB (posta al lato del touch screen; vedere Figura 15, pag. 58), permette la connessione del QIAcube Connect MDx alla penna USB in dotazione con lo strumento. I file di dati, come i file di log e di report, possono essere anche trasferiti tramite la porta USB dallo strumento alla penna USB.



La porta USB è da utilizzarsi esclusivamente con la penna USB fornita da QIAGEN. Non connettere altri dispositivi a questa porta.



Non rimuovere la penna USB mentre si scaricano protocolli o mentre si trasferiscono file di dati o durante l'esecuzione di un protocollo.

Per ulteriori dettagli sul processo di caricamento dei protocolli sul QIAcube Connect MDx, consultare il manuale utente dello strumento.

Caricamento del QIAcube Connect MDx

Per guadagnare tempo si può caricare durante una o entrambe le fasi di centrifugazione da 10 minuti (fasi 3 e 5) in "Protocollo: estrazione in automatico dell'RNA totale da sangue umano intero raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)", pag. 32.

Flaconi per reagenti

Prima di ogni processo sul QIAcube Connect MDx, riempire con precauzione i 4 flaconi per reagenti elencati nella Tabella 3 (pag. 61) fino al livello indicatore massimo oppure, qualora ciò non sia possibile, fino al livello consentito dai volumi dei tamponi forniti nel PAXgene Blood RNA Kit. Etichettare i flaconi e i tappi chiaramente con i nomi del tampone e collocarli nella posizione appropriata sul rack per flaconi per reagenti. Caricare il rack sul piano di lavoro dello strumento come mostrato (Figura 17 e Figura 18, rispettivamente alle pagg. 61 e 62).



Il volume fornito del tampone BR2 non riempirà un flacone per reagenti fino al livello indicatore. I tamponi BR3 e BR4 non possono riempire il flacone fino al livello indicatore dopo il trattamento di campioni multipli in processi precedenti.

-  Assicurarsi di rimuovere i tappi dai flaconi prima di porli sul piano di lavoro.
-  I volumi di tampone forniti nel PAXgene Blood RNA Kit (50) sono sufficienti per un massimo di 7 processi di preparazione dell'RNA sul QIACube Connect MDx, con 2–12 campioni per processo. In generale, è opportuno evitare i processi con un numero ridotto di campioni per processo, ed elaborare un totale di 50 campioni per kit. Un numero di processi di preparazione dell'RNA superiore a 7 può portare a volumi di tampone insufficienti per il trattamento degli ultimi campioni.

Tabella 3: Posizioni nel rack per flaconi reagenti

Posizione	Reagente
1	Binding buffer (Tampone di legame)(BR2)
2	Etanolo(96–100% v/v)
3	Wash buffer 1(Tampone di lavaggio 1)(BR3)
4	Wash buffer 2(Tampone di lavaggio 2)(BR4)*
5	– (lasciare vuoto)
6	– (lasciare vuoto)

*Il tampone di lavaggio 2 (BR4) viene fornito come concentrato. Per ottenere una soluzione di lavoro, al primo utilizzo aggiungere 4 volumi di etanolo (96–100%, v/v, grado di purezza p. a. – per analisi), come indicato sul flacone.

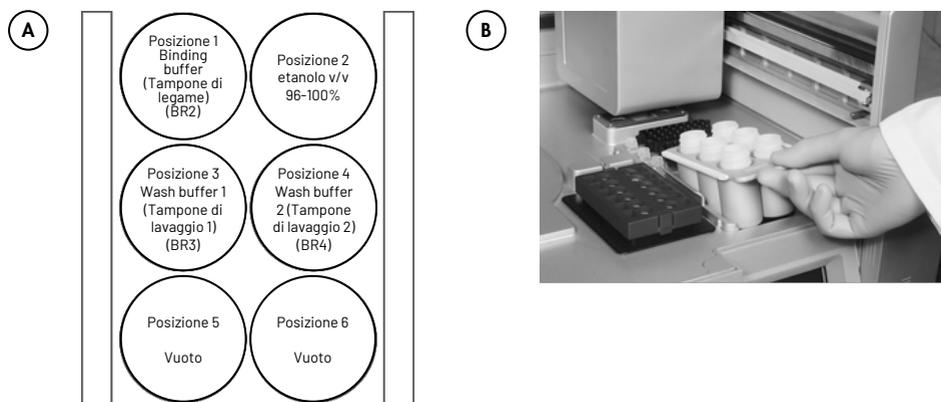


Figura 17: Caricamento del rack per flaconi per reagenti. [A] Schema delle posizioni e dei contenuti dei flaconi nel rack per flaconi per reagenti. **[B]** Caricamento del rack sul QIACube Connect MDx.

