

Februar 2023

PAXgene[®] Blood RNA Kit (Handbuch) Gebrauchsanweisung



Version 3 (V3)

IVD

In-vitro-Diagnostikum



REF

762174



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

Von QIAGEN[®] GmbH für PreAnalytiX GmbH hergestellt

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, DEUTSCHLAND

R2

MAT

1130774DE

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

PreAnalytiX GmbH, 8634 Hombrechtikon, CH.

© 2023 PreAnalytiX GmbH. Sofern nicht anders angegeben, sind PreAnalytiX, das PreAnalytiX Logo und alle anderen Marken Eigentum der PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH.

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für das PAXgene Blood RNA Kit

Mit der Verwendung dieses Produkts erkennen jegliche Käufer oder Benutzer des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen und nur mit den Komponenten, die im Panel mitgeliefert werden, verwendet werden. PreAnalytiX® gewährt im Rahmen ihrer Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zum Panel gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zum Panel gehören, zu verwenden oder zu kombinieren. Ausgenommen sind Anwendungen, wie sie in den mit diesem Produkt und in diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen sowie in zusätzlichen, im Internet unter www.qiagen.com und www.preanalytix.com verfügbaren Protokollen beschrieben sind.
2. Mit Ausnahme der ausdrücklich genannten Lizenzen übernimmt PreAnalytiX keine Garantie, dass dieses Kit und/oder seine Verwendung(en) keine Rechte Dritter verletzen.
3. Dieses Kit ist für die einmalige Verwendung lizenziert und darf nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. Mit Ausnahme der ausdrücklich angegebenen Lizenzen erkennt PreAnalytiX keine anderen genannten oder implizierten Lizenzen an.
5. Käufer und Nutzer des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen oder solche erleichtern könnten.
6. PreAnalytiX kann die Verbote dieser beschränkten Lizenzvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Lizenzvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder seinen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Lizenzbedingungen finden Sie im Internet unter www.qiagen.com und www.preanalytix.com.

HB-3009-002 BD-8945 1130774DE © 2023 PreAnalytiX GmbH, alle Rechte vorbehalten.

PreAnalytiX Händler

PreAnalytiX Produkte werden von QIAGEN und BD für PreAnalytiX hergestellt und vertrieben.

Inhalt

Inhalt.....	3
Verwendungszweck	6
Vorgesehene Anwender	6
Beschreibung und Prinzip	7
Einleitung	7
Prinzip und Anwendung	7
Probennahme und Stabilisierung.....	8
RNA-Isolierung.....	8
Manuelle RNA-Isolierung	9
Automatische RNA-Isolierung	11
Im Lieferumfang enthaltene Materialien	14
Kit-Inhalt	14
Bestandteile des Kits	15
Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien	16
Für alle Protokolle	16
Für das manuelle Protokoll	17
Für das automatische Protokoll.....	17
Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen	19
Sicherheitshinweise	19
Informationen für Notfälle.....	20
Vorsichtsmaßnahmen	20
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	23

Stabilität nach dem Öffnen.....	23
Entnahme, Lagerung und Handhabung von Proben	24
Protokoll: Manuelle Isolierung von Gesamt-RNA aus humanem Vollblut, das in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen wurde	25
Protokoll: Automatische Isolierung von Gesamt-RNA aus humanem Vollblut, das in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen wurde	34
Anwendungseinschränkungen.....	42
Qualitätskontrolle.....	42
Leistungsmerkmale	43
Probennahme und Stabilisierung.....	43
Manuelle RNA-Isolierung	48
Automatische RNA-Isolierung	56
Stabilität der isolierten RNA	59
Wichtige Hinweise.....	60
Verwendung des QIAcube Connect MDx.....	60
Starten des QIAcube Connect MDx.....	60
Installieren von Protokollen auf dem QIAcube Connect MDx	62
Beladen des QIAcube Connect MDx.....	63
Spin-Säulen (PSC, PRC), MCT und Kunststoffartikel für den QIAcube Connect MDx....	66
Entsorgung	72
Literaturhinweise.....	73
Hilfe zur Fehlerbehebung.....	74
Symbole	76
Kontakt	78

Anhang A: Allgemeine Hinweise zur Handhabung von RNA	79
Anhang B: Quantifizierung und Qualitätsbestimmung der Gesamt-RNA	81
Anhang C: Handhabung der PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	83
Bestellinformationen	85
Revisionsverlauf des Dokuments	87

Verwendungszweck

In-vitro-Diagnostikum

Das PAXgene Blood RNA System besteht aus einem Blutentnahmeröhrchen (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) und einem Kit zur Nukleinsäureaufreinigung (PAXgene Blood RNA Kit). Es ist für die Entnahme, die Aufbewahrung und den Transport von Blut und zur Stabilisierung der intrazellulären RNA in einem geschlossenen Röhrchen und die anschließende Isolierung und Aufreinigung der Wirts-RNA aus Vollblut zur Verwendung in der in der Molekulardiagnostik angewandten RT-PCR vorgesehen.

Die in diesem Handbuch angegebenen Leistungsmerkmale des PAXgene Blood RNA Systems gelten nur für Transkripte der FOS- und IL1B-Gene. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, entsprechende Leistungsmerkmale des PAXgene Blood RNA Systems für andere Zieltranskripte zu erstellen.

Anwendungsgebiete

Das PAXgene Blood RNA Kit dient der Aufreinigung intrazellulärer RNA aus Vollblut, das in PAXgene Blood RNA Tube (BRT) entnommen wurde. Mit dem System, bestehend aus Kit und PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), erhalten Sie aus Vollblut aufgereinigte intrazelluläre RNA zur RT-PCR bei molekulardiagnostischen Tests.

Vorgesehene Anwender

Das Produkt darf nur von sachkundigen Personen, z. B. technischen Angestellten und Ärzten, die in der In-vitro-Diagnostik geschult sind, verwendet werden.

Dieses Kit ist für die Anwendung durch Fachkräfte vorgesehen.

Beschreibung und Prinzip

Einleitung

Der erste Schritt bei vielen molekularbiologischen Assays zellulärer RNA ist die Entnahme von Vollblut. Ein Hauptproblem bei solchen Experimenten ist jedoch die Instabilität des zellulären RNA-Profiles in vitro. Untersuchungen bei PreAnalytiX haben gezeigt, dass sich die Kopienzahl für einzelne mRNA-Spezies in Vollblut bei Lagerung oder Transport bei Raumtemperatur um mehr als das 1.000-fache verändern kann (Rainen et al., 2002). Ursache dafür ist zum einen der rasche Abbau der RNA und zum anderen die induzierte Expression bestimmter Gene, nachdem das Blut entnommen wurde. Durch solche Veränderungen im RNA-Expressionsprofil werden zuverlässige Ergebnisse bei Genexpressionsstudien unmöglich. Eine Methode zur Erhaltung des RNA-Expressionsprofils während und nach der Blutentnahme ist daher essenziell für genaue Analysen der Genexpression in humanem Vollblut.

Prinzip und Anwendung

PreAnalytiX hat ein System entwickelt, das Entnahme, Stabilisierung, Lagerung und Transport menschlicher Vollblutproben ermöglicht und zugleich ein schnelles und effizientes Protokoll zur Isolierung intrazellulärer RNA bereitstellt. Das System besteht aus den PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zur Blutentnahme und gleichzeitigen RNA-Stabilisierung und dem PAXgene Blood RNA Kit, mit dem anschließend eine manuelle oder automatische RNA-Isolierung durchgeführt wird. Sowohl das manuelle als auch das automatische Protokoll stellen eine vergleichbare Leistung in Bezug auf RNA-Qualität und -Ausbeute bereit. Die Leistungsdaten für das manuelle Protokoll (siehe Seite 48) und für das automatische Protokoll (siehe Seite 56) sind in diesem Handbuch enthalten.

Das PAXgene Blood RNA System ermöglicht die Standardisierung der präanalytischen Arbeitsablaufschritte von der Blutentnahme bis zur zellulären RNA-Isolierung gemäß ISO 20186-1:2019, Molecular in-vitro-diagnostic examinations – Specifications for pre-examination processes for venous whole blood – Part 1: Isolated cellular RNA.

Probennahme und Stabilisierung

Die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) enthalten ein proprietäres RNA-Stabilisierungsreagenz. Dieser Zusatz schützt RNA-Moleküle vor Abbau durch RNasen und minimiert Ex-vivo-Veränderungen der Genexpression. Die Leistungsmerkmale des PAXgene Blood RNA Systems wurden mit FOS- und IL1B-Gentranskripten bestimmt, die ab Seite 43 eingesehen werden können.

RNA-Isolierung

Das PAXgene Blood RNA Kit ist für die Isolierung von Gesamt-RNA aus 2,5 ml humanem Vollblut vorgesehen, das in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen wurde. Das Verfahren ist einfach und kann mit dem manuellen oder dem automatischen Verfahren durchgeführt werden (siehe Abbildung 1 und Abbildung 3, Seite 10 bzw. 12). Bei beiden Protokollen beginnt die Isolierung mit einem Zentrifugationsschritt, um die Nukleinsäuren in dem PAXgene Blood RNA Tube (BRT) zu pelletieren. Das Pellet wird dann gewaschen und resuspendiert, anschließend erfolgt die manuelle oder automatische RNA-Isolierung. Im Prinzip folgen beide Protokollen denselben Protokollschritten mit denselben Kit-Komponenten.

Manuelle RNA-Isolierung

Im Einzelnen wird das resuspendierte Pellet zunächst in optimierten Puffern mit Proteinase K (PK) inkubiert, um Proteine zu verdauen. Eine weitere Zentrifugation durch eine PAXgene Shredder Spin Column (PSC) dient dem Homogenisieren des Zellysats und dem Entfernen restlicher Zelltrümmer. Der Überstand der Durchflussfraktion wird in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen (Microcentrifuge Tube, MCT) überführt. Mit dem dann zugegebenen Ethanol werden optimale Bindungsbedingungen eingestellt, und das Lysat wird auf eine PAXgene RNA Spin Column (PRC) gegeben. Während einer kurzen Zentrifugation bindet RNA selektiv an die PAXgene Silikamembran, während Kontaminationen passieren. Restliche Kontaminationen werden in mehreren effizienten Waschschritten entfernt. Zwischen dem ersten und dem zweiten Waschschrift wird die Membran mit DNase I (RNFD) behandelt, um Spuren gebundener DNA zu entfernen. Nach den Waschschritten wird die RNA in Elutionspuffer (BR5) eluiert und durch Hitze denaturiert. Die Leistungsmerkmale der manuellen RNA-Isolierung mit dem PAXgene Blood RNA System sind auf Seite 48 angegeben.

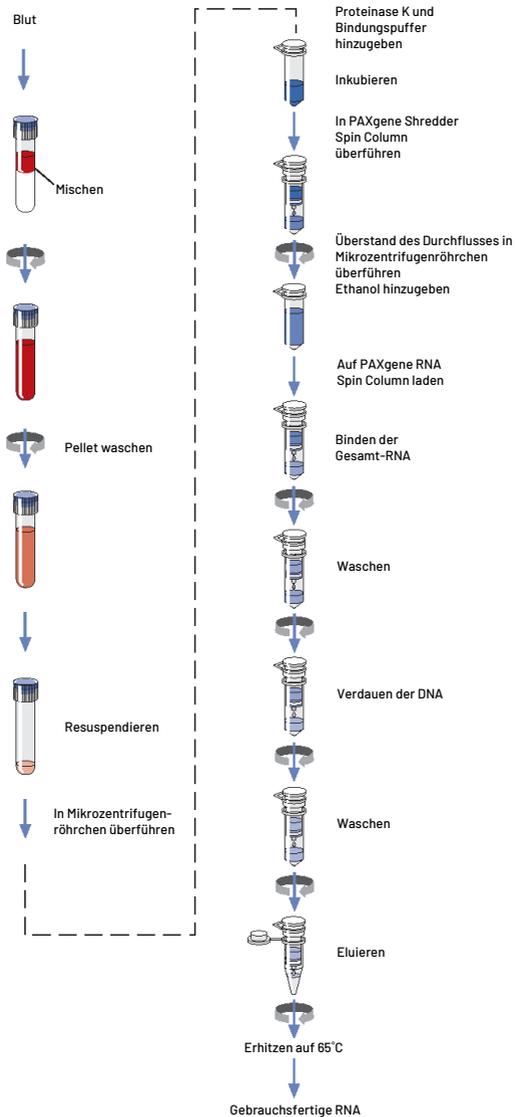


Abbildung 1: Das manuelle PAXgene Blood RNA Verfahren.

Automatische RNA-Isolierung

Die Isolierung von Blut-RNA erfolgt auf dem QIAGEN QIAcube Connect MDx automatisiert. Die innovative Gerät nutzt eine fortgeschrittene Technologie zur Verarbeitung von QIAGEN Spin-Säulen und ermöglichen so die nahtlose Integration einer automatischen Probenvorbereitung mit geringem Durchsatz in den Arbeitsablauf des Labors. Die Probenvorbereitung mit dem QIAcube Connect MDx umfasst die gleichen Schritte wie das manuelle Verfahren (d. h. Lysieren, Binden, Waschen und Eluieren) und kann mit demselben PAXgene Blood RNA Kit durchgeführt werden.



Abbildung 2: QIAcube Connect MDx.



Der QIAGEN QIAcube Connect MDx ist nicht in allen Ländern erhältlich. Wenden Sie sich für weitere Informationen bitte an den Technischen Service von QIAGEN.

Das automatische RNA-Isolierprotokoll besteht aus 2 Teilen (oder Protokollen), dem „PAXgene Blood RNA Part A“ (vom Blut im PAXgene Blood RNA Tube bis zum Eluieren) und dem „PAXgene Blood RNA Part B“ (vom Eluieren bis zur gebrauchsfertigen RNA), sowie einem kurzen manuellen Arbeitsschritt zwischen den beiden Teilen (siehe Abbildung 3).

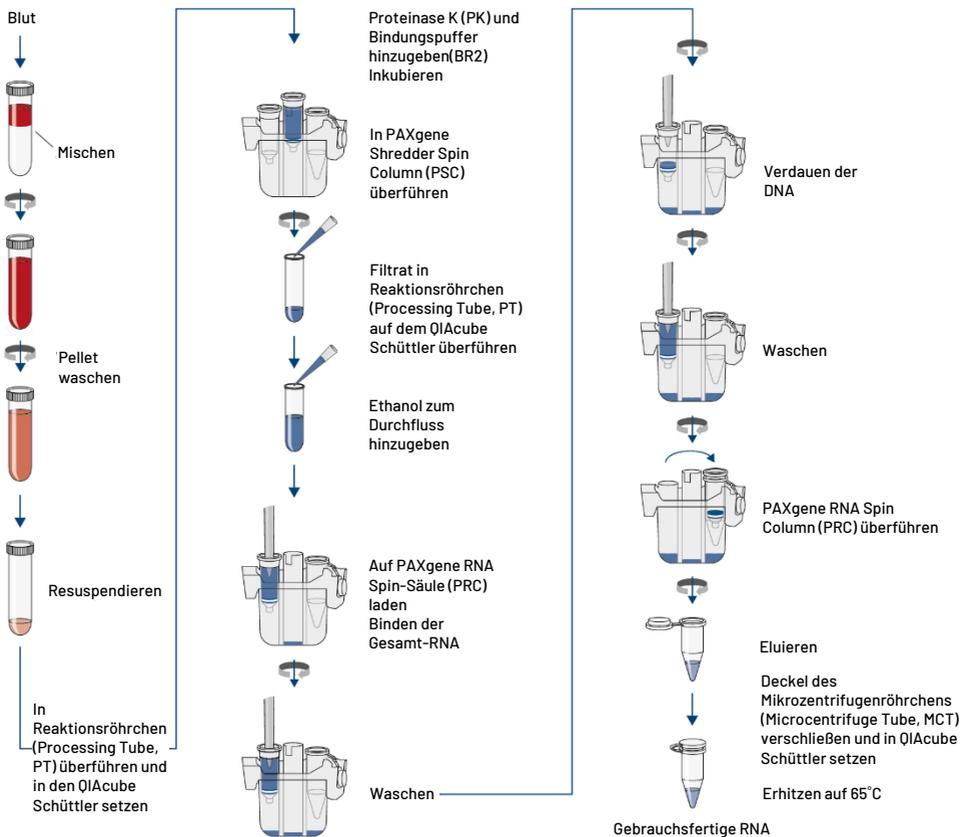


Abbildung 3: Das PAXgene Blood RNA Protokoll (automatisches Verfahren).

Das zentrifugierte, gewaschene und resuspendierte Nukleinsäure-Pellet (siehe „RNA-Isolierung“, Seite 8) wird aus dem PAXgene Blood RNA Tube (BRT) in Reaktionsröhrchen (Processing Tubes, PTs) überführt, die dann in den Thermoschüttler auf die Arbeitsplattform des QIAcube Connect MDx gestellt werden. Der Anwender wählt das Protokoll „PAXgene Blood RNA Part A“ aus dem Menü aus und startet es. Der QIAcube Connect MDx führt dann alle Protokollschritte bis zur Elution der RNA in Elutionspuffer (BR5) durch. Der Anwender überführt die Mikrozentrifugenröhrchen (Microcentrifuge Tubes, MCTs) mit der aufgereinigten RNA in den Thermoschüttler des QIAcube Connect MDx. Der Anwender wählt das Protokoll „PAXgene Blood RNA Part B“ aus dem Menü aus und startet es, und das QIAcube Connect MDx führt eine Hitzedenaturierung durch. Die Leistungsmerkmale der automatischen RNA-Isolierung mit dem PAXgene Blood RNA System auf dem QIAcube Connect MDx sind auf Seite 56 angegeben.

Im Lieferumfang enthaltene Materialien

Kit-Inhalt

PAXgene Blood RNA Kit Katalog-Nr. Anzahl Entnahmeröhrchen			(50) 762174 50
Name der Komponente	Beschreibung	Symbol	Menge
BR1	Resuspension Buffer (Resuspendierungspuffer)	RES BUF	20 ml
BR2	Bindungspuffer*	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (Waschpuffer 1)*	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (Waschpuffer 2, Konzentrat) [†]	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Elutionspuffer)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (RNase-freies Wasser, Flasche)	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (grüner Deckel)	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (PAXgene RNA Spin-Säulen, rot) [‡]	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (Reaktionsröhrchen, 2 ml) [§]	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard™	Secondary BD Hemogard Closures (sekundäre BD Hemogard-Deckel)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (Mikrozentrifugenröhrchen, 1,5 ml) [§]	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (DNase I, RNase-frei, lyophilisiert)	DNA REM	1.500 Kunitz-Einheiten [¶]
RDD	DNA Digestion Buffer (DNA-Verdaupuffer, weißer Deckel)	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (DNase-Resuspendierungspuffer, Röhrchen, lila Deckel)	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (PAXgene Shredder Spin-Säulen, lila) [‡]	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Handbuch	PAXgene Blood RNA Kit Handbook (PAXgene Blood RNA Kit Handbuch, Version 3)		1

* Nicht mit Desinfektionsmitteln in Kontakt bringen, die Bleiche enthalten. Enthält ein Guanidinsalz.
Zu Sicherheitshinweise siehe Seite 19.