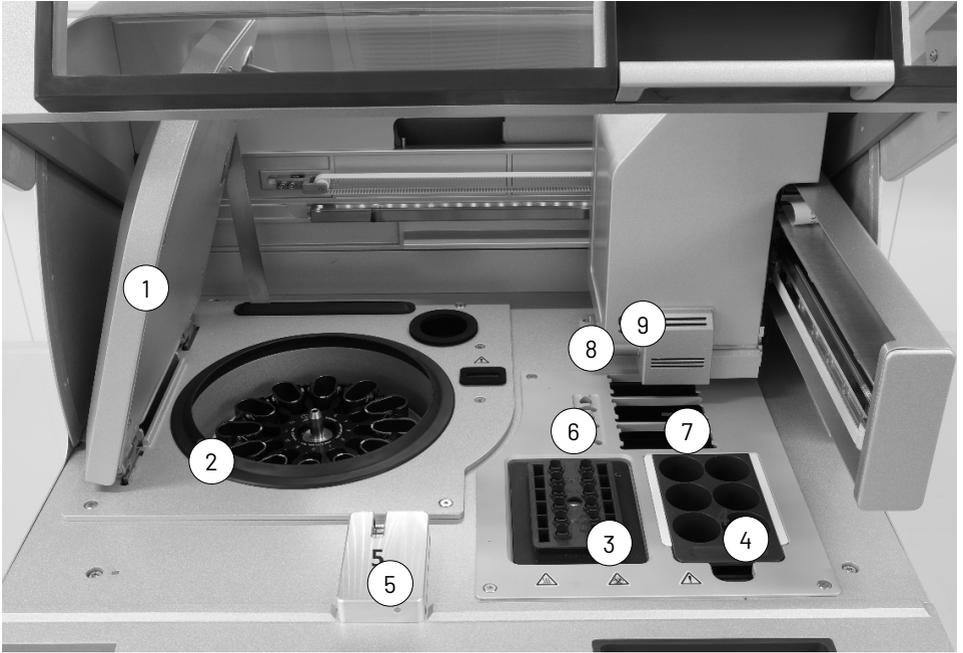


Figura 18: Vista interna del QIAcube Connect MDx.

- | | | | |
|---|--|---|--|
| ① | Coperchio centrifuga | ⑥ | Slot per MCT |
| ② | Centrifuga | ⑦ | 3 slot per rack dei puntali |
| ③ | Agitatore | ⑧ | Slot per lo smaltimento di puntali e colonne |
| ④ | Reagent Bottle Rack (rack per fialoni) | ⑨ | Braccio robotico (include pipettatore a 1 canale, pinza, sensore a ultrasuoni e ottico e LED UV) |
| ⑤ | Sensore per puntali e chiusura coperchio | | |

Colonne spin (PSC, PRC), MCT e materiale plastico del QIAcube Connect MDx

Posizionare 2 rack per puntali con Filter-Tips 1.000 µL sul QIAcube Connect MDx (vedere Figura 18, pag. 62). Caricare i rack con altri puntali quando necessario.

i Usare solo puntali per filtro da 1.000 µL destinati all'uso del QIAcube Connect MDx.

Con un pennarello indelebile etichettare gli adattatori per il rotore e la MCT per ogni campione. Aprire la PSC da usare e tagliare completamente il tappo con delle forbici (vedere Figura 19).

i Per un corretto funzionamento della pinza robotica del QIAcube Connect MDx, rimuovere completamente (tagliare) i tappi e tutte le parti di plastica che uniscono il tappo alla PSC (vedere Figura 19). Diversamente la pinza robotica non può afferrare correttamente la PSC.

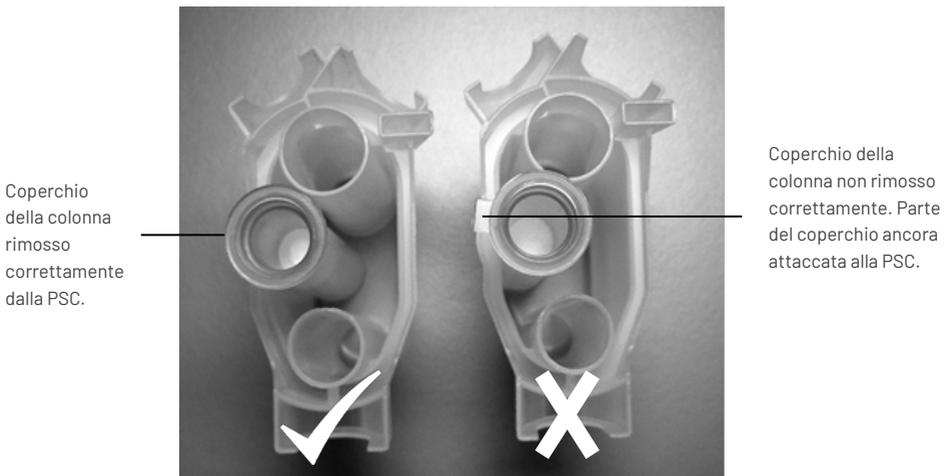


Figura 19: Caricamento della PSC. La PSC è caricata nella posizione centrale dell'adattatore per rotore. Tagliare il tappo della PSC prima di caricare la colonna.

Caricare la PSC (senza tappo, vedere Figura 19, pag. 63) la PRC e la MCT etichettata nelle posizioni relative in ciascun adattatore per rotore etichettato, come riportato nella Tabella 4 e nella Figura 20.



Assicurarsi che i tappi della colonna spin (PRC) e della MCT siano spinti completamente sul fondo degli slot al margine dell'adattatore per rotore, altrimenti potrebbero rompersi durante la centrifugazione.

Tabella 4: Materiale di consumo in plastica nell'adattatore del rotore

Posizione	Reagente	Posizione tappo
1	Colonna spin PAXgene RNA (rossa, PRC)	L1
2	Colonna spin PAXgene Shredder (lilla, PSC)(tagliare il tappo prima di posizionare nell'adattatore per rotore)	-
3	MCT*	L3

* Usare le MCT (1,5 mL) incluse nel PAXgene Blood RNA Kit.

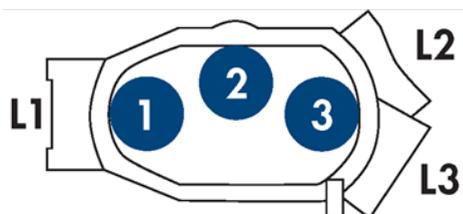


Figura 20: Posizioni nell'adattatore per rotore. L'adattatore per rotore ha 3 posizioni per provette (1-3) e tre posizioni per tappi (L1-L3).

Caricamento della centrifuga

Caricare gli adattatori per rotore negli scomparti della centrifuga del QIAcube Connect MDx come illustrato nella Figura 21 di seguito.



Se si processano meno di 12 campioni, assicurarsi di caricare il rotore della centrifuga bilanciato radialmente (vedere Figura 22, pag. 66). Tutti gli scomparti della centrifuga devono essere montati prima di far partire un protocollo, anche se i campioni da processare sono meno di 12. Un singolo (uno) campione o 11 campioni non possono essere processati.



Figura 21: Caricamento della centrifuga sul QIAcube Connect MDx. Caricare gli adattatori per rotore assemblati negli scomparti della centrifuga.