† Waschpuffer 2 (BR4) wird als Konzentrat geliefert. Vor der ersten Verwendung geben Sie, wie auf der Flasche angegeben, das 4-fache Volumen Ethanol (96-100 % v/v, Reinheitsgrad p.a.) hinzu, um eine gebrauchsfertige Arbeitslösung herzustellen.

‡ Jede Säule ist in einem Blister verpackt, der nur zur Einmalverwendung vorgesehen ist. Beachten Sie die Sicherheitshinweise zur Entsorgung.

§ Die Röhrchen sind in Kunststoffbeuteln erhältlich und jedes Röhrchen ist nur für den Einmalgebrauch vorgesehen. Beachten Sie die Sicherheitshinweise zur Entsorgung.

¶ Die Kunitz-Einheit ist die gebräuchliche Maßeinheit zur Bestimmung der DNase-I-Aktivität, die definiert ist als die Menge DNase I, die bei Verwendung einer hochpolymerisierten DNA als Substrat zu einer Zunahme der Absorption bei 260 nm (A_{260}) von 0,001 pro Minute und Milliliter bei 25 °C und pH 5,0 führt (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* 33, 349 und 363).

Bestandteile des Kits

Name der Komponente	Beschreibung	Aktiver Inhaltsstoff	Konzentration
BR1	Resuspension Buffer (Resuspendierungspuffer)	Keine	-
BR2	Binding Buffer (Bindungspuffer)	Guanidinthiocyanat	≥ 30 bis < 50 % w/w
BR3	Wash Buffer 1 (Waschpuffer 1)	Guanidinthiocyanat Ethanol	≥ 10 bis < 20 % w/w ≥ 3 bis < 10 % w/w
BR4	Wash Buffer 2 (Waschpuffer 2, Konzentrat)	Keine	-
BR5	Elution Buffer (Elutionspuffer)	Keine	-
RNFW	RNase-Free Water (RNase-freies Wasser, Flasche)	Keine	-
PK	Proteinase K (grüner Deckel)	Proteinase K	≥ 1 bis < 3 % w/w
RNFD	DNase I, RNase-free (DNase I, RNase-frei, lyophilisiert)	DNase	≥ 90 bis ≤ 100 % w/w
RDD	DNA Digestion Buffer (DNA-Verdaupuffer, weißer Deckel)	Keine	-
DRB	DNase Resuspension Buffer (DNase-Resuspendierungspuffer, Röhrchen, lila Deckel)	Keine	-

Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen sind den relevanten Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS) zu entnehmen, die Sie vom jeweiligen Produkthersteller beziehen können.

Für alle Protokolle

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; PreAnalytiX; Kat.-Nr. 762165)
- Ethanol (96–100 % v/v, Reinheitsgrad p. a.)
- Pipetten* (10 µl – 4 ml)
- Sterile, RNase-freie Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere[†]
- Messzylinder[‡]
- Zentrifuge*, die 3.000–5.000 g erreichen kann und mit einem Ausschwingbecher für PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ausgestattet ist
- Vortexmischer*
- Zerstoßenes Eis
- Stift für dauerhafte, wasserfeste Beschriftung

* Stellen Sie sicher, dass die Vorrichtungen und Geräte regelmäßig und gemäß den Herstellerempfehlungen überprüft, gewartet und kalibriert werden.

[†] Stellen Sie sicher, dass Sie mit den Richtlinien zur Handhabung von RNA (Anhang A auf Seite 75) vertraut sind.

[‡] Für die Zugabe von Ethanol zum Pufferkonzentrat BR4.

Für das manuelle Protokoll

- Mikrozentrifuge* mit variabler Geschwindigkeit, die mindestens 1.000–8.000 *g* erreichen kann, obwohl niedrigere und höhere *g*-Kräfte erforderlich sein können (siehe Details in den Protokollschritten), und mit einem Rotor für 2-ml-MTCs ausgestattet ist
- Schüttelinkubator* für Inkubationen bei 55 °C und 65 °C und Schütteln mit ≥ 400 U/min, aber nicht schneller als 1.400 U/min (z. B. Eppendorf® Thermomixer Compact oder vergleichbar)

Für das automatische Protokoll

- Schere
- QIAcube Connect MDx* (QIAGEN, Kat.-Nr. 9003070)

QIAcube Connect MDx Verbrauchsartikel:

- Filter-Tips, 1.000 μ l (1024) (QIAGEN, Kat.-Nr. 990352)[†]
- Reagent Bottles, 30 mL (6) (QIAGEN, Kat.-Nr. 990393)[†]
- Rotor Adapters (10 \times 24) (QIAGEN, Kat.-Nr. 990394)[†]

QIAcube Connect MDx Zubehör:

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, Kat.-Nr. 990392)[†]

* Stellen Sie sicher, dass Vorrichtung und Gerät regelmäßig und gemäß den Herstellerempfehlungen überprüft, gewartet und kalibriert werden.

[†] Auch enthalten im Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, Kat.-Nr. 990395)

QIAcube Connect MDx Servicepakete:

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

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

Kunden in der Europäischen Union: Bitte beachten Sie, dass Sie verpflichtet sind, schwerwiegende Vorkommnisse, die im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten sind, dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedsstaates, in welchem der Anwender und/oder der Patient ansässig ist, zu melden.

Kunden außerhalb der Europäischen Union: Bitte beachten Sie, dass Sie ggf. verpflichtet sind, Ihre lokalen Vorschriften zu konsultieren, um schwerwiegende Vorfälle, die im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten sind, an den Hersteller, seinen autorisierte Vertreter und die Regulierungsbehörde, welcher der Anwender und/oder der Patient unterliegt, zu melden.

Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien und biologischen Gefahrenstoffen stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Handschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS). In unserer Online-Sammlung der Sicherheitsdatenblätter unter **www.qiagen.com/safety** finden Sie zu jedem QIAGEN Kit und zu jeder Kit-Komponente das jeweilige SDS als praktische und kompakte PDF-Datei, die Sie einsehen und ausdrucken können.

- Alle chemischen und biologischen Materialien sind potenziell gefährlich. Blutproben und Proben sind potenziell infektiös und müssen als biologische Gefahrenstoffe behandelt werden.
- Biologisch gefährliche Abfälle und Kit-Abfälle sind gemäß den lokalen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.

Informationen für Notfälle

CHEMTREC

Außerhalb der USA und Kanada +1 703 527-3887

Vorsichtsmaßnahmen

Bei der Arbeit mit Blut sind allgemeine Vorsichtsmaßnahmen zu beachten, um das Risiko einer möglichen Exposition gegenüber durch Blut übertragenen Erregern (z. B. HIV, Hepatitis B und andere durch Blut übertragene Viren) zu vermeiden. Verwenden Sie Handschuhe, Schutzkittel, Augenschutz und andere persönliche Schutzausrüstungen sowie technische Maßnahmen, um sich vor Kontakt mit Blut zu schützen. Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS). Diese sind im praktischen und kompakten PDF-Format online verfügbar unter www.preanalytix.com, wo Sie die SDS zu diesem Kit finden, einsehen und ausdrucken können.

VORSICHT



GEBEN SIE KEINE Chlorbleiche oder sauren Lösungen direkt in den Probenvorbereitungsabfall.

Bindungspuffer (BR2) und Waschpuffer 1 (BR3) enthalten Guanidinisothiocyanat, das bei Kontakt mit Chlorbleiche hochreaktive Verbindungen ausbilden kann. Wenn Bindungspuffer (BR2) oder Waschpuffer 1 (BR3) verschüttet werden, reinigen Sie mit einem geeigneten Labordetergens und Wasser. Wenn Flüssigkeit mit potenziell infektiösen Agenzien verschüttet wird, reinigen Sie die betroffene Fläche zuerst mit Labordetergens und Wasser und danach mit 1% (v/v) Natriumhypochlorit (Bleichmittel).

Die RNA-Stabilisierungslösung und die Blutflüssigkeit aus dem PAXgene Blood RNA Tube (BRT) können durch Zugabe von 1 Volumenteil Industriebleichlösung (5 % Natriumhypochlorit) pro 9 Volumenteile RNA-Stabilisierungslösung bzw. Blutflüssigkeit desinfiziert werden.

Probenvorbereitungsabfall, beispielsweise Überstände nach Zentrifugationsschritten während der RNA-Isolierung, müssen stets als potenziell infektiös angesehen werden. Verwenden Sie zur Entsorgung biologischer Materialien Behälter für biologische Gefahrstoffe. Die Entsorgung muss gemäß den örtlichen Vorschriften und Verfahren Ihrer Einrichtung erfolgen.

Spezifische Komponenten des PAXgene Blood RNA Kits sind nur für den Einmalgebrauch bestimmt. Informationen zu den einzelnen Komponenten siehe Kit-Inhalt auf Seite 14.

Die folgenden Gefahren- und Sicherheitssätze gelten für die Komponenten des PAXgene Blood RNA Kits. Sicherheitshinweise zu den PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) finden Sie im *PAXgene Blood RNA Tube Handbuch*.

Buffer BR2



Enthält: Guanidinisothiocyanat. Gefahr! Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt oder Einatmen. Verursacht schwere Augenschäden. Schädlich für Wasserorganismen mit langfristigen Auswirkungen. Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase. Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Schutzhandschuhe/ Schutzbekleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. Bei Exposition oder falls betroffen: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. Inhalt/Behälter einer zugelassenen Entsorgungsanlage zuführen.

Buffer BR3



Enthält: Ethanol; Guanidinisothiocyanat. Gefahr! Flüssigkeit und Dampf entflammbar. Verursacht schwere Augenschäden. Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase. Von Hitze/Funken/offenen Flammen/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen. Schutzhandschuhe/ Schutzbekleidung/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

DNase I



Enthält: DNase. Gefahr! Kann allergische Hautreaktionen verursachen. Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen. Staubeinatmen vermeiden. Schutzhandschuhe/ Schutzbekleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Atemschutz tragen. Bei Exposition oder falls betroffen: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Die PAXgene RNA Spin Columns (PRC) und PAXgene Shredder Spin Columns (PSC) sowie die Proteinase K (PK) und alle Puffer (BR1, BR2, BR3, BR4 und BR5) müssen trocken und bei der auf dem Kit-Etikett angegebenen Temperatur gelagert werden.

Das RNase-Free DNase Set, welches DNase I (RNFD), DNA-Verdauopuffer (RDD) und DNase-Resuspendierungspuffer (DRB) enthält, wird bei Raumtemperatur versandt. Lagern Sie alle Komponenten des RNase-Free DNase Sets sofort nach Lieferung bei der auf dem Etikett angegebenen Temperatur. Bei ordnungsgemäßer Lagerung unter diesen Bedingungen sind die Kits bis zum Haltbarkeitsdatum, das auf der Kit-Verpackung angegeben ist, haltbar.

Die auf der Kit-Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten des Kits aufgedruckten Verfallsdaten und Lagerbedingungen sind zu beachten. Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.

Stabilität nach dem Öffnen

Die Reagenzien sind nach der ersten Verwendung des Kits in den Originalflaschen und bei den auf dem Kit-Verpackungsetikett angegebenen Temperaturen bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Die in die Reagenzflaschen des QIAcube Connect MDx gefüllten Reagenzien sind bei Raumtemperatur (15–25 °C) 3 Monate lang haltbar.

Rekonstituierte DNase I (RNFD) ist in dem Original-Glasfläschchen (Stammlösung) bei 2–8 °C 6 Wochen lang haltbar.

Aliquote der Stammlösung für den Einmalgebrauch in 1,5-ml-MCTs (im Lieferumfang des Kits enthalten) sind bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 9 Monate lang haltbar. Nach dem Auftauen sind die Aliquote für den Einmalgebrauch bei $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 6 Wochen lang stabil.

Entnahme, Lagerung und Handhabung von Proben

Das PAXgene Blood RNA Kit ist für die Verwendung mit Blut vorgesehen, das in PAXgene Blood RNA Tubes entnommen wurde. Das Blut muss in die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) gemäß den Anweisungen im PAXgene Blood RNA Tube Handbuch entnommen werden. Im Anhang C (auf Seite 83) finden Sie bei Bedarf Empfehlungen zur Handhabung der PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Alle Proben sind als potenziell gefährlich zu behandeln. Die Leistungsmerkmale des PAXgene Blood RNA Systems wurden mit Transkripten der FOS- und IL1B-Gene bestimmt, die auf den Seiten 44–47 eingesehen werden können.

Protokoll: Manuelle Isolierung von Gesamt-RNA aus humanem Vollblut, das in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen wurde

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Vergewissern Sie sich, dass die Verpackung des Kits intakt und unbeschädigt ist und die Puffer nicht ausgelaufen sind. Verwenden Sie kein beschädigtes Kit.
- Überprüfen Sie bei Verwendung einer Pipette, ob das korrekte Volumen eingestellt ist und die Flüssigkeit vorsichtig und vollständig angesaugt und abgegeben wird.
- Um zu vermeiden, dass Proben in ein falsches Röhrchen oder eine falsche Spin-Säule überführt werden, stellen Sie sicher, dass alle Röhrchen und Spin-Säulen sachgerecht mit einem geeigneten wasserfesten Stift beschriftet sind. Beschriften Sie jeweils den Deckel und das Röhrchen (Processing Tube, PT; Microcentrifuge Tube, MCT). Beschriften Sie für Spin-Säulen das jeweilige PT. Verschließen Sie jedes Röhrchen oder jede Spin-Säule, nachdem Sie die Flüssigkeit hineingegeben haben.
- Während der Verarbeitung verschüttete Proben und Puffer können die Ausbeute und die Reinheit der RNA beeinträchtigen.
- Wenn nicht anders angegeben, müssen alle Protokollschritte einschließlich der Zentrifugationsschritte bei Raumtemperatur (15-25°C) durchgeführt werden.

Wegen der Sensitivität der Nukleinsäure-Amplifikationstechnik, sind die folgenden Vorsichtsmaßnahmen bei der Probenhandhabung nötig, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden:

- Pipettieren Sie die Probe vorsichtig in die Spin-Säule (PSC, PRC), ohne den oberen Rand der Säule zu benetzen.
- Wechseln Sie zwischen den verschiedenen Pipettierschritten stets die Pipettenspitzen. Verwenden Sie Pipettenspitzen mit einer Aerosolbarriere.
- Vermeiden Sie es, mit der Pipettenspitze die Membran in der Spin-Säule (PSC, PRC) zu berühren.
- Zentrifugieren Sie das Mikrozentrifugenröhrchen (Microcentrifuge Tube, MCT) nach dem Mischen auf dem Vortexer oder dem Erhitzen kurz, um Tropfen von der Deckelinnenseite zu entfernen.
- Tragen Sie während der gesamten Verarbeitung Laborhandschuhe. Sollten Sie die Proben mit den Handschuhen berühren, müssen die Handschuhe sofort gewechselt werden.
- Verschließen Sie die Spin-Säulen (PSC, PRC), bevor Sie sie in die Mikrozentrifuge einsetzen. Zentrifugieren Sie wie im Verfahren beschrieben.
- Öffnen Sie stets nur eine Spin-Säule (PSC, PRC) und vermeiden Sie Aerosolbildung.
- Für eine effiziente Parallelverarbeitung vieler Proben füllen Sie ein Rack mit Reaktionsröhrchen (Processing Tube, PT), in welche die Spin-Säulen (PSC, PRC) nach der Zentrifugation überführt werden können. Entsorgen Sie die gebrauchten PTs, die Filtrat enthalten, und überführen Sie die Spin-Säulen (PSC, PRC) in neue PTs und anschließend zurück in die Mikrozentrifuge.

Vorbereitende Schritte

- Das Blut muss in die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) gemäß den Anweisungen im *PAXgene Blood RNA Tube Handbuch* entnommen werden. Im Anhang C (auf Seite 83) finden Sie bei Bedarf Empfehlungen zur Handhabung der PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

- Inkubieren Sie die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) nach der Blutentnahme mindestens 2 h lang bei Raumtemperatur, um eine vollständige Lyse der Blutzellen und Niederschlag der RNA sicherzustellen. Eine Inkubation der PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) über Nacht kann die Ausbeute erhöhen. Falls vor der Lagerung bei 2–8 °C, –20 °C oder –70 °C keine anfängliche Blutinkubation bei Raumtemperatur für 2 Stunden erfolgt ist, äquilibrieren Sie das PAXgene Blood RNA Tube (BRT) zunächst auf Raumtemperatur und inkubieren Sie es 2 Stunden lang bei dieser Temperatur, bevor Sie mit dem Verfahren beginnen.
- Lesen Sie die Sicherheitshinweise auf Seite 19.
- Lesen Sie auch die Richtlinien zur Handhabung von RNA (Anhang A auf Seite 79).
- Stellen Sie sicher, dass alle Geräte, wie z. B. Pipetten und Schüttelinkubator, regelmäßig gemäß den Empfehlungen des Herstellers überprüft und kalibriert werden.
- Für die Protokollschritte 5 und 20 wird ein Schüttelinkubator benötigt. Stellen Sie die Temperatur des Schüttelinkubators auf 55 °C ein.
- Im Bindungspuffer (BR2) kann sich beim Lagern ein Niederschlag bilden. Falls nötig, lösen Sie diesen durch Erwärmen auf 37 °C auf.
- Waschpuffer 2 (BR4) wird als Konzentrat geliefert. Vor der ersten Verwendung geben Sie, wie auf der Flasche angegeben, das 4-fache Volumen Ethanol (96–100 % v/v, Reinheitsgrad p.a.) hinzu, um eine gebrauchsfertige Arbeitslösung herzustellen.

- Bereiten Sie vor der erstmaligen Verwendung des RNase-Free DNase Sets eine DNase-I-Stammlösung vor. Lösen Sie die feste DNase I (RNFD; 1.500 Kunitz-Einheiten)* in 550 µl DNase-Resuspendierungspuffer (DRB) auf, der im Satz bereitgestellt wird. Achten Sie darauf, dass beim Öffnen des Fläschchens keine DNase I (RNFD) verloren geht. Die rekonstituierte DNase I (RNFD) darf nicht auf einem Vortexer gemischt werden. DNase I ist besonders anfällig für physikalische Denaturierung. Mischen Sie nur durch vorsichtiges Schwenken und Umdrehen des Fläschchens.
- Rekonstituierte DNase I (RNFD) kann bei 2–8 °C im Original-Fläschchen (Stammlösung) oder nach Entnahme der Stammlösung aus dem Glasfläschchen und Aufteilung in Aliquote für den Einmalgebrauch bei –20 °C gelagert werden. Verwenden Sie dazu die mit dem Kit gelieferten 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen, die ausreichend sind für 5 Aliquote. Aufgetaute Aliquote können bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Nach dem Auftauen dürfen die Aliquote nicht wieder eingefroren werden.
- Beachten Sie beim Rekonstituieren und Aliquotieren der DNase I (RNFD) die Richtlinien zur Handhabung von RNA (Anhang A auf Seite 79).