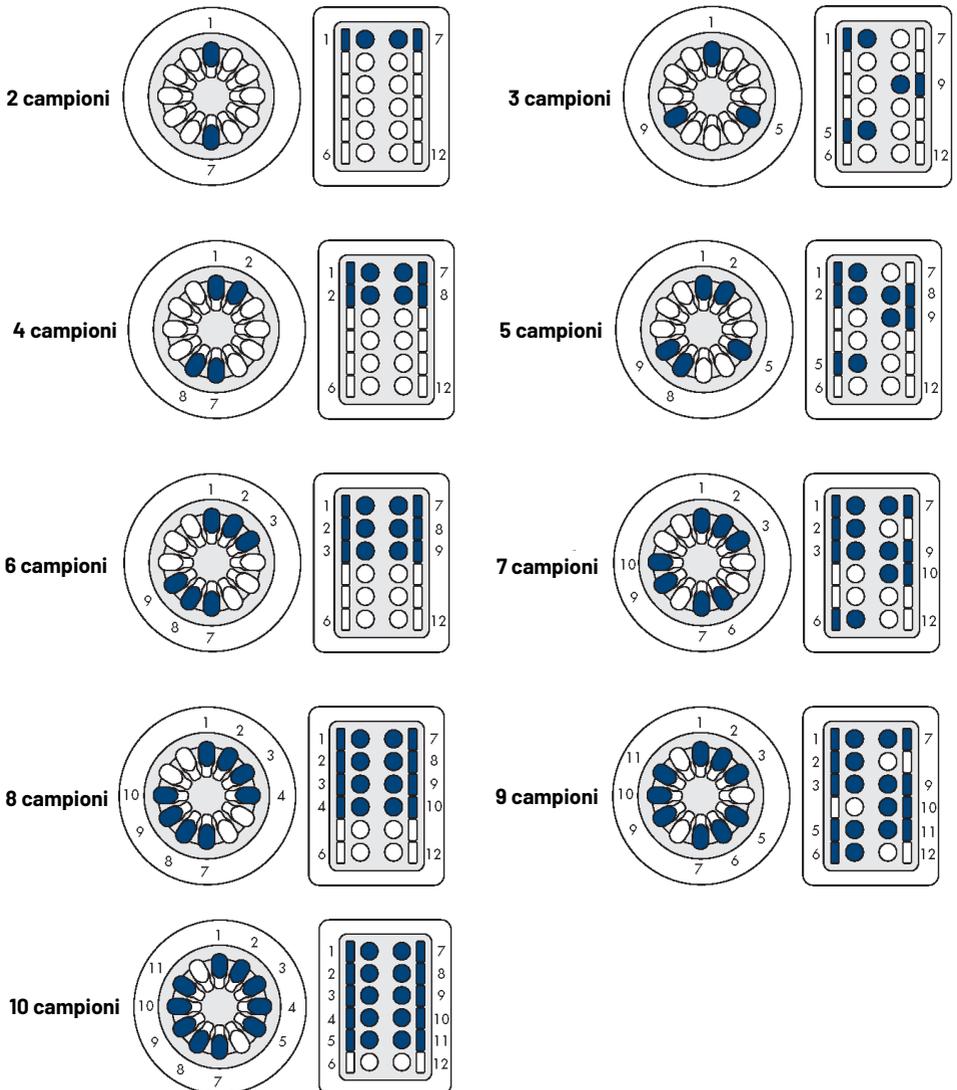


Figura 22: Caricamento della centrifuga e dell'agitatore. Vengono mostrate le posizioni di centrifuga e agitatore per il trattamento di un numero di campioni compreso tra due (2) e dieci (10). Uno (1) o undici (11) campioni non possono essere processati. Per processare 12 campioni, vengono caricate tutte le posizioni della centrifuga e dell'agitatore (immagine non mostrata).

Provette di reazione

Eliminare tutte le PT lasciate negli slot per MCT provenienti dai processi precedenti (vedere Figura 18, pag. 62). Riempire 3 PT con la quantità di reagenti indicata nella Tabella 5, in base al numero di campioni nel processo.

Per la miscela per incubazione DNasi I, pipettare il volume indicato di tampone di digestione DNA (RDD) in una PT e aggiungere il volume indicato di soluzione concentrata di DNasi I (RNFD). Miscelare delicatamente il tutto pipettando su e giù 3 volte, usando un puntale per pipetta da 1.000 µL.



Usare le PT da 2 mL incluse nel PAXgene Blood RNA Kit. Etichettare chiaramente le provette con i nomi dei reagenti e collocarle nella posizione appropriata negli slot delle MCT, come indicato nella Tabella 6 (pag. 68).



La DNasi I (RNFD) è particolarmente sensibile alla denaturazione fisica. Miscelare soltanto pipettando, utilizzando puntali per pipette wide-bore per ridurre la frammentazione. Non utilizzare il vortex.

Assicurarsi di pipettare solo il volume richiesto come indicato nella Tabella 5 di seguito.

Tabella 5: Volume dei reagenti richiesto nelle PT per gli slot delle MCT

Numero di campioni	Volume di reagente per il numero di campioni indicato (µL)		
	Proteinasi K (PK)	Miscela per incubazione di DNasi I	Tampone di eluizione (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

Tabella 6: Slot per MCT

	Posizione		
	A	B	C
Contenuto	Proteinasi K	Miscela per incubazione di DNasi I	Tampone di eluizione (BR5)
Recipiente	Provetta di reazione*	Provetta di reazione*	Provetta di reazione*

* Usare le PT da 2 mL incluse nel PAXgene Blood RNA Kit.

Smaltimento

Per uno smaltimento sicuro dopo la raccolta dei campioni e l'estrazione dell'RNA manuale, fare riferimento alle informazioni sulla sicurezza e alle precauzioni, rispettivamente alle pagine 18 e 19.

Inoltre, per l'estrazione dell'RNA in automatico con il QIAcube Connect MDx, fare riferimento alla Figura 21 e alla Figura 22, rispettivamente alle pagg. 65 e 66, che indicano gli slot appositi dei puntali e delle colonne usate, utili per lo smaltimento.

Bibliografia

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.

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per maggiori informazioni, consultare la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Gli esperti dei servizi tecnici QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante informazioni e protocolli presentati in questo manuale o le tecnologie per campioni ed esami (per le informazioni sui contatti, vedere l'ultima pagina o visitare il sito www.qiagen.com).

Commenti e suggerimenti	
RNA degradato	
a) Contaminazione da RNasi	 Prestare attenzione a non introdurre RNasi nei reagenti durante la procedura o la successiva manipolazione (vedere Appendice A, pag. 76).
Bassa resa dell'RNA	
b) Meno di 2,5 mL di sangue raccolti nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT)	 Verificare che siano raccolti 2,5 mL di sangue nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT, vedere il <i>manuale PAXgene Blood RNA Tube</i>)
c) Concentrazione di RNA misurata in acqua	 Per una quantificazione più precisa, l'RNA deve essere diluito in 10 mM di Tris-HCl, pH 7,5* (vedere Appendice B, pag. 77).
d) Detriti cellulari trasferiti nella PRC nelle fasi 9 e 10 del protocollo manuale	 Evitare di trasferire particelle di grandi dimensioni mentre si pipetta il supernatante nella fase 7 del protocollo manuale (il trasferimento di detriti di piccole dimensioni non influenza la procedura).
e) Supernatante non eliminato completamente nel passaggio 3	 Assicurarsi di rimuovere completamente il supernatante. Se il supernatante viene fatto decantare, rimuovere le gocce dal bordo della PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tamponando con carta assorbente. Prendere le necessarie precauzioni per evitare contaminazioni crociate.
f) Dopo il prelievo nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT), il sangue è stato incubato meno di 2 h	 Dopo il prelievo, incubare il sangue nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per almeno 2 h.

* Quando si utilizzano sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio adeguato, guanti monouso e occhiali di protezione. Per maggiori informazioni, consultare le schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

Commenti e suggerimenti	
Basso valore A_{260}/A_{280}	
g) Acqua utilizzata per diluire l'RNA per misurazioni di A_{260}/A_{280}	 <p>Utilizzare 10 mM di Tris-HCl pH 7,5 per diluire l'RNA prima di misurare la purezza* (vedere Appendice B pag. 77).</p>
h) Spettrofotometro non azzerato completamente	 <p>Per azzerare lo spettrofotometro, utilizzare un bianco contenente la stessa proporzione di tampone di eluizione (BR5) e 10 mM di Tris-HCl, pH 7,5, presenti nel campione da misurare. Il tampone di eluizione (BR5) assorbe intensamente a 220 nm, e questo può portare ad alti valori di assorbanza di sfondo, se lo spettrofotometro non è stato azzerato correttamente.</p>
Malfunzionamento dello strumento	
i) Il QIAcube Connect MDx non funzionava correttamente	<p>Leggere il <i>manuale utente del QIAcube Connect MDx</i>, prestando particolare attenzione alla sezione Risoluzione dei problemi. Assicurarsi che lo strumento sia sottoposto a corretta manutenzione, come descritto nel manuale utente.</p>

* Wilfinger, W.W., Mackey, M., and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 22, 474.