Verfahren

1. Zentrifugieren Sie PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 10 min lang bei 3.000 bis 5.000 g in einem Ausschwingrotor.



Stellen Sie sicher, dass die Blutproben in den PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zuvor mindestens 2 h lang bei Raumtemperatur (15–25 °C) inkubiert wurden, um eine vollständige Lyse der Blutzellen und Niederschlag der RNA zu erzielen.

* Die Kunitz-Einheit ist die gebräuchliche Maßeinheit zur Bestimmung der DNase-I-Aktivität, die definiert ist als die Menge DNase I, die bei Verwendung einer hochpolymerisierten DNA als Substrat zu einer Zunahme der Absorption bei 260 nm (A_{260}) von 0,001 pro Minute und Milliliter bei 25 °C und pH 5,0 führt (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 und 363).



Der Rotor muss Adapter für Rundbodenröhrchen enthalten. Bei Verwendung anderer Röhrchenadaptertypen können die Röhrchen während der Zentrifugation brechen.

2. Entfernen Sie den Überstand durch Dekantieren oder Pipettieren. Geben Sie 4 ml RNase-freies Wasser (RNFW) zum Pellet und verschließen Sie das Röhrchen mit einem neuen sekundären BD Hemogard-Deckel (im Kit mitgeliefert).

Wenn Sie den Überstand dekantieren, achten Sie darauf, dass das Pellet intakt bleibt, und trocknen Sie den Rand des Röhrchens mit einem sauberen Papiertuch ab.

3. Mischen Sie auf dem Vortexer, bis sich das Pellet sichtbar aufgelöst hat, und zentrifugieren Sie 10 min lang bei 3.000 bis 5.000 g in einem Ausschwingrotor. Entfernen und entsorgen Sie den ganzen Überstand.

Kleinere Zelltrümmer, die sich nach dem Vortexen, aber vor der Zentrifugation im Überstand befinden, stören die weitere Verarbeitung nicht.



Unvollständiges Entfernen des Überstands inhibiert die Lyse und verdünnt das Lysat und beeinträchtigt so die Bedingungen zum Binden der RNA an die PAXgene Membran.

4. Geben Sie 350 µl Resuspendierungspuffer (BR1) hinzu und mischen Sie auf dem Vortexer, bis sich das Pellet sichtbar aufgelöst hat.
5. Pipettieren Sie die Probe in ein 1,5-ml-MCT. Geben Sie 300 µl Bindungspuffer (BR2) und 40 µl Proteinase K (PK) hinzu. Mischen Sie ca. 5 s lang auf dem Vortexer und inkubieren Sie 10 min lang bei 55 °C in einem Schüttelinkubator bei 400-1400 U/min. Stellen Sie nach der Inkubation die Temperatur des Schüttelinkubators auf 65 °C ein (für Schritt 20).



Mischen Sie Bindungspuffer (BR2) und Proteinase K (PK) nicht, bevor Sie diese zur Probe hinzugeben.

6. Pipettieren Sie das Lysat direkt in eine Spin-Säule (PSC, lila), die sich in einem 2-ml-PT befindet, und zentrifugieren Sie 3 min lang bei maximaler Drehzahl (aber nicht mehr als 20.000 g).



Pipettieren Sie das Lysat vorsichtig in die Spin-Säule (PSC) und prüfen Sie, dass das Lysat sichtbar vollständig in die Spin-Säule (PSC) überführt wurde.

Zentrifugieren Sie nicht bei mehr als 20.000 g, um eine Beschädigung der Säulen (PSC) und Röhrchen (PT) zu vermeiden.



Manche Proben können ohne Zentrifugation durch das PSC fließen. Dies liegt an niedriger Viskosität mancher Probe und darf nicht als Hinweis auf einen Produktfehler verstanden werden.

- Überführen Sie den gesamten Überstand der Durchflussfraktion vorsichtig und ohne das Pellet in dem PT aufzuwirbeln in ein neues 1,5-ml-MCT.
- Geben Sie 350 µl Ethanol (96–100 % v/v, Reinheitsgrad p.a.) hinzu. Mischen Sie auf dem Vortexer und zentrifugieren Sie kurz (1–2 s bei 500–1.000 g), um Tropfen von der Deckelinnenseite des Röhrchens zu entfernen.



Länger als 1–2 s darf nicht zentrifugiert werden, da dies zum Pelletieren von Nukleinsäuren und damit zu reduzierten Ausbeuten an Gesamt-RNA führen kann.

- Pipettieren Sie 700 µl Probe in die PRC (rot), die sich in einem 2-ml-PT befindet, und zentrifugieren Sie 1 min lang bei 8.000 bis 20.000 g. Setzen Sie die Spin-Säule (PRC) in ein neues 2-ml-PT und entsorgen Sie das benutzte PT mit dem Durchfluss.
- Pipettieren Sie die verbliebene Probe in die PRC und zentrifugieren Sie 1 min lang bei 8.000 bis 20.000 g. Setzen Sie die Spin-Säule (PRC) in ein neues 2-ml-PT und entsorgen Sie das benutzte PT mit dem Durchfluss.



Pipettieren Sie die Probe vorsichtig in die Spin-Säule (PRC) und prüfen Sie, dass die Probe sichtbar vollständig in die Spin-Säule (PRC) überführt wurde.

- Pipettieren Sie 350 µl Waschpuffer 1 (BR3) in die PRC. Zentrifugieren Sie 1 min lang bei 8.000 bis 20.000 g. Setzen Sie die Spin-Säule (PRC) in ein neues 2-ml-PT und entsorgen Sie das benutzte PT mit dem Durchfluss.

12. Geben Sie 10 µl DNase-I-Stammlösung (RNFD) zu 70 µl DNA-Verdaupuffer (RDD) in einem 1,5-ml-MCT. Mischen Sie durch leichtes Anschneiden des Röhrchens und zentrifugieren Sie kurz, um Flüssigkeitsreste von den Gefäßwänden zu sammeln.

Für die Verarbeitung von beispielsweise 10 Proben geben Sie 100 µl DNase-I-Stammlösung (RNFD) zu 700 µl DNA-Verdaupuffer (RDD). Verwenden Sie die im Kit mitgelieferten 1,5-ml-MCTs.



DNase I ist besonders anfällig für physikalische Denaturierung. Mischen Sie nur durch vorsichtiges Anschneiden des Röhrchens. Verwenden Sie keinen Vortexer.

13. Pipettieren die DNase-I-Inkubationsmischung (80 µl) direkt auf die Membran in der PRC und inkubieren Sie 15 min lang bei 20–30 °C in der Tischzentrifuge.



Achten Sie darauf, dass die DNase-I-Inkubationsmischung (RNFD) direkt auf die Membran gelangt. Der DNase-Verdau ist unvollständig, wenn ein Teil der Mischung an die Wände oder auf den O-Ring der Spin-Säule (PRC) gelangt und dort haften bleibt.

14. Pipettieren Sie 350 µl Waschpuffer 1 (BR3) in die PRC und zentrifugieren Sie 1 min lang bei 8.000 bis 20.000 g. Setzen Sie die Spin-Säule (PRC) in ein neues 2-ml-PT und entsorgen Sie das benutzte PT mit dem Durchfluss.

15. Pipettieren Sie 500 µl Waschpuffer 2 (BR4) in die PRC und zentrifugieren Sie 1 min lang bei 8.000 bis 20.000 g. Setzen Sie die Spin-Säule (PRC) in ein neues 2-ml-PT und entsorgen Sie das benutzte PT mit dem Durchfluss.



Waschpuffer 2 (BR4) wird als Konzentrat geliefert. Stellen Sie sicher, dass vor der Verwendung Ethanol zum Waschpuffer 2 (BR4) gegeben wird (siehe „Vorbereitende Schritte“, Seite 26).

16. Geben Sie weitere 500 µl Waschpuffer 2 (BR4) in die PRC. Zentrifugieren Sie 3 min lang bei 8.000 bis 20.000 g.

17. Entsorgen Sie das PT mit dem Durchfluss und setzen Sie die PRC in ein neues 2-ml-PT. Zentrifugieren Sie 1 min lang bei 8.000 bis 20.000 g.

18. Entsorgen Sie das PT mit dem Durchfluss. Setzen Sie die PRC in ein 1,5-ml-MCT und pipettieren Sie 40 µl Elutionspuffer (BR5) direkt auf die PRC-Membran. Zentrifugieren Sie 1 min lang bei 8.000 bis 20.000 g, um die RNA zu eluieren. Um maximale Elutionseffizienz zu erzielen, ist es wichtig, die gesamte Membranfläche mit Elutionspuffer (BR5) zu benetzen.
19. Wiederholen Sie den Elutionsschritt (Schritt 18) wie beschrieben mit 40 µl Elutionspuffer (BR5) bei demselben MCT.
20. Inkubieren Sie das Eluat 5 min lang bei 65 °C im Schüttelinkubator (siehe Schritt 5), ohne zu schütteln. Kühlen Sie nach der Inkubation sofort auf Eis.



Durch die Inkubation bei 65 °C wird die RNA für nachfolgende Applikationen denaturiert. Lassen Sie diesen Protokollschritt auch dann nicht aus, wenn bei der nachfolgenden Applikation ein Hitzedenaturierungsschritt vorgesehen ist. Eine ausreichende RNA-Denaturierung zu diesem Zeitpunkt ist unbedingt erforderlich, um die maximale Effizienz der nachfolgenden Applikationen zu gewährleisten.

Überschreiten Sie weder Inkubationsdauer noch -temperatur.

21. Wenn die RNA-Proben nicht sofort verwendet werden, lagern Sie sie bei -20°C oder -70°C.

Da die RNA auch nach mehrmaligem Einfrieren und Auftauen denaturiert bleibt, ist es nicht nötig, die Inkubation bei 65 °C zu wiederholen. Beachten Sie die Anweisungen des Herstellers, wenn Sie die RNA-Proben für einen diagnostischen Assay verwenden.

Für eine genaue RNA-Quantifizierung durch Messung der Absorption bei 260 nm wird empfohlen, die Probe mit 10 mM Tris-HCl bei pH 7,5 zu verdünnen.*

* Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen sind den relevanten Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS) zu entnehmen, die Sie vom jeweiligen Produkthersteller beziehen können.

Verdünnen der Probe mit RNase-freiem Wasser kann zu unrichtig niedrigen Werten führen.

Stellen Sie den Nullpunkt des Spektralphotometers mit einer Leerprobe ein, welche die gleichen Anteile Elutionspuffer (BR5) und Tris-HCl-Puffer enthält wie die zu messenden Proben. Der Elutionspuffer (BR5) absorbiert stark bei 220 nm, was zu hohen Hintergrundabsorptionswerten führen kann, wenn der Nullpunkt des Spektralphotometers nicht sachgemäß eingestellt wurde.



Zur Quantifizierung in Tris-HCl-Puffer verwenden Sie folgenden Zusammenhang $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Siehe Anhang B auf Seite 81.

22. Verschießen Sie sämtliche Flaschen mit Puffern und RNase-freiem Wasser, Fläschchen und Röhrchen mit Enzymen und Enzympuffern sowie Beutel mit Kunststoffmaterialien aus dem für das Protokoll verwendeten Kit. Bewahren Sie den restlichen Inhalt des Kits wie unter „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ (Seite 23) und „Stabilität nach dem Öffnen“ (Seite 23) beschrieben zur weiteren Verwendung auf.

Protokoll: Automatische Isolierung von Gesamt-RNA aus humanem Vollblut, das in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen wurde

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Vergewissern Sie sich, dass die Verpackung des Kits intakt und unbeschädigt ist und die Puffer nicht ausgelaufen sind. Verwenden Sie kein beschädigtes Kit.
- Überprüfen Sie bei Verwendung einer Pipette, ob das korrekte Volumen eingestellt ist und die Flüssigkeit vorsichtig und vollständig angesaugt und abgegeben wird.
- Um ein Überführen von Proben in falsche Röhren bzw. falsche Kunststoff-Verbrauchsmaterialien zu vermeiden, stellen Sie sicher, dass alle PTs, MCTs und Rotoradapter mit einem geeigneten wasserfesten Stift richtig beschriftet worden sind. Beschriften Sie jedes MCT sowohl auf dem Deckel als auch dem Röhren, jedes PT sowie jeden Rotoradapter auf der Außenwand.
- Während der Verarbeitung verschüttete Proben und Puffer können die Ausbeute und die Reinheit der RNA beeinträchtigen.
- Wenn nicht anders angegeben, müssen alle Protokollschritte einschließlich der Zentrifugationsschritte bei Raumtemperatur (15–25 °C) durchgeführt werden.

Wegen der Sensitivität der Nukleinsäure-Amplifikationstechnik, sind die folgenden Vorsichtsmaßnahmen bei der Probenhandhabung nötig, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden:

- Pipettieren die Probe vorsichtig auf den Boden des PT ohne den oberen Rand des Röhrens zu benetzen.
- Wechseln Sie zwischen den verschiedenen Pipettierschritten stets die Pipettenspitzen. Verwenden Sie Pipettenspitzen mit einer Aerosolbarriere.

- Vermeiden Sie es, mit der Pipettenspitze die Membran in der Spin-Säule (PSC, PRC) zu berühren.
- Zentrifugieren Sie das MCT nach dem Mischen auf dem Vortexer oder dem Erhitzen kurz, um Tropfen von der Deckelinnenseite zu entfernen.
- Tragen Sie während der gesamten Verarbeitung Laborhandschuhe. Sollten Sie die Proben mit den Handschuhen berühren, müssen die Handschuhe sofort gewechselt werden.

Vorbereitende Schritte

- Das Blut muss in die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) gemäß den Anweisungen im *PAXgene Blood RNA Tube Handbuch* entnommen werden. Im Anhang C (auf Seite 83) finden Sie bei Bedarf Empfehlungen zur Handhabung der PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Inkubieren Sie die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) nach der Blutentnahme mindestens 2 h lang bei Raumtemperatur, um eine vollständige Lyse der Blutzellen und Niederschlag der RNA sicherzustellen. Eine Inkubation der PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) über Nacht kann die Ausbeute erhöhen. Wenn ein PAXgene Blood RNA Tube (BRT) nach der Blutentnahme bei 2–8 °C, –20 °C oder –70 °C gelagert worden ist, äquilibrieren Sie das Röhrchen erst auf Raumtemperatur und lagern Sie es 2 h lang bei Raumtemperatur, bevor Sie mit der Verarbeitung beginnen.
- Lesen Sie die Sicherheitshinweise auf Seite 19.
- Lesen Sie „Wichtige Hinweise“, Seite 60.
- Lesen Sie auch die Richtlinien zur Handhabung von RNA (Anhang A auf Seite 79).
- Lesen Sie das entsprechende QIAcube Connect MDx Benutzerhandbuch und alle weiteren mit dem Gerät gelieferten Informationen, insbesondere die Sicherheitshinweise.

- Stellen Sie sicher, dass alle Vorrichtungen und Geräte, wie z. B. Pipetten und das QIAcube Connect MDx, regelmäßig nach den Empfehlungen des Herstellers überprüft und kalibriert werden.
- Im Bindungspuffer (BR2) kann sich beim Lagern ein Niederschlag bilden. Falls nötig, lösen Sie diesen durch Erwärmen auf 37 °C auf.
- Waschpuffer 2 (BR4) wird als Konzentrat geliefert. Geben Sie vor der ersten Verwendung wie auf der Flasche angegeben das korrekte Volumen Ethanol (96-100 % v/v, Reinheitsgrad p.a.) hinzu, um eine gebrauchsfertige Arbeitslösung herzustellen.
- Bereiten Sie vor der erstmaligen Verwendung des RNase-Free DNase Sets eine DNase-I-Stammlösung vor. Lösen Sie die feste DNase I (RNFD; 1.500 Kunitz-Einheiten)* in 550 µl DNase-Resuspendierungspuffer (DRB) auf, der im Satz bereitgestellt wird. Achten Sie darauf, dass beim Öffnen des Fläschchens keine DNase I (RNFD) verloren geht. Die rekonstituierte DNase I (RNFD) darf nicht auf einem Vortexer gemischt werden. DNase I ist besonders anfällig für physikalische Denaturierung. Mischen Sie nur durch vorsichtiges Schwenken und Umdrehen des Fläschchens.
- Rekonstituierte DNase I (RNFD) kann bei 2–8 °C im Original-Fläschchen (Stammlösung) oder nach Entnahme der Stammlösung aus dem Glasfläschchen und Aufteilung in Aliquote für den Einmalgebrauch bei –20 °C gelagert werden. Verwenden Sie dazu die mit dem Kit gelieferten 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen, die ausreichend sind für 5 Aliquote. Aufgetaute Aliquote können bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Nach dem Auftauen dürfen die Aliquote nicht wieder eingefroren werden.
- Beachten Sie beim Rekonstituieren und Aliquotieren der DNase I (RNFD) die Richtlinien zur Handhabung von RNA (Anhang A auf Seite 79).

* Die Kunitz-Einheit ist die gebräuchliche Maßeinheit zur Bestimmung der DNase-I-Aktivität, die definiert ist als die Menge DNase I, die bei Verwendung einer hochpolymerisierten DNA als Substrat zu einer Zunahme der Absorption bei 260 nm (A_{260}) von 0,001 pro Minute und Milliliter bei 25 °C und pH 5,0 führt (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 und 363).

- Installieren Sie den richtigen Schüttleradapter (im Lieferumfang des QIAcube Connect MDx enthalten; verwenden Sie den mit der Ziffer „2“ markierten Adapter für 2-ml-Safe-Lock-Reaktionsröhrchen) und setzen Sie das Schüttlergestell auf den Adapter.
- Prüfen Sie die Abfallschublade und leeren Sie diese, falls erforderlich.
- Installieren Sie alle zugehörigen Protokolle, wenn dies für vorherigen Läufe noch nicht geschehen ist. Für den QIAcube Connect MDx ist es erforderlich, alle in der zugehörigen ZIP-Datei enthaltenen Protokolle herunterzuladen. Siehe „Installieren von Protokollen auf dem QIAcube Connect MDx“, Seite 62.

Verfahren

1. Schließen Sie die Haube des QIAcube Connect MDx und schalten Sie das Gerät über den Netzschalter ein (siehe Abbildung 15, Seite 61).