Simboli

I seguenti simboli possono apparire nelle istruzioni per l'uso o sulla confezione e sull'etichettatura. Ulteriori simboli sono illustrati nei Contenuto del kit (pag. 6).

Simbolo	Definizione del simbolo
V<N1>	Versione <N1> del prodotto
 <N2>	Contenuto di reagente sufficiente per <N2> test
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Data di scadenza
IVD	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
REF	Numero di catalogo
LOT	Numero di lotto
MAT	Numero di materiale
COMP	Componenti
NUM	Numero
KU	Unità Kunitz
ADD	Aggiunta
CONT	Contiene
RCNS	Ricostituito

DNase

Desossiribonucleasi I

EtOH

Etanolo

GITC

Guanidina isotiocianato

RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

GTIN

Codice GTIN (Global Trade Item Number)



Limite di temperatura



Limite superiore di temperatura



Produttore

EC REP

Rappresentante europeo autorizzato secondo il Regolamento (UE) 2017/746



Nota importante



Aggiunta di etanolo



Marchio CE. Questo prodotto soddisfa i requisiti del Regolamento (UE) 2017/746 relativo ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

UDI

UDI (identificatore univoco del dispositivo)



Cautela



AVVERTENZA: Superficie rovente

Informazioni di contatto

QIAGEN è orgogliosa della qualità e della disponibilità del proprio servizio di assistenza tecnico. Personale qualificato e di grande esperienza nel settore della biologia molecolare è a vostra disposizione per qualsiasi domanda riguardante i prodotti PreAnalytiX. In caso di dubbi sul PAXgene Blood RNA Kit non esitate a contattarci.

Per assistenza tecnica e ulteriori informazioni, consultare servizi tecnici QIAGEN all'indirizzo **www.qiagen.com/Support**, chiamare il numero 00800-22-44-6000, o contattare uno dei reparti dei servizi tecnici QIAGEN o i distributori locali (vedere il retro della copertina o visitare il sito **www.qiagen.com**).

Appendice A: Note generali per il trattamento dell'RNA

Trattamento dell'RNA



Le ribonucleasi (RNasi) sono enzimi molto stabili e attivi che non necessitano normalmente di cofattori per espletare la loro funzione. Poiché le RNasi sono difficili da inattivare e anche minime quantità sono sufficienti a degradare l'RNA, non utilizzare materiale in plastica o vetro senza aver prima eliminato le possibili contaminazioni da RNasi. Fare molta attenzione a non introdurre inavvertitamente RNasi nel campione di RNA durante o dopo la procedura di estrazione. Per creare e mantenere un ambiente privo di RNasi, occorre prendere le seguenti precauzioni durante il pre-trattamento e l'utilizzo di flaconi e soluzioni, monouso e non, mentre si opera con l'RNA.

Raccomandazioni generali per il trattamento



Quando si lavora con l'RNA è necessario utilizzare tecniche di asepsi microbiologiche appropriate. Le mani e le particelle di polvere trasportano batteri e muffe e rappresentano le fonti più comuni di contaminazione da RNasi. Indossare sempre guanti in lattice o vinile quando si manipolano i reagenti e i campioni di RNA, per evitare la contaminazione da RNasi dovuta alla superficie della pelle o alla polvere delle attrezzature di laboratorio. Cambiare i guanti frequentemente e chiudere le provette subito dopo l'uso. Mantenere l'RNA purificato in ghiaccio mentre si pipettano le aliquote per le applicazioni successive.