Nach einem Signalton wird der Startbildschirm angezeigt. Das Gerät führt automatisch Initialisierungstests durch.

2. Öffnen Sie die Haube des QIAcube Connect MDx und stellen Sie die erforderlichen Reagenzien und Kunststoffgefäße in das Gerät. Siehe „Beladen des QIAcube Connect MDx“, Seite 63.

Um Zeit zu sparen, kann die Arbeitsplattform auch während einer oder beider der 10-minütigen Zentrifugationsschritte (Schritt 3 und 5) beladen werden.

3. Zentrifugieren Sie PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 10 min lang bei 3.000 bis 5.000 g in einem Ausschwingrotor.



Stellen Sie sicher, dass die Blutproben in den PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zuvor mindestens 2 h lang bei Raumtemperatur (15–25 °C) inkubiert wurden, um eine vollständige Lyse der Blutzellen und einen vollständigen Niederschlag der RNA zu erzielen.



Der Rotor muss Adapter für Rundbodenröhrchen enthalten. Bei Verwendung anderer Röhrchenadaptertypen können die Röhrchen während der Zentrifugation brechen.

4. Entfernen Sie den Überstand durch Dekantieren oder Pipettieren. Wenn Sie den Überstand dekantieren, achten Sie darauf, dass das Pellet intakt bleibt, und trocknen Sie den Rand des Röhrchens mit einem sauberen Papiertuch ab. Geben Sie 4 ml RNase-freies Wasser (RNFW) zum Pellet und verschließen Sie das Röhrchen mit einem neuen sekundären BD Hemogard-Deckel (im Kit mitgeliefert).
5. Mischen Sie auf dem Vortexer, bis sich das Pellet sichtbar aufgelöst hat, und zentrifugieren Sie 10 min lang bei 3.000 bis 5.000 g in einem Ausschwingrotor. Entfernen und entsorgen Sie den ganzen Überstand.

Kleinere Zelltrümmer, die sich nach dem Vortexen, aber vor der Zentrifugation im Überstand befinden, stören die weitere Verarbeitung nicht.



Unvollständiges Entfernen des Überstands inhibiert die Lyse und verdünnt das Lysat und beeinträchtigt so die Bedingungen zum Binden der RNA an die PAXgene Membran.

6. Geben Sie 350 µl Resuspendierungspuffer (BR1) hinzu und mischen Sie auf dem Vortexer, bis sich das Pellet sichtbar aufgelöst hat.
 7. Pipettieren Sie die Probe in ein 2-ml-PT.
8. Setzen Sie die offenen PTs mit den Proben in den Schüttler des QIAcube Connect MDx (siehe Abbildung 18, Seite 65). Die Probenpositionen sind nummeriert, um das Beladen zu erleichtern. Stecken Sie die Schüttlergestellstopfen (im Lieferumfang des QIAcube Connect MDx enthalten) in die seitlichen Schlitze des Schüttlergestells neben dem jeweiligen PT. Dies ermöglicht die Probendetektion während der Beladungsprüfung.



Vergewissern Sie sich, dass der richtige Schüttleradapter installiert ist (Schüttleradapter; 2 ml, Safe-Lock-Röhrchen, markiert mit der Ziffer „2“; im Lieferumfang des QIAcube Connect MDx enthalten).



Wenn Sie weniger als 12 Proben verarbeiten, stellen Sie sicher, dass das Schüttlergestell korrekt beladen wird, wie in Abbildung 22 auf Seite 69 gezeigt. Nicht verarbeitet werden können eine (1) oder 11 Proben. Die Positionsnummern im Schüttlergestell entsprechen den Positionsnummern in der Zentrifuge.

9. Schließen Sie die Gerätetür des QIAcube Connect MDx (siehe Abbildung 15 auf Seite 61).

10. Wählen Sie das Protokoll „PAXgene Blood RNA Part A“ aus und starten Sie das Protokoll.

Befolgen Sie die Anweisungen, die auf dem Touchscreen des QIAcube Connect MDx angezeigt werden.



Vergewissern Sie sich, dass beide Protokollteile (Teil A und Teil B) auf dem QIAcube Connect MDx installiert sind (siehe „Installieren von Protokollen auf dem QIAcube Connect MDx“, Seite 62).



Das Gerät führt Beladungsprüfungen für Proben, Pipettenspitzen, Rotoradapter und Reagenzflaschen durch.

11. Wenn das Protokoll „PAXgene Blood RNA Part A“ beendet ist, öffnen Sie die Haube des QIAcube Connect MDx (siehe Abbildung 15 auf Seite 61). Entnehmen und entsorgen Sie die PRCs aus den Rotoradaptern und die leeren PTs aus dem Schüttler.



Während des Laufs werden die Spin-Säulen innerhalb des Rotoradapters vom Roboterarm von Position 1 (Deckelposition L1) nach Position 3 (Deckelposition L2) umgesetzt (siehe Abbildung 20 auf Seite 67).

12. Schließen Sie die Deckel aller 1,5-ml-MCTs mit der aufgereinigten RNA in den Rotoradaptern (Position 3, Deckelposition L3; siehe Abbildung 20 auf Seite 67). Setzen Sie die 1,5-ml-MCTs auf den Schüttleradapter des QIAcube Connect MDx (siehe Abbildung 18 auf Seite 65).

13. Schließen Sie die Gerätetür des QIAcube Connect MDx (siehe Abbildung 15 auf Seite 61).
14. Wählen Sie das Protokoll „PAXgene Blood RNA Part B“ aus und starten Sie das Protokoll.

Befolgen Sie die Anweisungen auf dem Touchscreen des QIAcube Connect MDx.



Dieses Protokoll inkubiert die Proben bei 65 °C und denaturiert die RNA für nachfolgende Applikationen vorbereitet. Lassen Sie diesen Protokollschritt auch dann nicht aus, wenn bei der nachfolgenden Applikation ein Hitzedenaturierungsschritt vorgesehen ist. Eine ausreichende RNA-Denaturierung zu diesem Zeitpunkt ist unbedingt erforderlich, um die maximale Effizienz der nachfolgenden Applikationen zu gewährleisten.

15. Öffnen Sie die Haube des QIAcube Connect MDx (siehe Abbildung 15 auf Seite 61), wenn das Protokoll „PAXgene Blood RNA Part B“ beendet ist. Stellen Sie die MCTs mit der aufgereinigten RNA sofort auf Eis.



WARNUNG: Heiße Oberfläche. Der Schüttler kann Temperaturen von bis zu 70 °C erreichen. Berührungen im heißen Zustand sind zu vermeiden.



Lassen Sie die aufgereinigte RNA nicht im QIAcube Connect MDx stehen. Da die Proben im Gerät nicht gekühlt werden, kann die aufgereinigte RNA abgebaut werden. Unbeaufsichtigte Probenvorbereitungsläufe über Nacht sind deshalb nicht zu empfehlen.

16. Wenn die RNA-Proben nicht sofort verwendet werden, lagern Sie sie bei -20 °C oder -70 °C.

Da die RNA auch nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen denaturiert bleibt, ist es nicht erforderlich, das Protokoll zur Hitzeinkubation („PAXgene Blood RNA Part B“) zu wiederholen. Beachten Sie die Anweisungen des Herstellers, wenn Sie die RNA-Proben für einen diagnostischen Assay verwenden.

Für eine genaue RNA-Quantifizierung durch Messung der Absorption bei 260 nm wird empfohlen, die Probe in 10 mM Tris-HCl bei pH 7,5 zu verdünnen.* Verdünnen der Probe mit RNase-freiem Wasser kann zu unrichtig niedrigen Werten führen.

Stellen Sie den Nullpunkt des Spektralphotometers mit einer Leerprobe ein, welche die gleichen Anteile Elutionspuffer (BR5) und Tris-HCl-Puffer enthält wie die zu messenden Proben. Der Elutionspuffer (BR5) absorbiert stark bei 220 nm, was zu hohen Hintergrundabsorptionswerten führen kann, wenn der Nullpunkt des Spektralphotometers nicht sachgemäß eingestellt wurde.



Zur Quantifizierung in Tris-HCl-Puffer verwenden Sie folgende Gleichung

$$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ } \mu\text{g/ml. Siehe Anhang B auf Seite 81.}$$

17. Entnehmen Sie das Reagent Bottle Rack aus der QIAcube Connect MDx Arbeitsplattform (siehe Abbildung 18 auf Seite 65) und verschließen Sie alle Flaschen mit den entsprechend beschrifteten Deckeln. Verschließen Sie sämtliche Flaschen mit Puffern und RNase-freiem Wasser, Fläschchen und Röhrchen mit Enzymen und Enzympuffern sowie Beutel mit Kunststoffmaterialien aus dem für das Protokoll verwendeten Kit. Bewahren Sie den restlichen Inhalt des Kits und die Reagenzflaschen wie unter „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ (Seite 23) und „Stabilität nach dem Öffnen“ (Seite 23) beschrieben zur weiteren Verwendung auf.

Entnehmen Sie die in den PTs in den QIAcube Connect MDx MDx-Stellplätzen verbliebenen Reagenzien und entsorgen Sie diese. Entfernen Sie die Rotoradapter aus der Zentrifuge und entsorgen Sie diese. Leeren Sie die Abfallschublade des QIAcube Connect MDx (siehe Abbildung 15 auf Seite 61). Schließen Sie die Haube des Geräts und schalten Sie das Gerät über den Netzschalter aus.

* Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen sind den relevanten Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS) zu entnehmen, die Sie vom jeweiligen Produkthersteller beziehen können.

Anwendungseinschränkungen

Das PAXgene Blood RNA Kit ist zur Isolierung intrazellulärer RNA aus humanem Vollblut ($4,8 \times 10^6$ bis $1,1 \times 10^7$ Leukozyten/ml) für Anwendungen im Rahmen der In-vitro-Diagnostik vorgesehen. Es dient nicht zur Isolierung genomischer DNA oder viraler Nukleinsäuren aus humanem Vollblut. Da nur eine begrenzte Anzahl Transkripte für die Stabilisierungsspezifikationen validiert wurde (FOS- und IL1B-Gen-Transkripte), können nicht für alle Transkripte Leistungsmerkmale angegeben werden. Die Anwender müssen die Angaben des Herstellers und eigene Daten prüfen, um zu bestimmen, ob eine Validierung für andere Transkripte notwendig ist. Die Komponenten des Kits sind nur für die Verwendung in dem in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen manuellen und automatischen Protokoll vorgesehen.

Gebrauchsanweisungen für die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) finden Sie im *PAXgene Blood RNA Tube Handbuch*.

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wird jede Charge des PAXgene Blood RNA Kits nach festgelegten Spezifikationen getestet, um eine einheitliche Produktqualität sicherzustellen.

Leistungsmerkmale

Probennahme und Stabilisierung

Die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) enthalten ein proprietäres RNA-Stabilisierungsreagenz. Dieser Zusatz schützt RNA-Moleküle vor Abbau durch RNasen und minimiert Ex-vivo-Veränderungen der Genexpression. Die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) sind für die Entnahme von humanem Vollblut und die Stabilisierung zellulärer RNA für bis zu 3 Tage bei 18–25 °C (Abbildung 4 und 5, Seite 44 und 45) oder für bis zu 5 Tage bei 2–8 °C vorgesehen (Abbildung 6 und 7, Seite 46 und 47). Stabilisiertes Blut kann auch gefroren gelagert werden. Die zurzeit verfügbaren Daten zeigen, dass bei -20 °C oder -70 °C die Stabilisierung zellulärer RNA für mindestens 11 Jahre möglich ist*. Weitere Informationen über laufende Studien zur Evaluierung noch längerer Stabilisierungszeiten erhalten Sie unter www.preanalytix.com oder wenden Sie sich an den Technischen Service von QIAGEN.

Die tatsächliche Dauer der RNA-Stabilisierung kann je nach zellulärer RNA-Spezies und verwendeter Folge-Applikation variieren. Da nur eine begrenzte Anzahl Transkripte für die Stabilisierungsspezifikationen validiert wurde (FOS- und IL1B-Gentranskripte), können nicht für alle Transkripte Leistungsmerkmale angegeben werden. Die Anwender müssen die Angaben des Herstellers und eigene Daten prüfen, um zu bestimmen, ob eine Validierung für andere Transkripte notwendig ist.

* Eine Langzeitstudie zur Blutlagerung in PAXgene Blood RNA Tubes dauert an.

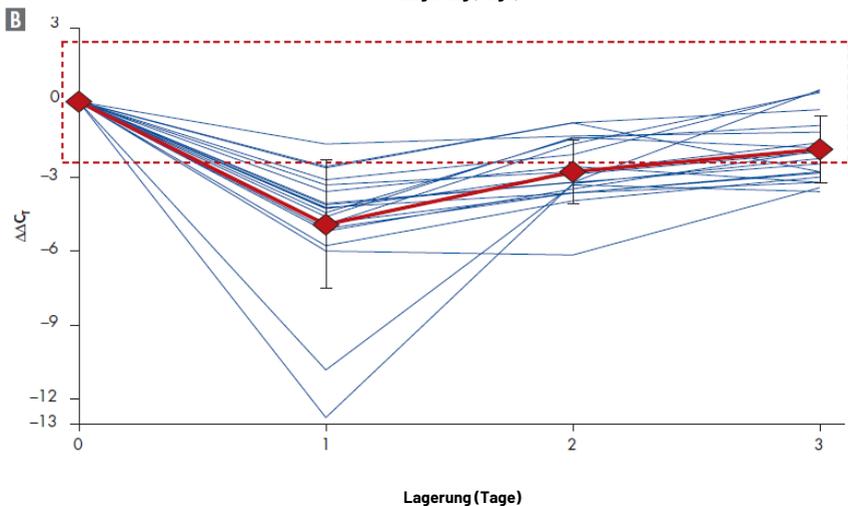
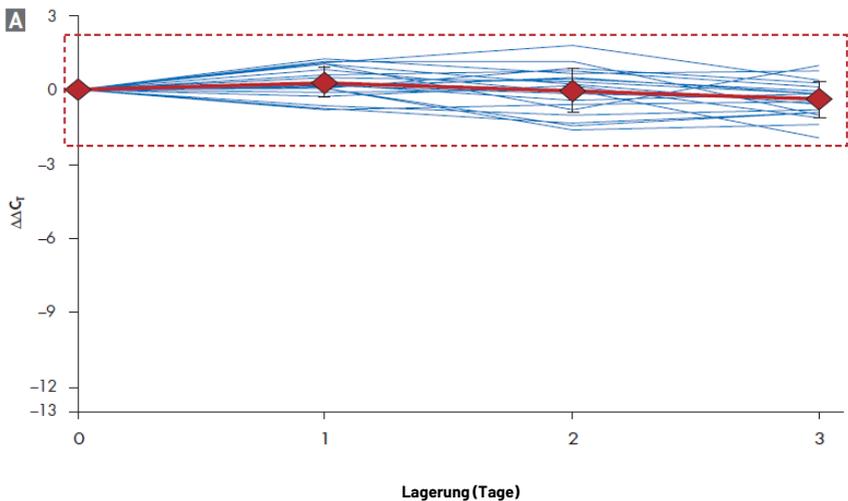


Abbildung 4: RNA-Stabilität in Blutproben bei 18-25°C: FOS. 10 augenscheinlich gesunden Spendern wurden jeweils zwei Blutproben entnommen, die bei 18-25 °C für die angegebene Anzahl von Tagen gelagert wurden, bevor die Gesamt-RNA isoliert wurde. **[A]** Blutentnahme und Lagerung erfolgten in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), und die Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Blutentnahme und Lagerung erfolgten in Standard-Blutentnahmeröhrchen mit EDTA als Antikoagulans, und die Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte mit einem organischen Standard-Isolierungsverfahren einschließlich einer RNA-Aufreinigung mithilfe einer silikabasierten Membran. Die relativen FOS-Transkriptkonzentrationen wurden mittels Real-time-Duplex-RT-PCR unter Verwendung von 18S-rRNA als internem Standard bestimmt. Die Werte für alle Proben sind aufgetragen, wobei Mittelwerte und Standardabweichungen aller Proben gezeigt werden. Die unterbrochenen Linien geben den $\pm 3x$ -Bereich der Gesamtpräzision des Assays ($2,34 C_T$) an.

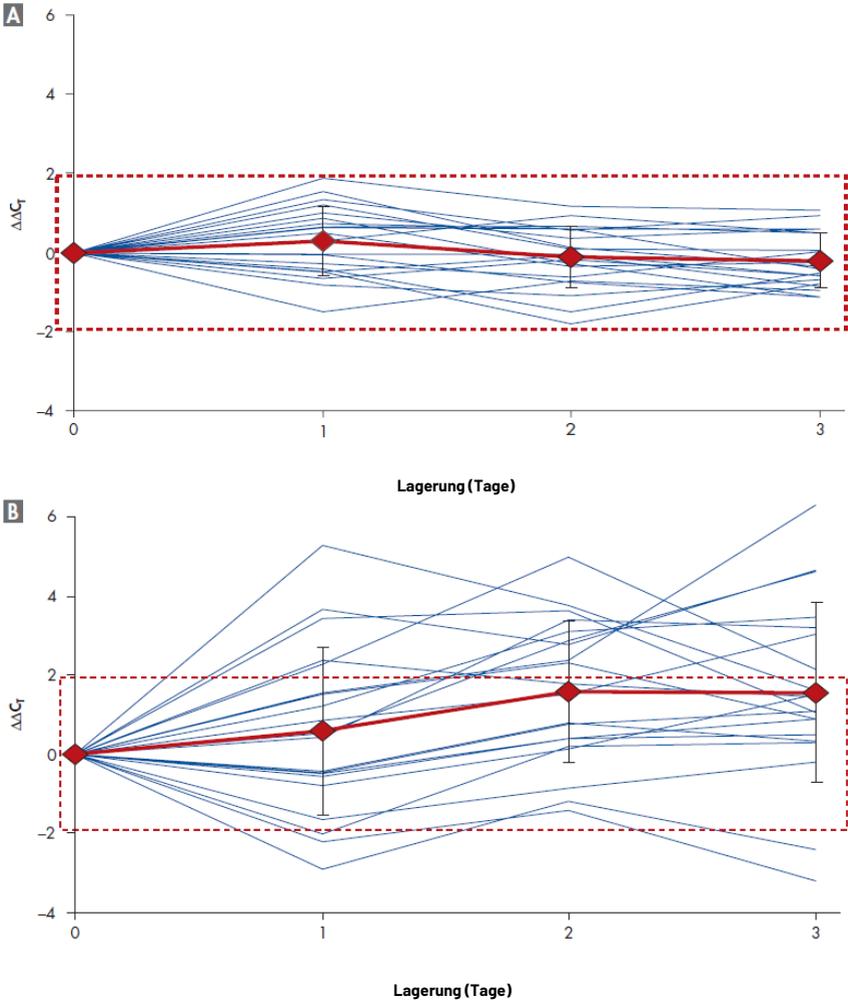


Abbildung 5: RNA-Stabilität in Blutproben bei 18-25°C: IL1B. Die Blutentnahme und Aufreinigung der Gesamt-RNA nach Lagerung bei 18-25°C erfolgten wie in Abbildung 4 beschrieben. Die relativen IL1B-Transkriptkonzentrationen wurden mittels Real-time-Duplex-RT-PCR unter Verwendung von 18S-rRNA als internem Standard bestimmt. Die Werte für alle Proben sind aufgetragen, wobei Mittelwerte und Standardabweichungen aller Proben gezeigt werden. Die unterbrochenen Linien geben den $\pm 3x$ -Bereich der Gesamtpräzision des Assays (1,93 C_t) an.

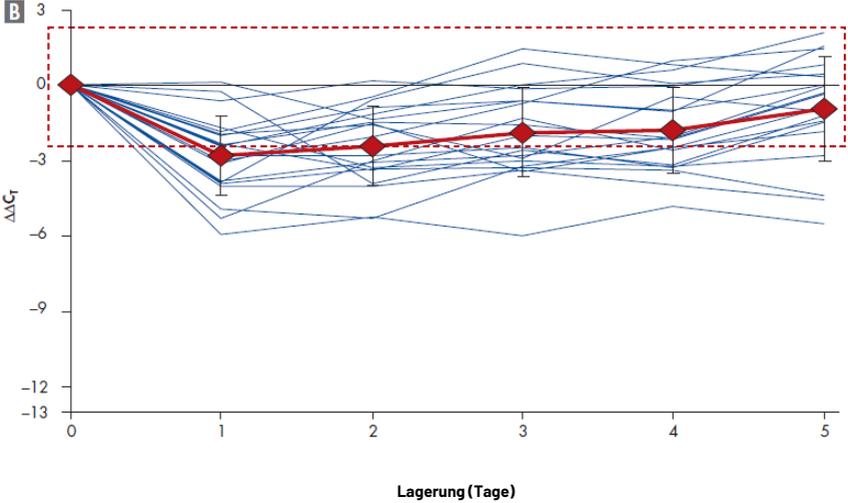
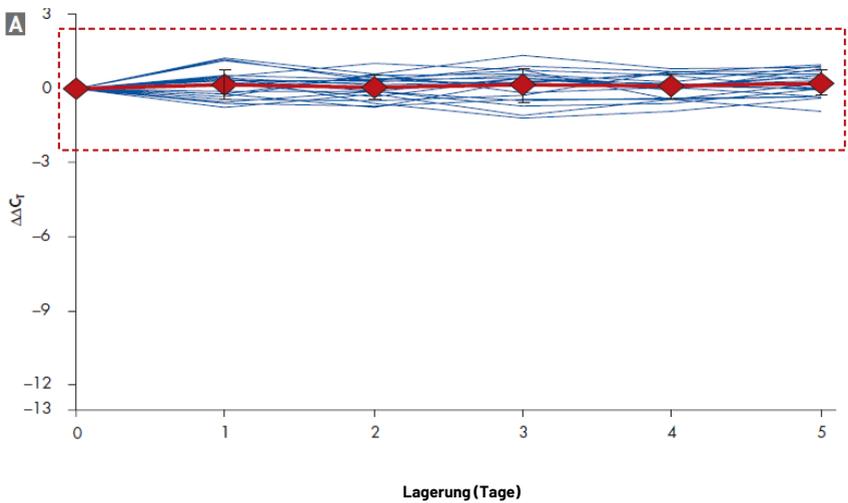


Abbildung 6: RNA-Stabilität in Blutproben bei 2 bis 8 °C: FOS. 10 Spendern wurden jeweils zwei Blutproben entnommen, die bei 2 bis 8 °C für die angegebene Anzahl von Tagen gelagert wurden, bevor die Gesamt-RNA isoliert wurde. [A] Blutentnahme und Lagerung erfolgten in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), und die Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem PAXgene Blood RNA Kit. [B] Blutentnahme und Lagerung erfolgten in Standard-Blutentnahmeröhrchen mit EDTA als Antikoagulans, und die Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte mit einem organischen Standard-Isolierungsverfahren mit Silikamembran-basierter RNA-Aufreinigung. Die relativen FOS-Transkriptkonzentrationen wurden mittels Real-time-Duplex-RT-PCR unter Verwendung von 18S-rRNA als internem Standard bestimmt. Die Werte für alle Proben sind aufgetragen, wobei Mittelwerte und Standardabweichungen aller Proben gezeigt werden. Die unterbrochenen Linien geben den $\pm 3x$ -Bereich der Gesamtpräzision des Assays ($2,34 C_t$) an.

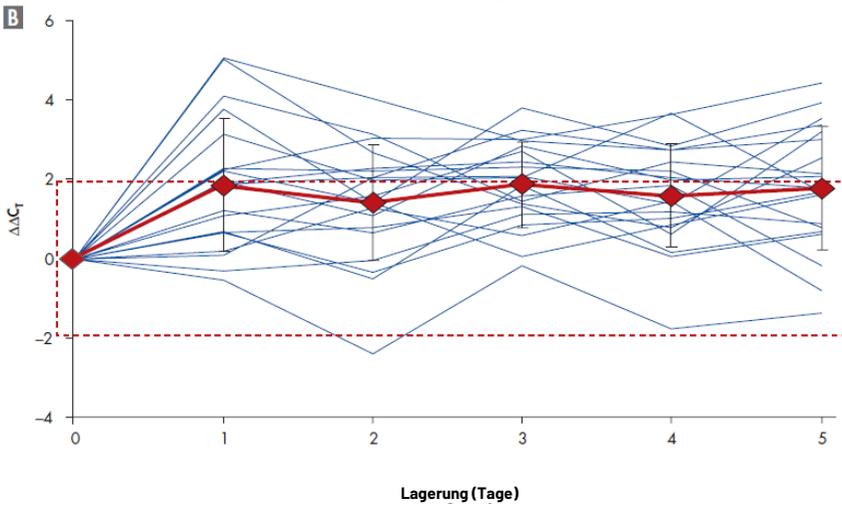
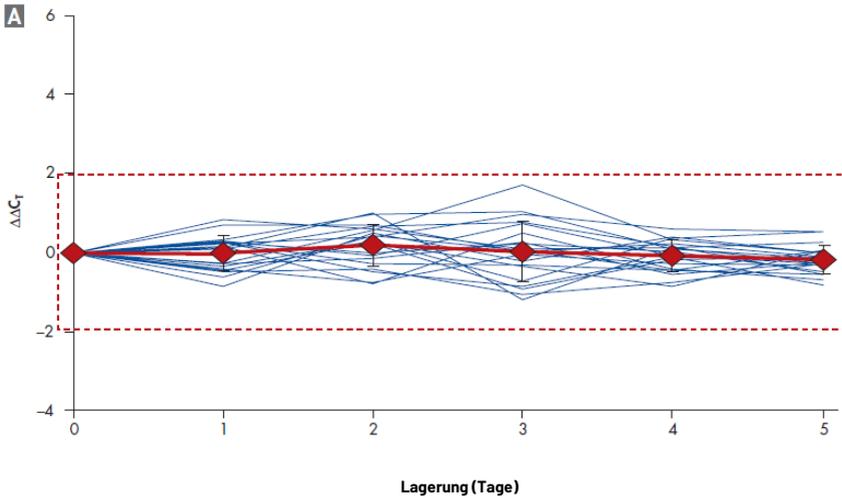


Abbildung 7: RNA-Stabilität in Blutproben bei 2 bis 8 °C: IL1B. Die Blutentnahme und Aufreinigung der Gesamt-RNA nach Lagerung bei 2-8°C erfolgten wie in Abbildung 6 beschrieben. Die relativen IL1B-Transkriptkonzentrationen wurden mittels Real-time-Duplex-RT-PCR unter Verwendung von 18S-rRNA als internem Standard bestimmt. Die Werte für alle Proben sind aufgetragen, wobei Mittelwerte und Standardabweichungen aller Proben gezeigt werden. Die unterbrochenen Linien geben den $\pm 3x$ -Bereich der Gesamtpräzision des Assays ($1,93 C_T$) an.

Manuelle RNA-Isolierung

Die mit dem PAXgene Blood RNA System isolierte Gesamt-RNA ist rein. Bei Anwendung des manuellen Protokolls liegen die A_{260}/A_{280} -Werte zwischen 1,8 und 2,2 und in ≥ 95 % aller Proben ist genomische DNA in einem Anteil ≤ 1 % (w/w) vorhanden, wie durch quantitative Real-time-PCR einer Sequenz des Beta-Actin-Gens gemessen wurde. Wenn das Eluat bis zu 30 % des RT-PCR-Reaktionsvolumens ausmacht, zeigen mindestens 95 % der Proben keine Inhibition bei der RT-PCR.

Bei Verwendung des manuellen Protokolls beträgt die durchschnittliche Probenvorbereitungszeit (auf der Basis der Daten von 12 Probenverarbeitungsdurchgängen) etwa 90 min*, wobei die eigentliche Handhabungszeit nur 40 min beträgt. Bei ≥ 95 % der verarbeiteten Proben wird eine RNA-Ausbeute von ≥ 3 μ g aus 2,5 ml Vollblut gesunder Probanden erzielt. Da die Ausbeuten stark vom Probanden abhängen, kann die individuelle Ausbeute variieren. Für individuelle Spender liefert das PAXgene Blood RNA System hochreproduzierbare und -wiederholbare Ausbeuten (Abbildung 8 und 9, Seiten 49 und 50) sowie eine reproduzierbare und wiederholbare RT-PCR (Abbildung 10 und 11, Seiten 54 und 55), was eine hohe Robustheit für klinische Diagnostiktests bedeutet.

Abbildung 8 (Seite 49) zeigt die Gesamt-Reproduzierbarkeit und -Wiederholbarkeit des PAXgene Blood RNA System. Weitere Studien wurden durchgeführt, um den Einfluss verschiedener Chargen des PAXgene Blood RNA Kits und verschiedener Laboranten auf die Reproduzierbarkeit der RNA-Ausbeute und der Leistung der Real-time-RT-PCR zu zeigen. Da für diese Studien gepoolte Blutproben und keine individuellen PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) verwendet wurden, spiegeln die Ergebnisse nicht die Systemwiederholbarkeit wider, die auch Variationen zwischen individuellen Blutentnahmen umfasst, sondern lediglich die Wiederholbarkeit der Probenvorbereitung (siehe Abbildung 9, Seite 50).

* Gesamtdauer der Ausführung des Protokolls, einschließlich Vorabhandhabung der PAXgene Blood RNA Tubes (Zentrifugationen, Pellet-Waschschritte und Pellet-Resuspendierung).

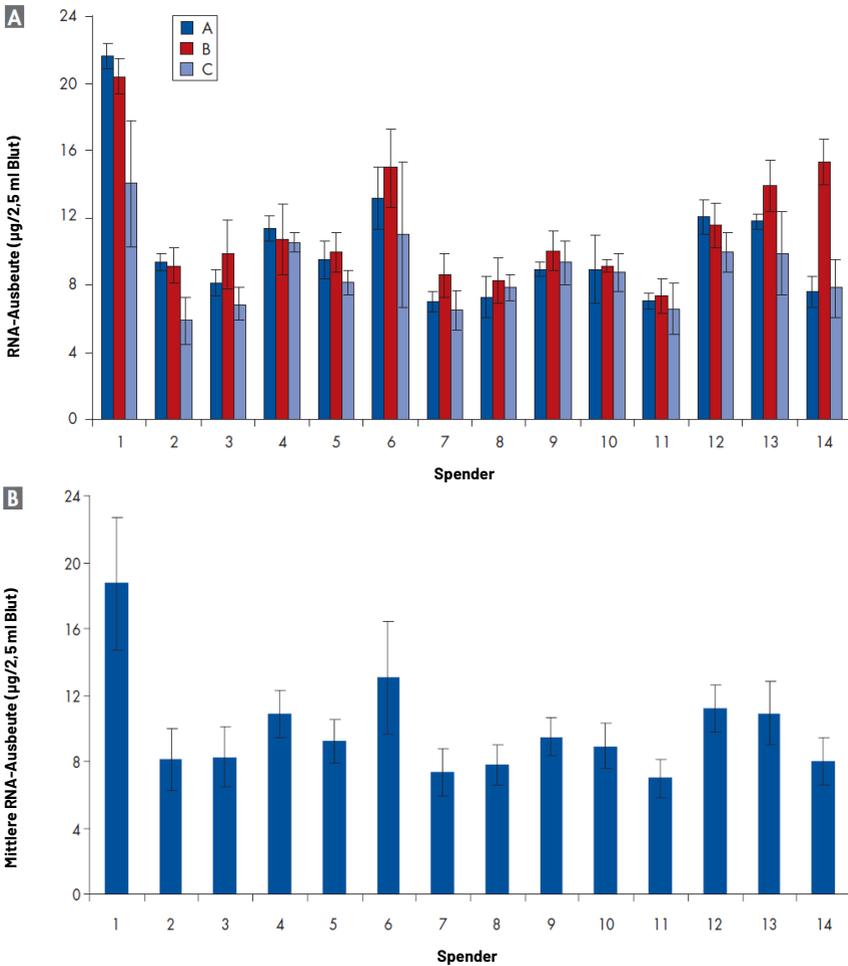


Abbildung 8: Reproduzierbare und wiederholbare RNA-Isolierung Vierfachbestimmungen der Blutproben von 14 Probanden wurden jeweils von 3 Laboranten (A, B, C) manuell durchgeführt. Dabei wurden drei verschiedene Gerätesätze verwendet, wobei alle Proben von einem einzelnen Laboranten mit demselben Gerätesatz vorbereitet wurden. [A] Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der RNA-Ausbeute der Replikatproben von denselben Probanden und verschiedenen Laboranten. [B] Zwölf Blutprobenreplikate von jedem der 14 Probanden wurden von den 3 Laboranten verarbeitet. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der RNA-Ausbeute der Proben von denselben Probanden und allen Laboranten. Bei allen RNA-Proben lagen die A_{260}/A_{280} -Verhältnisse im Bereich von 1,8 bis 2,2.

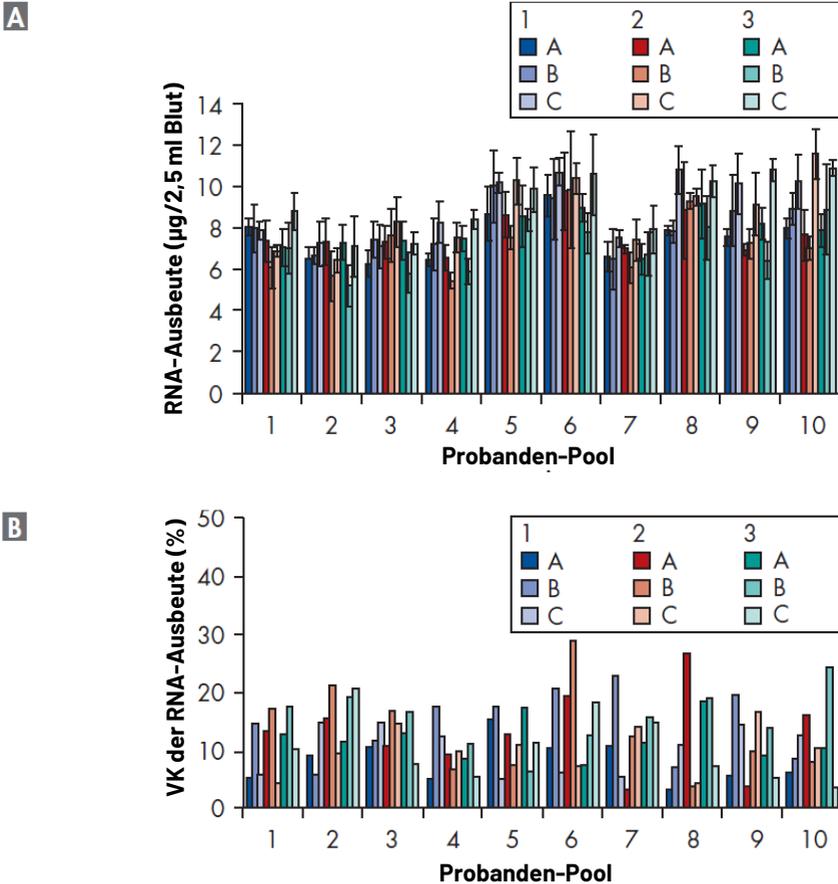


Abbildung 9: Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit der RNA-Ausbeute bei verschiedenen Laboranten und verschiedenen Chargen des PAXgene Blood RNA Kits unter Verwendung gepoolter Blutproben. Blutproben von 30 Probanden wurden in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen (12 Röhrchen pro Proband, d. h. insgesamt 360 Röhrchen). Die Inhalte aller Röhrchen von jeweils 3 Probanden wurden gepoolt und anschließend wieder auf 36 Proben aliquotiert. Diese 36 Proben pro 3-Probanden-Pool wurden von 3 verschiedenen Laboranten manuell verarbeitet. Jeder Laborant verwendete PAXgene Blood RNA Kits aus 3 verschiedenen Chargen für die RNA-Isolierung und verarbeitete vier Replikatproben aus jedem der 10 Probanden-Pools. **[A]** RNA-Ausbeute und Standardabweichung für alle Kombinationen aus Laborant und Charge. Vier Replikatblutproben aus 10 Probanden-Pools wurden von 3 Laboranten (A, B und C) mit jeder von 3 Chargen des Kits (1, 2 und 3) verarbeitet. Die mittleren Ausbeuten (Säulen) und Standardabweichungen (Fehlerbalken) jeder der vier Replikatproben aus demselben Probanden-Pool für verschiedene Laboranten und Chargen des Kits sind dargestellt. **[B]** Variationskoeffizient (VK) der RNA-Ausbeute pro Probanden-Pool für alle Kombinationen aus Laborant und Charge (A, B und C; 1, 2 und 3), wie berechnet aus den in Abbildung 9A gezeigten mittleren Ausbeuten und Standardabweichungen.