I protocolli per la rimozione della contaminazione da RNasi dai materiali in vetro e dalle soluzioni sono disponibili nelle guide di biologia molecolare, ad esempio, Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Appendice B: Quantificazione e determinazione della concentrazione, resa e purezza dell'RNA totale

Quantificazione dell'RNA

La concentrazione di RNA deve essere determinata misurando l'assorbanza a 260 nm (A_{260}) con uno spettrofotometro. Per garantire la significatività, le letture devono rientrare nel range di linearità dello spettrofotometro. L'assorbanza di 1 unità a 260 nm corrisponde a 44 µg di RNA per mL ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/mL}$). Questa relazione è valida solo per le misurazioni effettuate in 10 mM di pH 7,5.* Pertanto, se occorre diluire il campione di RNA, è necessario utilizzare 10 mM di Tris-HCl. Come illustrato di seguito (vedere "Purezza dell'RNA", pag. 78), il rapporto fra i valori di assorbanza a 260 e 280 nm fornisce una stima della purezza dell'RNA. Quando si misurano campioni di RNA, assicurarsi che le cuvette siano prive di RNasi. Per azzerare lo spettrofotometro, utilizzare un bianco contenente la stessa proporzione di tampone di eluizione (BR5) e tampone Tris-HCl presenti nel campione da misurare. Il tampone di eluizione (BR5) assorbe intensamente a 220 nm, e questo può portare ad alti valori di assorbanza di sfondo, se lo spettrofotometro non è stato azzerato correttamente. Di seguito è riportato un esempio per il calcolo relativo alla quantificazione dell'RNA.

Volume del campione di RNA	=	80 µL
Diluizione (1/15)	=	10 µL di campione di RNA + 140 µL 10 mM Tris-HCl, pH 7,5

Misurare l'assorbanza del campione diluito in una cuvetta (priva di RNasi).

A_{260}	=	0,3
-----------	---	-----

* Quando si utilizzano sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio adeguato, guanti monouso e occhiali di protezione. Per maggiori informazioni, consultare le schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

Concentrazione del campione di	=	$44 \times A_{260} \times \text{fattore di diluizione}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	$198 \mu\text{g/mL}$
Resa totale	=	concentrazione \times volume del campione in millilitri
	=	$198 \mu\text{g/mL} \times 0,08 \text{ mL}$
	=	$15,8 \mu\text{g RNA}$

Purezza dell'RNA

Il rapporto dei valori di assorbanza compresi tra 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}) rappresenta una misura per la purezza dell'RNA rispetto ai contaminanti che assorbono nell'UV, come le proteine. Tuttavia il rapporto A_{260}/A_{280} dipende notevolmente dal valore pH. Un pH relativamente basso genera un rapporto A_{260}/A_{280} relativamente basso e riduce la sensibilità rispetto alle contaminazioni proteiche.* Se sono necessari dati precisi e affidabili consigliamo di misurare l'assorbanza in 10 mM di Tris-HCl, pH 7,5. L'RNA puro ha un rapporto A_{260}/A_{280} pari a 1,8-2,2 in 10 mM di Tris-HCl, pH 7,5. Per azzerare lo spettrofotometro, utilizzare un bianco contenente la stessa proporzione di tampone di eluizione (BR5) e tampone Tris-HCl presenti nel campione da misurare. Il tampone di eluizione (BR5) assorbe intensamente a 220 nm, e questo può portare ad alti valori di assorbanza di sfondo, se lo spettrofotometro non è stato azzerato correttamente.

* 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.

Appendice C: Utilizzo delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Le seguenti istruzioni di BD forniscono indicazioni per l'uso delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Per ulteriori informazioni sull'impiego delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), consultare il manuale PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Istruzioni per rimuovere la chiusura BD Hemogard

1. Afferrare la PAXgene Blood RNA Tube (BRT) con una mano, disponendo il pollice sotto la chiusura BD Hemogard. (per maggiore stabilità, tenere il braccio su una superficie solida). Con l'altra mano ruotare la chiusura BD Hemogard e contemporaneamente spingere con il pollice verso l'alto finché il fermo della provetta non si allenta.
2. Allontanare il pollice prima di sollevare la chiusura. Non utilizzare il pollice per rimuovere la chiusura dalla PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Cautela: se la PAXgene Blood RNA Tube (BRT) contiene sangue, esiste un rischio di infezione. Per evitare lesioni durante la rimozione della chiusura, è importante che il pollice utilizzato per spingerla verso l'alto non venga in contatto con la PAXgene Blood RNA Tube (BRT) quando la chiusura BD Hemogard viene allentata.
3. Sollevare la chiusura dalla PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Se, come accade di rado, la schermatura in plastica si separa dal fermo in gomma, non riassemblare la chiusura. Rimuovere con cautela il fermo in gomma dalla PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Istruzioni per inserire la chiusura secondaria BD Hemogard