Tabelle 1A: Reproduzierbarkeit innerhalb jeder Charge und für jeden Laboranten für ausgewählte Probanden-Pools (1, 6, 9 und 10)

Datenkombinationen	Probanden-Pool 1 ($5,1 \times 10^6$ Zellen/ml)			Probanden-Pool 6 ($6,5 \times 10^6$ Zellen/ml)		
	Mittlere Ausbeute (μg)	SD (μg)	VK (%)	Mittlere Ausbeute (μg)	SD (μg)	VK (%)
Charge 1, Laborant A	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
Charge 1, Laborant B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
Charge 1, Laborant C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
Charge 2, Laborant A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
Charge 2, Laborant B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
Charge 2, Laborant C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
Charge 3, Laborant A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
Charge 3, Laborant B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
Charge 3, Laborant C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
Datenkombinationen	Probanden-Pool 9 ($8,4 \times 10^6$ Zellen/ml)			Probanden-Pool 10 ($10,2 \times 10^6$ Zellen/ml)		
	Mittlere Ausbeute (μg)	SD (μg)	VK (%)	Mittlere Ausbeute (μg)	SD (μg)	VK (%)
Charge 1, Laborant A	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
Charge 1, Laborant B	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Charge 1, Laborant C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Charge 2, Laborant A	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Charge 2, Laborant B	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Charge 2, Laborant C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Charge 3, Laborant A	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Charge 3, Laborant B	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Charge 3, Laborant C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3

Tabelle 1B: Reproduzierbarkeit für jeden Laboranten und zwischen allen Chargen für ausgewählte Probanden-Pools (1, 6, 9 und 10)

Datenkombinationen	Probanden-Pool 1 ($5,1 \times 10^6$ Zellen/ml)			Probanden-Pool 6 ($6,5 \times 10^6$ Zellen/ml)		
	Mittlere Ausbeute (μg)	SD (μg)	VK (%)	Mittlere Ausbeute (μg)	SD (μg)	VK (%)
Laborant A, alle Chargen	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Laborant B, alle Chargen	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Laborant C, alle Chargen	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Datenkombinationen	Probanden-Pool 9 ($8,4 \times 10^6$ Zellen/ml)			Probanden-Pool 10 ($10,2 \times 10^6$ Zellen/ml)		
	Mittlere Ausbeute (μg)	SD (μg)	VK (%)	Mittlere Ausbeute (μg)	SD (μg)	VK (%)
Laborant A, alle Chargen	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Laborant B, alle Chargen	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Laborant C, alle Chargen	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

Tabelle 1C: Reproduzierbarkeit innerhalb jeder Charge und zwischen allen Laboranten für ausgewählte Probanden-Pools (1, 6, 9 und 10)

Datenkombinationen	Probanden-Pool 1 ($5,1 \times 10^6$ Zellen/ml)			Probanden-Pool 6 ($6,5 \times 10^6$ Zellen/ml)		
	Mittlere Ausbeute (μg)	SD (μg)	VK (%)	Mittlere Ausbeute (μg)	SD (μg)	VK (%)
Charge 1, alle Laboranten	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Charge 2, alle Laboranten	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Charge 3, alle Laboranten	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19

	Probanden-Pool 9 ($8,4 \times 10^6$ Zellen/ml)			Probanden-Pool 10 ($10,2 \times 10^6$ Zellen/ml)		
	Mittlere Ausbeute (μg)	SD (μg)	VK (%)	Mittlere Ausbeute (μg)	SD (μg)	VK (%)
Charge 1, alle Laboranten	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Charge 2, alle Laboranten	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Charge 3, alle Laboranten	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

Tabelle 1D: Reproduzierbarkeit zwischen allen Chargen und allen Laboranten für ausgewählte Probanden-Pools (1, 6, 9 und 10)

Datenkombinationen	Probanden-Pool 1 ($5,1 \times 10^6$ Zellen/ml)			Probanden-Pool 6 ($6,5 \times 10^6$ Zellen/ml)		
	Mittlere Ausbeute (μg)	SD (μg)	VK (%)	Mittlere Ausbeute (μg)	SD (μg)	VK (%)
Charge 1, alle Laboranten	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17

	Probanden-Pool 9 ($8,4 \times 10^6$ Zellen/ml)			Probanden-Pool 10 ($10,2 \times 10^6$ Zellen/ml)		
	Mittlere Ausbeute (μg)	SD (μg)	VK (%)	Mittlere Ausbeute (μg)	SD (μg)	VK (%)
Charge 1, alle Laboranten	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Detaillierte Analyse von 4 repräsentativen Probanden-Pools. Die Pools wurden nach Zellenzahl der Leukozyten ausgewählt und spiegeln die oberen, mittleren und unteren Werte des Normalbereichs der Leukozytenzahlen wider ($4,8 \times 10^6$ bis $1,1 \times 10^7$ Leukozyten/ml). Die Leukozytenzahl ist der Mittelwert von 3 Leukozytenzahlen der 3 Probanden jedes Probanden-Pools.

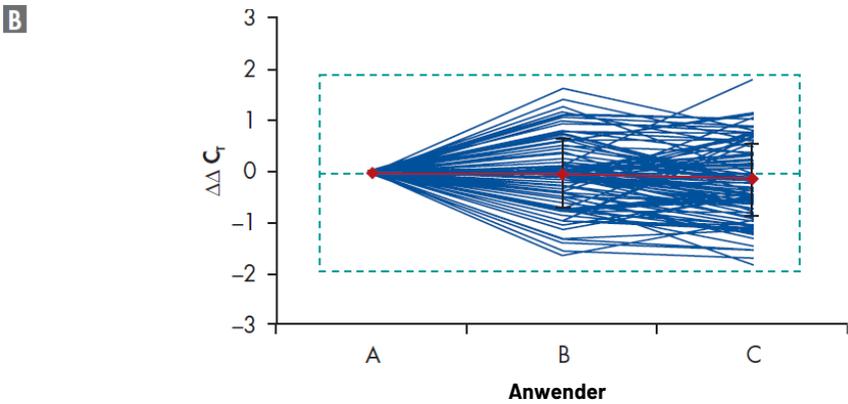
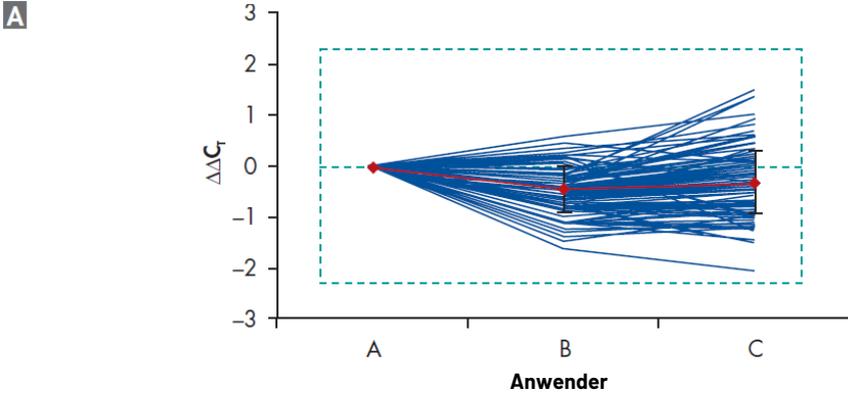


Abbildung 10: Reproduzierbarkeit der RT-PCR – zwischen Anwendern. Die bei dem in Abbildung 9 beschriebenen Experiment wurde aufgereinigte RNA für die Real-time-RT-PCR verwendet. Die relativen Transkriptkonzentrationen von [A] FOS und [B] IL1B wurden durch Real-time-Duplex-RT-PCR unter Verwendung von 18S-rRNA als internem Standard bestimmt. Aufgetragen sind die Werte aller Proben relativ zu den Werten für Laborant A (10 Probanden-Pools \times 3 Kit-Chargen \times 4 Replikate = 120 Datensätze für jedes Gen) mit Mittelwerten (rote Linien) und Standardabweichungen (schwarze Balken) für alle dargestellten Proben. Die unterbrochenen Linien geben den $\pm 3\sigma$ -Bereich der Gesamtpräzision der Assays an (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).

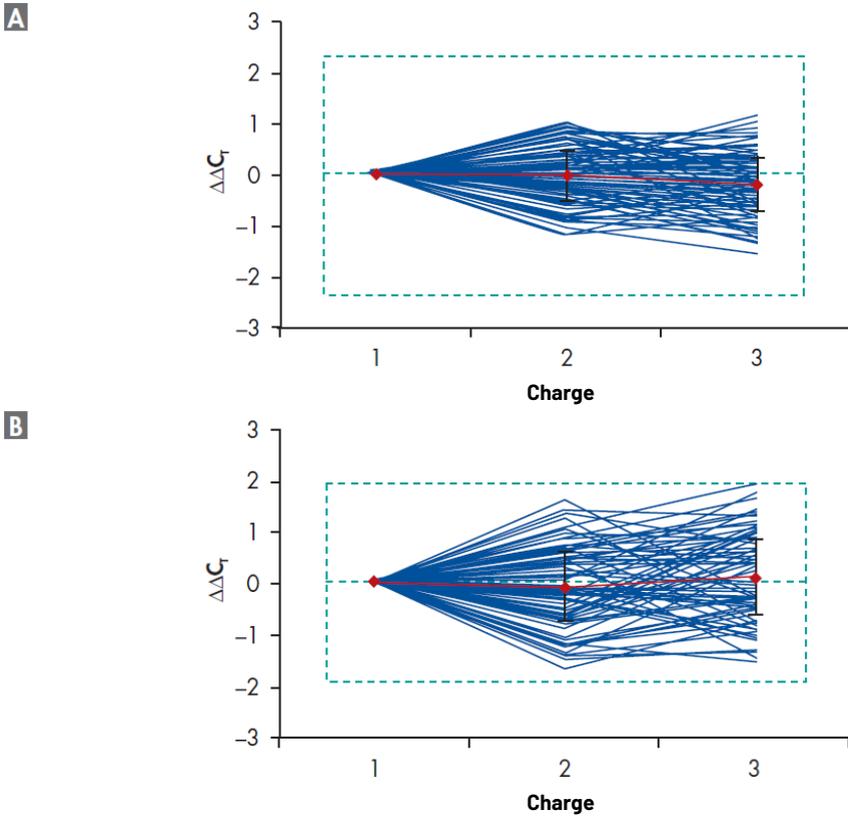


Abbildung 11: Reproduzierbarkeit der RT-PCR – zwischen Kit-Chargen. Die bei dem in Abbildung 9 beschriebenen Experiment wurde aufgereinigte RNA für die Real-time-RT-PCR verwendet. Die relativen Transkriptkonzentrationen von [A] FOS und [B] IL1B wurden durch Real-time-Duplex-RT-PCR unter Verwendung von 18S-rRNA als internem Standard bestimmt. Aufgetragen sind die Werte aller Proben relativ zu den Werten für Kit-Charge 1 (10 Probanden-Pools × 3 Laboranten × 4 Replikate = 120 Datensätze für jedes Gen) mit Mittelwerten (rote Linien) und Standardabweichungen (schwarze Balken) für alle dargestellten Proben. Die unterbrochenen Linien geben den $\pm 3x$ -Bereich der Gesamtpräzision der Assays an (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).

Tabelle 2: Zusammenfassung der RT-PCR-Daten aus Abbildung 10 und 11

Testsystem	FOS/18S-rRNA-Assay		IL1B/18S-rRNA-Assay	
Datenvergleich	Mittelwert ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Mittelwert ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Reproduzierbarkeit für alle Chargen zwischen jedem Laboranten				
Alle Laboranten, Charge 1 – Charge 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Alle Laboranten, Charge 1 – Charge 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Alle Laboranten, Charge 1 – Charge 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Reproduzierbarkeit für alle Chargen zwischen jedem Laboranten				
Alle Chargen, Laborant A – Laborant A	0,00	0,00	0,00	0,00
Alle Chargen, Laborant A – Laborant B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Alle Chargen, Laborant A – Laborant C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Anwender: Techniker(in), der(die) die Studie durchführte.

Charge: Chargennummer des für diese verwendeten Kits.

SD: Standardabweichung.

Gezeigt sind die mittleren $\Delta\Delta C_T$ -Werte (N = 120) und die Standardabweichungen für die in Abbildung 10 und 11 dargestellten Daten.

Automatische RNA-Isolierung

Bei ≥ 95 % der verarbeiteten Proben wird eine RNA-Ausbeute von ≥ 3 μg aus 2,5 ml Vollblut gesunder Probanden erzielt. Abbildung 12 (Seite 57) zeigt die RNA-Ausbeuten aus insgesamt 216 Proben, die mit dem automatischen Protokoll mit 3 Kit-Chargen von 3 Laboranten vorbereitet wurden. Da für diese Studien gepoolte Blutproben und keine individuellen PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) verwendet wurden, spiegeln die Ergebnisse nicht die RNA-Ausbeute wider, die bei einer individuellen Blutprobe eines einzelnen Probanden erwartet werden kann. Da die Ausbeuten stark vom untersuchten Probanden abhängen, können die einzelnen RNA-Ausbeuten variieren (Abbildung 12, Seite 57).

Wenn das Eluat bis zu 30 % des RT-PCR-Reaktionsvolumens ausmacht, zeigen mindestens 95 % der Proben keine Inhibition bei der RT-PCR. Bei Verwendung des automatischen Protokolls konnte keine Kreuzkontamination zwischen Proben nachgewiesen werden. Dies wurde mittels quantitativer Real-time-RT-PCR von Sequenzen der ABL1- und FOS-Transkripte in RNA-negativen Proben (Wasser) gemessen, die mit RNA-positiven Proben (humanes Vollblut) im gleichen Lauf gepaart waren.

RNA, die mit dem PAXgene Blood RNA System und dem automatischen Protokoll isoliert wurde, ist rein, was die fehlende Inhibition der RT-PCR und die A_{260}/A_{280} -Werte zwischen 1,8 und 2,2 zeigen. In $\geq 95\%$ aller Proben ist genomische DNA in einem Anteil $\leq 1\%$ (w/w) vorhanden, wie durch quantitative Real-time-PCR einer Sequenz des Beta-Actin-Gens gemessen wurde. Abbildung 13 und Abbildung 14 (Seite 58) zeigen die A_{260}/A_{280} -Werte sowie den relativen Anteil genomischer DNA von insgesamt 216 Proben, die mit dem automatischen Protokoll mit 3 Kit-Chargen von 3 Laboranten vorbereitet wurden.

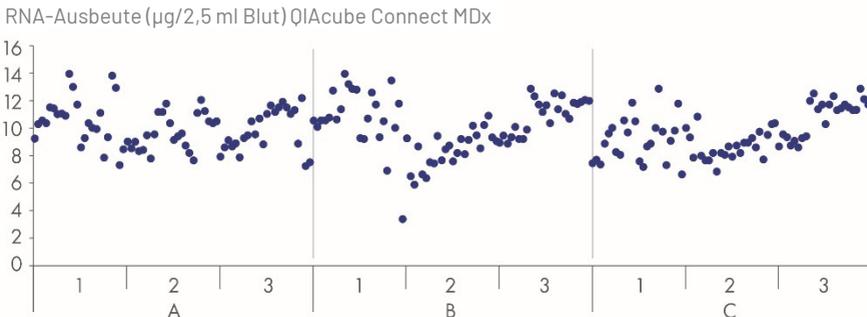


Abbildung 12: RNA-Ausbeute – Automatische Verarbeitung mit dem QIAcube Connect MDx Blutproben von einzelnen Probanden wurden in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen. Der Inhalt der Röhrgchen wurde in 6 Probanden-Pools gepoolt und anschließend wieder aliquotiert. Insgesamt wurden 216 Röhrgchen (d. h. 36 pro Pool) von 3 verschiedenen Laboranten (A, B und C) verarbeitet. Jeder Laborant verwendete PAXgene Blood RNA Kits aus 3 unterschiedlichen Chargen (1, 2 und 3) für die automatische Isolierung mit dem QIAcube Connect MDx und verarbeitete für jeden der 6 Probanden-Pools jeweils vier Replikate. Die RNA-Ausbeuten der einzelnen Proben sind für jede Kombination aus Laborant und Charge dargestellt.

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

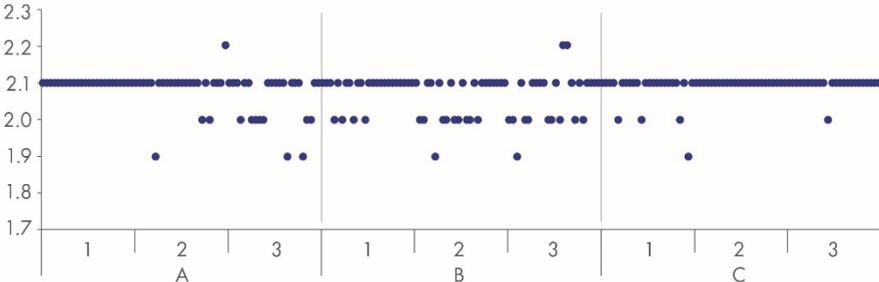


Abbildung 13: RNA-Reinheit (A_{260}/A_{280} -Werte) – automatische Verarbeitung mit dem QIAcube Connect MDx Von 3 Laboranten (A, B und C) wurde unter Verwendung von PAXgene Blood RNA Kits aus 3 unterschiedlichen Chargen (1, 2 und 3) mit dem QIAcube Connect MDx in dem in Abbildung 12 beschriebenen Experiment RNA aufgereinigt. Dargestellt sind die A_{260}/A_{280} -Werte aller individuellen Proben jeder Kombination aus Laborant und Charge.

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

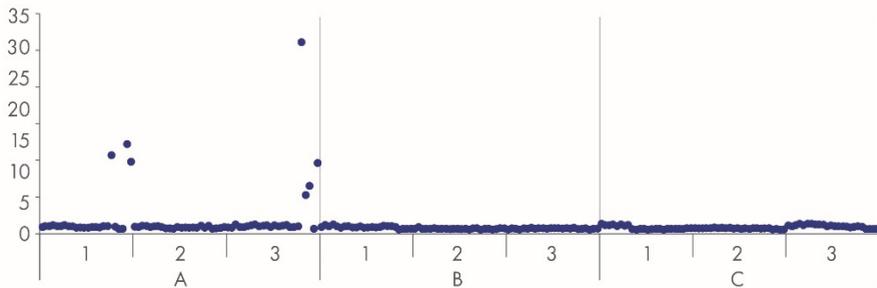


Abbildung 14: RNA-Reinheit (% Kontamination mit genomischer DNA) – automatische Verarbeitung mit dem QIAcube Connect MDx Von 3 Laboranten (A, B und C) wurde unter Verwendung von PAXgene Blood RNA Kits aus 3 unterschiedlichen Chargen (1, 2 und 3) mit dem QIAcube Connect MDx in dem in Abbildung 12 beschriebenen Experiment RNA aufgereinigt. Dargestellt sind die Mengen genomischer DNA (w/w) in allen individuellen Proben jeder Kombination aus Laborant und Charge.

Das automatische Protokoll zur RNA-Isolierung mit dem PAXgene Blood RNA System liefert hochreproduzierbare und wiederholbare RT-PCR-Ergebnisse, was eine hohe Robustheit für klinische diagnostische Tests bedeutet.

Stabilität der isolierten RNA

RNA-Proben, die mit dem PAXgene Blood RNA Kit aus mit Blut gefüllten PAXgene Blood RNA Tubes isoliert wurden, sind 5 Jahre lang bei -20 °C und 7 Jahre lang bei -70 °C haltbar (Endpunkt der Studien).

Wichtige Hinweise

Verwendung des QIAcube Connect MDx

Stellen Sie sicher, dass Sie mit der Bedienung des QIAcube Connect MDx vertraut sind. Lesen Sie bitte das Benutzerhandbuch und alle weiteren mit dem Gerät gelieferten Informationen, und beachten Sie insbesondere die Sicherheitshinweise, bevor Sie mit den automatischen PAXgene Blood RNA Protokollen beginnen.

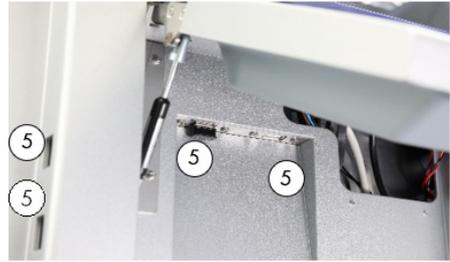
Starten des QIAcube Connect MDx

Schließen Sie die Haube des QIAcube Connect MDx und schalten Sie das Gerät über den Netzschalter ein (siehe Abbildung 15, Seite 61).

Nach einem Signalton wird der Startbildschirm angezeigt. Das Gerät führt automatisch Initialisierungstests durch.



Frontansicht des QIAcube Connect MDx



Herausgezogener Touchscreen



Rückansicht des QIAcube Connect MDx (linke Seite)



Rückansicht des QIAcube Connect MDx (rechte Seite)

Abbildung 15: Externe Komponenten des QIAcube Connect MDx.

- | | |
|--|---|
| <p>① Touchscreen</p> <p>② Haube</p> <p>③ Abfallschublade</p> <p>④ Netzschalter</p> | <p>⑤ 2 USB-Anschlüsse links vom Touchscreen, 2 USB-Anschlüsse hinter dem Touchscreen (an 1 USB-Anschluss ist ein WLAN-Modul angeschlossen)</p> <p>⑥ RJ-45 Ethernet-Port</p> <p>⑦ Netzkabelbuchse</p> <p>⑧ Kühlluftauslass</p> |
|--|---|

Touchscreen

Der QIAcube Connect MDx wird über einen Touchscreen gesteuert. Der Touchscreen erlaubt dem Anwender die Bedienung des Geräts und führt ihn durch die Einrichtung der Arbeitsplattform. Während der Probenverarbeitung zeigt der Touchscreen den Protokollstatus und die verbleibende Zeit an.



Abbildung 16: Herausgezogener Touchscreen des QIAcube Connect MDx

Installieren von Protokollen auf dem QIAcube Connect MDx

Bevor Sie den ersten RNA-Vorbereitungslauf auf einem QIAcube Connect MDx durchführen können, ist ggf. erst eine Protokollinstallation erforderlich. Installieren Sie die beiden Protokolle „PAXgene Blood RNA Part A“ und „PAXgene Blood RNA Part B“.

Protokolle für den QIAcube Connect MDx sind unter **www.qiagen.com** verfügbar und müssen auf den im Lieferumfang des Geräts enthaltenen USB-Stick heruntergeladen werden. Diese Protokolle werden über den USB-Anschluss auf das Gerät übertragen.

Über den USB-Port, der sich seitlich am Touchscreen befindet (siehe Abbildung 15 auf Seite 61), kann der QIAcube Connect MDx mit dem im Lieferumfang des Geräts enthaltenen USB-Stick verbunden werden. Über den USB-Anschluss können auch Dateien, z. B. Protokoll- oder Berichtdateien, vom Gerät auf den USB-Stick übertragen werden.



Der USB-Anschluss kann nur mit dem von QIAGEN bereitgestellten USB-Stick verwendet werden. Schließen Sie keine anderen Geräte an diesen Anschluss an.



Entfernen Sie den USB-Stick nicht, während Protokolle heruntergeladen oder Datendateien übertragen werden oder ein Protokoll ausgeführt wird.

Weitere Details zum Prozess des Hochladens von Protokollen auf den QIAcube Connect MDx finden Sie im Handbuch zum Gerät.

Beladen des QIAcube Connect MDx

Um Zeit zu sparen, kann das Beladen auch während einer oder beider der 10-minütigen Zentrifugationsschritte (Schritt 3 und 5) in „Protokoll: Automatische Isolierung von Gesamt-RNA aus humanem Vollblut, das in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen wurde“, Seite 34, erfolgen.

Reagenzflaschen

Füllen Sie vor jedem Lauf auf dem QIAcube Connect MDx die 4 Reagenzflaschen mit den in Tabelle 3 (Seite 64) aufgeführten Reagenzien sorgfältig bis zur Maximalmarkierung oder, falls dies unmöglich ist, bis zu dem Niveau, das die mit dem PAXgene Blood RNA Kit gelieferten Puffervolumen zulassen. Beschriften Sie die Flaschen und Deckel mit den Puffernamen und setzen Sie die gefüllten Reagenzflaschen in die richtigen Positionen des Reagenzflaschengestells. Stellen Sie das Gestell auf die Arbeitsplattform des Geräts (wie in Abbildung 17 und 18, Seite 64 und 65 dargestellt).



Das mitgelieferte Volumen des Puffers BR2 füllt eine Reagenzflasche nicht bis zur Markierung. Die Puffer BR3 und BR4 reichen ggf. nicht aus, um die Flasche bis zur Markierung zu füllen, nachdem mehrere Proben in vergangenen Läufen verarbeitet wurden.

-  Vergewissern Sie sich, dass die Deckel der Flaschen entfernt wurden, bevor Sie diese auf die Arbeitsplattform stellen.
-  Die Puffervolumen im PAXgene Blood RNA Kit (50) reichen für maximal 7 RNA-Vorbereitungsläufe mit 2 bis 12 Proben pro Lauf auf dem QIAcube Connect MDx aus. Generell gilt, dass Läufe mit einer kleinen Anzahl von Proben pro Lauf vermieden werden sollten, damit insgesamt 50 Proben pro Kit verarbeitet werden können. Mehr als 7 RNA-Vorbereitungsläufe könnten dazu führen, dass für die Verarbeitung der letzten Proben keine ausreichenden Puffermengen mehr zur Verfügung stehen.

Tabelle 3: Positionen im Reagenzflaschengestell

Position	Reagenz
1	Bindungspuffer (BR2)
2	Ethanol (96-100 % v/v)
3	Waschpuffer 1 (BR3)
4	Waschpuffer 2 (BR4)*
5	– (bleibt leer)
6	– (bleibt leer)

* Waschpuffer 2 (BR4) wird als Konzentrat geliefert. Vor der ersten Verwendung geben Sie, wie auf der Flasche angegeben, das 4-fache Volumen Ethanol (96-100 % v/v, Reinheitsgrad p.a.) hinzu, um eine gebrauchsfertige Arbeitslösung herzustellen.

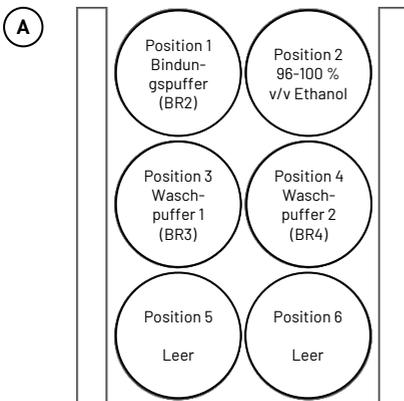


Abbildung 17: Beladen des Reagenzflaschengestells [A] Schematische Darstellung der Positionen und des Inhalts der Flaschen im Reagent Bottle Rack **[B]** Einsetzen des Gestells in den QIAcube Connect MDx

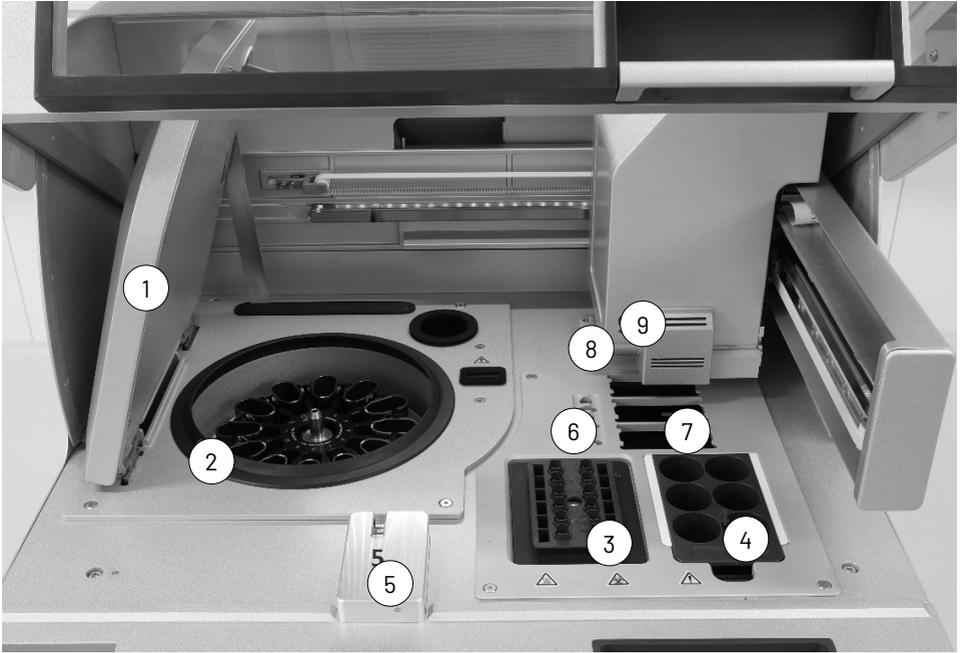


Abbildung 18: Innenansicht des QIAcube Connect MDx

- | | | | |
|---|---|---|---|
| ① | Zentrifugendeckel | ⑥ | MCT-Stellplätze |
| ② | Zentrifuge | ⑦ | 3 Stellplätze für Pipettenspitzen-
gestelle |
| ③ | Schüttler | ⑧ | Entsorgungskanäle für Pipettenspitzen und Spin-
Säulen |
| ④ | Reagenzflaschengestell | ⑨ | Roboterarm (einschließlich Einkanalpipettierer, Greifer,
Ultraschall- und optischem Sensor und UV-LED) |
| ⑤ | Pipettenspitzensensor und
Haubenverriegelung | | |

Spin-Säulen (PSC, PRC), MCT und Kunststoffartikel für den QIAcube Connect MDx

Setzen Sie 2 Pipettenspitzen in den QIAcube Connect MDx (siehe Abbildung 18 auf Seite 65). Füllen Sie die Gestelle mit Spitzen auf, wenn erforderlich.

i Verwenden Sie nur die 1.000- μ l-Pipettenfilterspitzen, die zur Verwendung mit dem QIAcube Connect MDx vorgesehen sind.

Beschriften Sie die Rotoradapter und MCTs für jede Probe mit einem geeigneten wasserfesten Stift. Öffnen Sie die benötigten PSCs und schneiden Sie mit einer Schere die Deckel vollständig ab (siehe Abbildung 19).

i Für einen sachgemäßen Betrieb des Roboterarms im QIAcube Connect MDx müssen die Deckel und alle Verbindungsstege zu den PSCs vollständig entfernt (abgeschnitten) werden (siehe Abbildung 19). Andernfalls kann der Roboterarm das PSC nicht wie vorgesehen greifen.

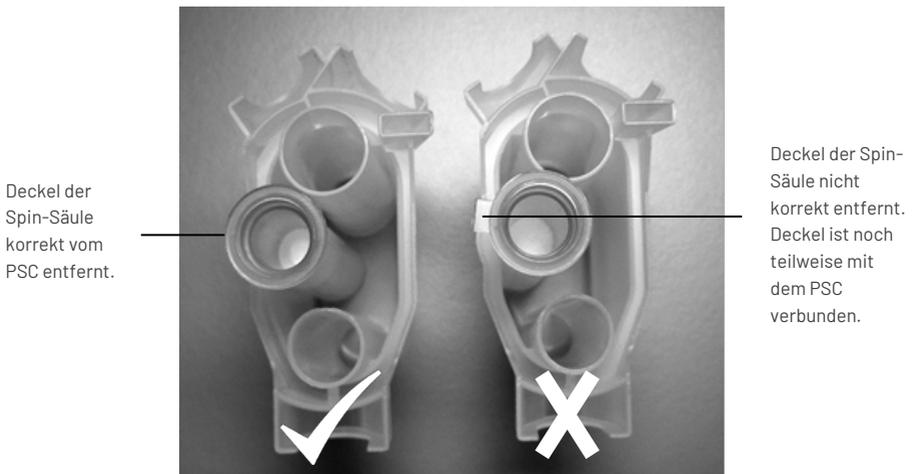


Abbildung 19: Einsetzen des PSC. Das PSC wird in die mittlere Position des Rotoradapters eingesetzt. Schneiden Sie den Deckel des PSC ab, bevor Sie die Säule einsetzen.

Setzen Sie die PSC (ohne Deckel, siehe Abbildung 19 auf Seite 66), die PRC und das beschriftete MCT wie in Tabelle 4 und Abbildung 20 dargestellt in die entsprechenden Positionen die verschiedenen, beschrifteten Rotoradapter ein.



Vergewissern Sie sich, dass die Deckel der Spin-Säule (PRC) und des MCT bis ganz nach unten in die Schlitze an den Rändern des Rotoradapters hineingeschoben sind, da sie andernfalls bei der Zentrifugation abbrechen können.

Tabelle 4: Kunststoff-Verbrauchsartikel im Rotoradapter

Position	Reagenz	Deckelposition
1	PAXgene RNA Spin Column (rot, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder Spin-Säule (lila, PSC)(Deckel vor Einsetzen in Rotoradapter abschneiden)	-
3	MCT*	L3

* Verwenden Sie die MCTs (1,5 ml), die im PAXgene Blood RNA Kit enthalten sind.

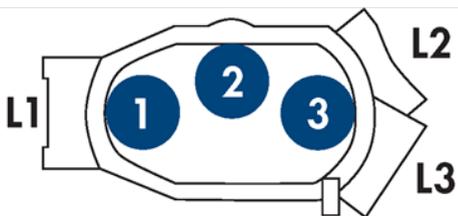


Abbildung 20: Positionen im Rotoradapter. Der Rotoradapter weist 3 Röhrenpositionen (1–3) und drei Deckelpositionen (L1–L3) auf.

Beladen der Zentrifuge

Setzen Sie die bestückten Rotoradapter wie in Abbildung 21 unten dargestellt in die Zentrifugenbecher des QIAcube Connect MDx ein.



Wenn Sie weniger als 12 Proben verarbeiten, stellen Sie sicher, dass der Zentrifugenrotor radial unwuchtfrei beladen wird (siehe Abbildung 22, Seite 69). Vor dem Start eines Protokolllaufs müssen auch dann alle Zentrifugenbecher eingesetzt werden, wenn weniger als 12 Proben verarbeitet werden sollen. Eine einzige (eine) Probe oder 11 Proben können nicht verarbeitet werden.



Abbildung 21: Beladen der Zentrifuge beim QIAcube Connect MDx Setzen Sie die bestückten Rotoradapter in die Zentrifugenbecher.

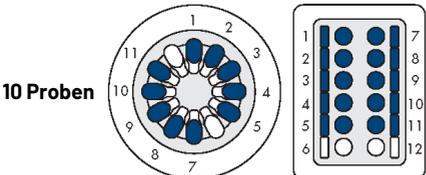
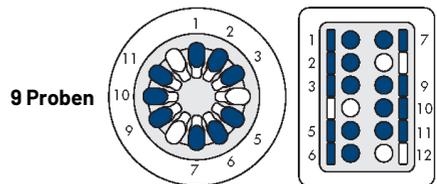
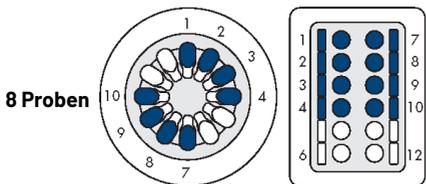
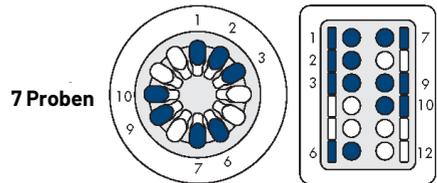
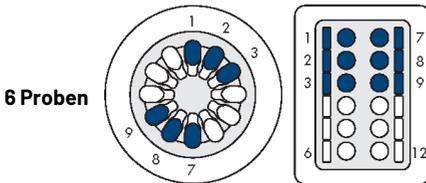
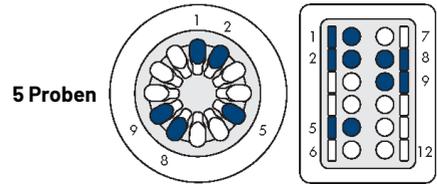
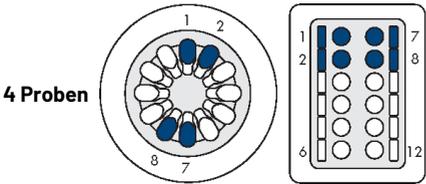
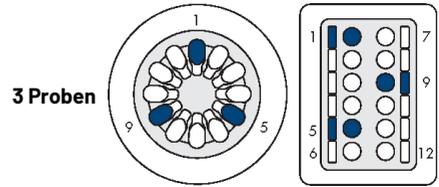
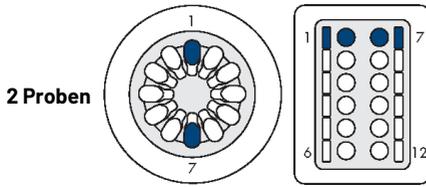


Abbildung 22: Beladen von Zentrifuge und Schüttler Dargestellt sind die Positionen in Zentrifuge und Schüttler zum Verarbeiten von zwei (2) bis zehn (10) Proben. Nicht verarbeitet werden können eine (1) oder 11 Proben. Zur Verarbeitung von 12 Proben werden alle Positionen in Zentrifuge und Schüttler beladen (nicht abgebildet).

Reaktionsröhrchen

Entfernen Sie alle noch von vergangenen Läufen in den Stellplätzen für MCTs vorhandenen PTs (siehe Abbildung 18, Seite 65). Füllen Sie 3 PTs mit den in Tabelle 5 aufgeführten Reagenzmengen entsprechend der Probenzahl in diesem Lauf.

Pipettieren Sie für die DNase-I-Inkubationsmischung das angegebene Volumen DNA-Verdaupuffer (RDD) in ein PT und geben Sie das angegebene Volumen DNase-I-Stammlösung (RNFD) hinzu. Mischen Sie vorsichtig, indem Sie die ganze Mischung mit einer 1.000- μ l-Pipettenspitze dreimal auf und ab pipettieren.