1. Riposizionare la copertura sulla PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Ruotare e spingere verso il basso con decisione, finché non si blocca in posizione. Il reinserimento completo del fermo è necessario affinché la chiusura rimanga bloccata in posizione sulla PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante la manipolazione.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Indice	N. cat.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, Processing Tubes, RNase-Free DNase I, RNase-Free Reagents e Buffers. Da utilizzare con le PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 provette per il prelievo di sangue	762165
Prodotti correlati che possono essere ordinati presso QIAGEN per l'estrazione dell'RNA in automatico su QIAcube		
Starter Pack, QIAcube	La confezione reagent bottle racks (3); rack labeling strips (8); 200 µL filter-tips (1024); 1000 µL filter-tips (1024); 1000 µL filter-tips, wide-bore (1024); 30 mL reagent bottles (18); rotor adapters (240); rotor adapter holder	990395
Filter-Tips, 1000 µL (1024)	Disposable filter-tips, sterili, su rack	990352
Reagent Bottles, 30 mL (6)	Flaconi per reagenti (30 mL) con tappi; confezione da 6; per l'uso con QIAcube reagent bottle rack	990393
Rotor Adapters (10 × 24)	Per 240 preparazioni: 240 adattatori per rotore monouso; per l'uso con QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Rack per flaconi per reagenti da 6 × 30 mL sul tavolo di lavoro QIAcube	9026197
Rotor Adapter Holder	Supporto per 12 adattatori di rotore monouso, per l'uso con QIAcube	990392
Prodotti correlati che possono essere ordinati presso BD per il prelievo ematico con PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)*		
BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set	Ago cannula 21 G, 0,75 pollici (0,8 × 19 mm), tubo da 12 pollici (305 mm) con adattatore luer; 50 in ogni scatola, 200 in ogni confezione	367286/367281

Prodotto	Indice	N. cat.
BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set	Ago cannula 21G da 3/4 di pollice (0,8 × 19 mm), tubo da 12 pollici (305 mm) con adattatore luer. 50/scatola, 200/confezione	367344
BD Vacutainer One-Use Holder	Contenitore solo per diametro di 13 mm e 16 mm; 1.000/confezione	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 × 75 mm, per prelievo da 4,0 mL, con chiusura di sicurezza BD Hemogard rossa e con etichetta in carta; 100/scatola, 1.000/confezione	368975/367812
BD Vacutainer EST Tube	13 × 75 mm, per prelievo da 3,0 mL, con chiusura di sicurezza BD Hemogard trasparente e con etichetta trasparente; 100/scatola, 1.000/confezione	362725
BD Vacutainer No Additive (Z) Tube	13 × 75 mm, per prelievo da 3,0 mL, con chiusura di sicurezza BD Hemogard trasparente e con etichetta in carta; 100/scatola, 1.000/confezione	366703

* Questi accessori per il prelievo di sangue rappresentano tipici prodotti che possono essere usati con le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Per saperne di più su questi accessori, incluso come ordinarli, visitare www.preanalytix.com.

Cronologia delle revisioni del documento

Data	Modifiche
[R1] aprile 2022	Versione iniziale IVDR
[R2] febbraio 2023	L'indirizzo di PreAnalytiX GmbH è stato modificato da "Feldbachstrasse" a "Garstligweg 8". Aggiunti prodotti BD in Informazioni sugli ordini. Aggiornate le informazioni sulla sicurezza.

Note



Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti, consultare il rispettivo manuale del kit o il manuale utente PreAnalytiX o QIAGEN. I manuali dei kit e i manuali operatore PreAnalytiX e QIAGEN sono disponibili sul sito www.preanalytix.com e www.qiagen.com oppure possono essere richiesti ai servizi tecnici QIAGEN o al proprio distributore locale.

**Better samples
More to explore**

 **PreAnalytiX**
A QIAGEN / BD Company

Maggiori informazioni all'indirizzo: www.preanalytix.com

HB-3009-002 02/2023