 Verwenden Sie die 2-ml-PTs, die im PAXgene Blood RNA Kit enthalten sind. Beschriften Sie die Röhrchen gut lesbar mit den Reagenznamen und setzen Sie sie wie in Tabelle 6 (Seite 71) angegeben in die vorgesehenen MCT-Stellplätze ein.

 DNase I (RNFD) ist besonders anfällig für physikalische Denaturierung. Mischen Sie nur durch Pipettieren mit Pipettenspitzen mit weiter Öffnung, um Scherkräfte zu reduzieren. Verwenden Sie keinen Vortexer.

Stellen Sie sicher, dass nur das benötigte, in der folgenden Tabelle 5 angegebene Volumen pipettiert wird.

Tabelle 5: Benötigte Reagenzvolumen in PTs für die MCT-Stellplätze

Anzahl Proben	Reagenzvolumen für die angegebene Anzahl Proben (µl)		
	Proteinase K (PK)	DNase-I-Inkubationsmischung	Elutionspuffer (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

Tabelle 6: MCT-Stellplätze

	Position		
	A	B	C
Inhalt	Proteinase K	DNase-I-Inkubationsmischung	Elutionspuffer (BR5)
Gefäß	Reaktionsröhrchen*	Reaktionsröhrchen*	Reaktionsröhrchen*

* Verwenden Sie die 2-ml-PTs, die im PAXgene Blood RNA Kit enthalten sind.

Entsorgung

Informationen zur sicheren Entsorgung nach der Probenentnahme und manuellen RNA-Isolierung finden Sie in den Sicherheitshinweisen und Vorsichtsmaßnahmen auf Seite 19 und 20.

Darüber hinaus finden Sie Informationen zur automatischen RNA-Isolierung mit dem QIAcube Connect MDx in Abbildung 21 und Abbildung 22, Seite 68 bzw. 69, die die vorgesehenen Stellplätze für gebrauchte Spitzen und Säulen für die Entsorgung angeben.

Literaturhinweise

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.

Hilfe zur Fehlerbehebung

In diesem Abschnitt zur Fehlerbehebung finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Weitere Informationen finden Sie auf der Seite „Häufig gestellte Fragen“ (Frequently Asked Questions, FAQ) unseres Support-Centers unter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Die Wissenschaftler des Technischen Service von QIAGEN helfen Ihnen bei allen Fragen zum Protokoll oder zu anderen Angaben in diesem Handbuch bzw. zu Proben- und Assay-Technologien gerne weiter (Kontaktinformationen siehe letzte Seite oder unter www.qiagen.com).

Kommentare und Vorschläge	
RNA ist abgebaut	
a) RNase-Kontamination	 Achten Sie sorgfältig darauf, dass Sie bei der Verarbeitung oder späteren Handhabung keine RNasen in die Reagenzien einschleppen (siehe Anhang A auf Seite 79).
Zu niedrige RNA-Ausbeute	
b) Weniger als 2,5 ml Blut in das PAXgene Blood RNA Tube (BRT) entnommen	 Stellen Sie sicher, dass 2,5 ml Blut in die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen wird (siehe <i>PAXgene Blood RNA Tube Handbuch</i>).
c) RNA-Konzentration in Wasser gemessen	 Die RNA muss in 10 mM Tris-HCl bei pH 7,5* verdünnt werden, damit eine genaue Quantifizierung möglich ist (siehe Anhang B auf Seite 81).
d) Zelltrümmer in Schritt 9 und 10 des manuellen Protokolls in PRC überführt	 Vermeiden Sie beim Pipettieren des Überstands in Schritt 7 des manuellen Protokolls, größere Partikel zu überführen (Überführung kleiner Zelltrümmer beeinträchtigt die Verarbeitung nicht).
e) Überstand in Schritt 3 nicht vollständig entfernt	 Stellen Sie sicher, dass der gesamte Überstand entfernt wird. Wenn der Überstand dekantiert wird, entfernen Sie am Rand des PAXgene Blood RNA Tube (BRT) anhaftende Tröpfchen durch Abtupfen auf einem Papiertuch. Führen Sie angemessene Vorsichtsmaßnahmen durch, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
f) Nach Entnahme in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) wurde das Blut weniger als 2 h inkubiert	 Inkubieren Sie das Blut nach der Entnahme in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mindestens 2 h lang.

* Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen sind den relevanten Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS) zu entnehmen, die Sie vom jeweiligen Produkthersteller beziehen können.

Kommentare und Vorschläge	
Niedriger A_{260}/A_{280}-Wert	
g) Zum Verdünnen der RNA für die A_{260}/A_{280} -Messung wurde Wasser verwendet	 <p>Verwenden Sie 10 mM Tris-HCl bei pH 7,5, um die RNA vor dem Messen der Reinheit zu verdünnen* (siehe Anhang B auf Seite 81).</p>
h) Nullpunkt des Spektralphotometers nicht richtig eingestellt	 <p>Stellen Sie den Nullpunkt des Spektralphotometers mit einer Leerprobe ein, welche die gleichen Anteile Elutionspuffer (BR5) und 10 mM Tris-HCl bei pH 7,5 enthält wie die zu messenden Proben. Der Elutionspuffer (BR5) absorbiert stark bei 220 nm, was zu hohen Hintergrundabsorptionswerten führen kann, wenn der Nullpunkt des Spektralphotometers nicht sachgemäß eingestellt wurde.</p>
Gerätefehler	
i) QIAcube Connect MDx funktionierte nicht ordnungsgemäß	<p>Lesen Sie bitte sorgfältig das <i>QIAcube Connect MDx Benutzerhandbuch</i> und insbesondere den Abschnitt „Hilfe zur Fehlerbehebung“. Stellen Sie sicher, dass das Gerät wie im Benutzerhandbuch beschrieben ordnungsgemäß gewartet wird.</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.

Symbole

Die folgenden Symbole können in der Gebrauchsanweisung oder auf der Verpackung und Kennzeichnung verwendet werden: Weitere Symbole sind in Kit-Inhalt (Seite 6) beschrieben.

Symbol	Bedeutung des Symbols
V<N1>	Version <N1> des Produkts
 <N2>	Enthält Reagenzien für <N2> Tests
	Gebrauchsanweisung beachten
	Verfallsdatum
IVD	In-vitro-Diagnostikum
REF	Katalognummer
LOT	Chargennummer
MAT	Materialnummer
COMP	Komponenten
NUM	Anzahl
KU	Kunitz-Einheiten
ADD	Hinzugeben
CONT	Enthält

RCNS

Rekonstituiert

DNase

Desoxyribonuklease I

EtOH

Ethanol

GITC

Guanidinisothiocyanat

RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

GTIN

Global Trade Item Number (GTIN)



Zulässiger Temperaturbereich



Obere Temperaturgrenze



Hersteller

EC REP

Autorisierte Vertretung in der EU gemäß Verordnung (EU) 2017/746



Wichtiger Hinweis



Zugabe von Ethanol



CE-Kennzeichnung. Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen der Verordnung (EU) 2017/746 über In-vitro-Diagnostika.

UDI

Unique Device Identifier (eindeutige Geräteerkennung)



Vorsicht



WARNUNG: Heiße Oberflächen

Kontakt

Bei QIAGEN legen wir besonderen Wert auf eine hohe Qualität und Verfügbarkeit unseres Technischen Service. Hier stehen Ihnen erfahrene Wissenschaftler für Ihre Fragen zu PreAnalytiX Produkten gerne zur Verfügung. Bitte wenden Sie sich an uns, wenn Sie Fragen zum PAXgene Blood RNA Kit haben.

Technische Hinweise und weitere Informationen finden Sie in unserem technischen Support-Center unter **www.qiagen.com/Support**. Telefonisch erreichen Sie uns unter der Rufnummer 00800-22-44-6000, oder wenden Sie sich an eine der technischen Serviceabteilungen von QIAGEN oder an örtliche Händler (siehe hintere Umschlagseite oder **www.qiagen.com**).

Anhang A: Allgemeine Hinweise zur Handhabung von RNA

Handhabung von RNA



Ribonukleasen (RNasen) sind sehr stabile und aktive Enzyme, die üblicherweise keine Cofaktoren für ihre Funktion benötigen. Da RNasen schwer zu deaktivieren sind und schon winzige Mengen ausreichen, um RNA abzubauen, muss für Artikel aus Glas oder Kunststoff vor der Verwendung eine mögliche RNase-Kontamination eliminiert werden. Es muss genau darauf geachtet werden, dass während und nach dem Isolierungsverfahren keine RNase unbeabsichtigt in die RNA-Probe eingeschleppt wird. Um ein RNase-freies Umfeld zu schaffen und zu erhalten, müssen bei der Arbeit mit RNA folgende Vorsichtsmaßnahmen bei der Vorbehandlung und bei der Verwendung von Einmal-Gefäßen und Mehrweg-Behältern und Lösungen eingehalten werden.

Allgemeine Handhabung



Beim Arbeiten mit RNA sollten immer angemessene mikrobiologische und aseptische Arbeitsweisen verwendet werden. An Händen und Staubpartikeln können Bakterien und Schimmelpilze haften. Sie sind die häufigste Ursache für eine RNase-Kontamination. Tragen Sie daher immer Latex- oder Vinylhandschuhe, wenn Sie mit Reagenzien oder RNA-Proben arbeiten, um eine RNase-Kontamination über die Hautoberfläche oder durch staubige Laborgeräte zu vermeiden. Wechseln Sie die Einmal-Handschuhe häufig und halten Sie Röhrchen möglichst immer verschlossen. Halten Sie die aufgereinigte RNA auf Eis, wenn Sie sie für nachfolgende Applikationen Aliquote pipettieren.

Protokolle zum Entfernen von Kontaminationen mit RNase von Glasartikeln und aus Lösungen finden Sie in allgemeinen molekularbiologischen Lehrbüchern, wie beispielsweise Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Anhang B: Quantifizierung und Qualitätsbestimmung der Gesamt-RNA

Quantifizierung der Gesamt-RNA

Die Konzentration von RNA kann durch Messen der Absorption bei 260 nm (A_{260}) in einem Spektralphotometer bestimmt werden. Um die Signifikanz der Messwerte zu gewährleisten, müssen sie im linearen Bereich des Spektralphotometers liegen. Eine Extinktion von 1 OD bei 260 nm entspricht 44 µg RNA pro ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$). Diese Gleichung gilt nur für Messungen in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5*. Falls die RNA-Probe verdünnt werden muss, muss dies daher in 10 mM Tris-HCl erfolgen. Wie weiter unten beschrieben (siehe „Reinheit der RNA“, Seite 82), liefert das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und bei 280 nm eine Schätzung der Reinheit der RNA. Stellen Sie beim Messen der RNA-Proben sicher, dass die Küvetten RNase-frei sind. Stellen Sie den Nullpunkt des Spektralphotometers mit einer Leerprobe ein, welche die gleichen Anteile Elutionspuffer (BR5) und Tris-HCl-Puffer enthält wie die zu messenden Proben. Der Elutionspuffer (BR5) absorbiert stark bei 220 nm, was zu hohen Hintergrundabsorptionswerten führen kann, wenn der Nullpunkt des Spektralphotometers nicht sachgemäß eingestellt wurde. Beispiel für die Berechnung der RNA-Quantifizierung.

Volumen der RNA-Probe =	80 µl
Verdünnung (1/15)	= 10 µl RNA-Probe + 140 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Absorptionsmessung der verdünnten Probe in einer RNase-freien Küvette.	
A_{260}	= 0,3
Konzentration der Probe =	$44 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$
	= $44 \times 0,3 \times 15$
	= 198 µg/ml
Gesamt-Ausbeute	= Konzentration \times Probenvolumen in Milliliter
	= 198 µg/ml \times 0,08 ml
	= 15,8 µg RNA

* Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen sind den relevanten Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS) zu entnehmen, die Sie vom jeweiligen Produkthersteller beziehen können.

Reinheit der RNA

Das Verhältnis der Messwerte bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) liefert eine Schätzung der Reinheit der RNA hinsichtlich von Verunreinigungen, die im UV-Bereich absorbieren, wie z. B. Protein. Das A_{260}/A_{280} -Verhältnis ist jedoch stark vom pH-Wert abhängig. Ein niedriger pH-Werte führt zu einem geringeren A_{260}/A_{280} -Verhältnis und einer reduzierten Sensitivität für Proteinkontamination.* Wir empfehlen, die Absorption in 10 mM Tris-HCl bei pH 7,5 zu messen, um genaue Werte zu erhalten. Reine RNA weist in 10 mM Tris-HCl bei pH 7,5 ein A_{260}/A_{280} -Verhältnis von 1,8 bis 2,2 auf. Stellen Sie den Nullpunkt des Spektralphotometers mit einer Leerprobe ein, welche die gleichen Anteile Elutionspuffer (BR5) und Tris-HCl-Puffer enthält wie die zu messenden Proben. Der Elutionspuffer (BR5) absorbiert stark bei 220 nm, was zu hohen Hintergrundabsorptionswerten führen kann, wenn der Nullpunkt des Spektralphotometers nicht sachgemäß eingestellt wurde.

* 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.

Anhang C: Handhabung der PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Die folgenden Empfehlungen von BD können für die Handhabung der PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) hilfreich sein. Weitere Informationen zu den PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) finden Sie im *PAXgene Blood RNA Tube Handbuch*.

Anweisungen zum Entfernen des BD Hemogard-Deckels

1. Greifen Sie die PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mit einer Hand, wobei Sie den Daumen unter den BD Hemogard-Deckel platzieren. (Weitere Stabilität erreichen Sie, wenn Sie Ihren Arm auf einer festen Unterlage abstützen.) Drehen Sie mit der anderen Hand den BD Hemogard-Deckel, während Sie gleichzeitig mit dem Daumen nach oben drücken, bis sich der Stopfen im Röhrchen löst.
2. Nehmen Sie den Daumen weg, bevor Sie den Deckel abheben. Heben Sie den Deckel nicht mit dem Daumen vom PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ab. Vorsicht: Wenn Blut im PAXgene Blood RNA Tube (BRT) enthalten ist, besteht Expositionsgefahr. Um eine Verletzung beim Entfernen des Deckels zu vermeiden, ist es wichtig, dass der Daumen, mit dem der Verschluss nach oben gedrückt wird, keinen Kontakt mehr mit dem PAXgene Blood RNA Tube (BRT) hat, sobald der BD Hemogard-Deckel gelöst worden ist.
3. Heben Sie den Deckel vom PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ab. In dem unwahrscheinlichen Fall, dass sich die Kunststoff-Kappe vom Gummistopfen löst, versuchen Sie nicht, den Verschluss wieder zusammenzusetzen. Entfernen Sie vorsichtig den Gummistopfen vom PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Anweisungen zum Einsetzen des sekundären BD Hemogard-Deckels

1. Bringen Sie den Deckel wieder auf dem PAXgene Blood RNA Tube (BRT) an.
2. Drehen Sie unter gleichzeitigem Drücken, bis der Stopfen wieder ganz sitzt. Ein vollständiges Wiedereinsetzen des Stopfens ist nötig, damit der Deckel beim Handhaben des PAXgene Blood RNA Tube (BRT) sicher verschlossen bleibt.

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene RNA Spin Columns, 50 PAXgene Shredder Spin Columns, Reaktionsröhrchen, RNase-freie DNase I, RNase-freie Reagenzien und Puffer. Zur Verwendung mit den PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 Blutentnahmeröhrchen	762165
Bei QIAGEN bestellbare zugehörige Produkte für die automatisierte RNA-Isolierung auf dem QIAcube		
Starter Pack, QIAcube	Lieferumfang des Pakets: Reagent Bottle Rack (Reagenzflaschengestell)(3); Etikettenstreifen für Gestelle (8); 200-µl-Filter-Tips (1.024); 1.000-µl-Filter-Tips (1.024); 1.000-µl-Filter-Tips mit weiter Öffnung (1.024); 30-ml-Reagenzflaschen (18); Rotoradapter (240); Rotor Adapter Holder	990395
Filter-Tips, 1.000 µL (1024)	Sterile Einmal-Filterspitzen in Gestell	990352
Reagent Bottles, 30 mL (6)	Reagenzflaschen (30 ml) mit Deckel; 6er-Packung; zur Verwendung mit dem Reagent Bottle Rack des QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	Für 240 Präparationen: 240 Einweg-Rotoradapter; zur Verwendung mit QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Gestell zur Aufnahme von 6 x 30-ml-Reagenzflaschen auf der QIAcube Arbeitsplattform	9026197
Rotor Adapter Holder	Halter für 12 Einmal-Rotoradapter; zur Verwendung mit QIAcube	990392
Bei BD bestellbare zugehörige Produkte für die Blutentnahme mit PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)*		
BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set	21G, 0,75-Zoll-Kanüle (0,8 x 19 mm), 12-Zoll-Schlauch (305 mm) mit Luer-Adapter; 50 pro Box, 200 pro Verpackungseinheit	367286/367281

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set	21G 3/4-Zoll-Kanüle (0,8 × 19 mm), 12-Zoll-Schlauch (305 mm) mit Luer-Adapter. 50/Packung, 200/Karton	367344
BD Vacutainer One-Use Holder	Verpackungseinheit nur für Durchmesser von 13 mm und 16 mm; 1.000 pro Verpackungseinheit	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 × 75 mm, 4,0-ml-Sog, mit rotem BD Hemogard-Deckel und Papieretikett; 100/Schachtel, 1.000/Karton	368975/367812
BD Vacutainer EST Tube	13 × 75 mm, 3,0-ml-Sog, mit transparentem BD Hemogard Deckel und transparentem Deckel; 100/Schachtel, 1.000/Karton	362725
BD Vacutainer No Additive (Z) Tube	13 × 75 mm, 3,0-ml-Sog, mit transparentem BD Hemogard-Deckel und Papieretikett; 100/Schachtel, 1.000/Karton	366703

* Dieses Blutentnahmezubehör sind typische Produkte, die für PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) verwendet werden können. Weitere Informationen zu diesem Zubehör und zu seiner Bestellung finden Sie im Internet unter www.preanalytix.com.

Revisionsverlauf des Dokuments

Datum	Änderungen
[R1] April 2022	IVDR-Erstversion
[R2] Februar 2023	Anschrift der PreAnalytiX GmbH von „Feldbachstrasse“ zu „Garstligweg 8“ geändert. BD-Produkte in Bestellinformationen aufgenommen. Sicherheitshinweise aktualisiert.

Hinweise



Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Hinweise finden Sie jeweils im PreAnalytiX oder QIAGEN Kit-Handbuch oder in den Gebrauchsanweisungen. Handbücher und Gebrauchsanweisungen zu PreAnalytiX und QIAGEN-Kits sind unter www.preanalytix.com und www.qiagen.com abrufbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

**Better samples
More to explore**



Mehr erfahren unter: www.preanalytix.com

HB-3009-002 02/2023