

2023 年 2 月

# PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA Kit (手册) 使用说明



第 3 版 (V3)

IVD

供体外诊断使用



REF

762174

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



由 QIAGEN<sup>®</sup> GmbH 为 PreAnalytiX GmbH 生产

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, 德国

R2

MAT

1130774ZHCN

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

PreAnalytiX GmbH, 8634 Hombrechtikon, CH。

© 2023 PreAnalytiX GmbH。除非另有说明，PreAnalytiX、PreAnalytiX 标志和其他所有商标均为 PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH 的财产。

### **PAXgene Blood RNA Kit 有限许可协议**

使用本产品表示本产品的任何购买者或使用者同意遵循如下条款：

1. 使用本产品时必须遵守本产品随附的方案和本手册，且本产品仅供与试剂盒中包含的组份配套使用。除了本产品随附的方案、本手册以及 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) 和 [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) 上提供的其他方案中所述的情况，PreAnalytiX® 并未在其任何知识产权下许可将本检测板的所含组件与本检测板中未包含的任何组件协同使用或者相整合。
2. 除非相关许可明确说明，否则 PreAnalytiX 并不保证本试剂盒和/或其使用不会侵犯第三方的权利。
3. 本试剂盒为一次性用品，不可重复使用、翻新或转卖。
4. 除了明确陈述的许可外，PreAnalytiX 否认提供任何其他明示或暗示许可。
5. 本试剂盒的购买者和使用者同意不采取、也不允许其他人采取任何步骤来实施或推动实施以上禁止的任何行为。
6. 为行使本“有限许可协议”条款的规定内容或者保护本试剂盒和/或其组分的知识产权，PreAnalytiX 可能会在法庭上执行本协议的相关禁令，并追讨所有调查和诉讼费用（包括律师费）。

如需获得更新的许可条款，请访问 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) 和 [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)。

HB-3009-002 BD-8945 1130774ZHCN © 2023 PreAnalytiX GmbH，保留所有权利。

## **PreAnalytiX 经销商**

PreAnalytiX 产品由 QIAGEN 或 BD 为 PreAnalytiX 生产和经销。

# 目录

目录 .....	3
预期用途 .....	6
预期用户 .....	6
描述与原理 .....	7
简介 .....	7
原理和步骤 .....	7
样本采集与稳定 .....	7
RNA 分离 .....	8
手动 RNA 分离 .....	8
自动 RNA 分离 .....	10
提供的材料 .....	13
试剂盒内容物 .....	13
试剂盒组件 .....	14
使用者应自备的材料 .....	15
所有操作方案用材 .....	15
手动操作方案用材 .....	15
自动操作方案用材 .....	16
警告与预防措施 .....	17
安全信息 .....	17
紧急情况应对信息 .....	17
预防措施 .....	18
试剂的存放与处理 .....	21

使用中稳定性.....	21
标本采集、存储和处理.....	22
方案：从 PAXgene Blood RNA Tubes 采集的人体全血中手动分离总 RNA .....	23
方案：从 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 采集的人体全血中自动分离总 RNA .....	29
产品使用限制.....	35
质量控制.....	35
性能特点.....	36
样本采集与稳定.....	36
手动 RNA 分离.....	41
自动 RNA 分离.....	49
分离的 RNA 的稳定.....	52
重要事项.....	53
使用 QIAcube Connect MDx .....	53
开启 QIAcube Connect MDx .....	53
在 QIAcube Connect MDx 上安装操作方案 .....	55
加载 QIAcube Connect MDx .....	56
离心柱 (PSC, PRC)、MCT 和 QIAcube Connect MDx 塑料器具 .....	59
处置.....	65
参考文献.....	66
故障排除向导.....	67
符号.....	69
联系信息.....	71
附录 A：有关 RNA 处理的一般说明 .....	72
附录 B：总 RNA 的定量和质量测定 .....	73

附录 C: PAXgene Blood RNA Tubes(BRT) 的处理 .....	75
订购信息 .....	77
文档修订历史 .....	79

# 预期用途

供体外诊断使用。

PAXgene Blood RNA System 由血液采样管 (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) 和核酸纯化试剂盒 (PAXgene Blood RNA Kit) 组成。它旨在用于在封闭的试管中进行血液的采样、存储和运送以及细胞内 RNA 的稳定化，然后从全血中分离和纯化宿主 RNA，以用于在分子诊断测试中进行 RT-PCR。

仅使用 FOS 和 IL1B 基因转录物建立了 PAXgene Blood RNA System 的性能特点。用户需负责为其他目标转录物建立适当的 PAXgene Blood RNA System 性能特点。

## 使用说明

PAXgene Blood RNA Kit 用于从 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 内采集的全血中纯化细胞内 RNA。当试剂盒与 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 配套使用时，该系统能够从全血中提纯细胞内 RNA 用于在分子诊断测试中进行 RT-PCR。

# 预期用户

该产品旨在供专业用户使用，例如在体外诊断程序方面经过培训的技术人员和医师。

本试剂盒供专业使用。

# 描述与原理

## 简介

采集全血是用于研究细胞 RNA 的许多分子检测的第一步。但是，此类实验中的一个主要问题是细胞 RNA 表达谱在体外的不稳定性。在 PreAnalytiX 进行的研究表明，在室温下储存或运送期间，全血中单个 mRNA 种类的拷贝数变化可以超过 1000 倍 (Rainen et al., 2002)。这是由于采血后 RNA 快速降解以及某些基因的诱导表达所致。RNA 表达谱中的此类变化使得无法进行可靠的基因表达研究。因此，在采血期间和之后用于维持 RNA 表达谱的方法对于准确分析人体全血中的基因表达至关重要。

## 原理和步骤

PreAnalytiX 开发出一种能够采集、稳定、存储和运送人体全血标本的系统，同时配备快速和有效的细胞内 RNA 分离方案。该系统需要使用 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 进行血液采样和 RNA 稳定，然后使用 PAXgene Blood RNA Kit 进行手动或自动 RNA 分离。手动和自动化方案能够提供在 RNA 质量和产量方面基本等同的性能。本手册包含手动方案（从第 41 页开始）和自动化方案（从第 49 页开始）的性能数据。

根据 ISO 20186-1:2019 《体外诊断分子检验-静脉全血检验前过程规范-第 1 部分：分离细胞 RNA》，PAXgene Blood RNA System 能够使从血液标本采集到细胞 RNA 分离的分析前工作流程步骤标准化。

## 样本采集与稳定

PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 包含专有的 RNA 稳定试剂。该活性成分可保护 RNA 分子免于被 RNase 降解，并最大限度减少基因表达的离体变化。使用 FOS 和 IL1B 基因转录物建立了 PAXgene Blood RNA System 的性能特点，请从第 36 页开始查看。

## RNA 分离

PAXgene Blood RNA Kit 用于从 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 采集的 2.5 mL 人体全血中分离总 RNA。操作步骤简单，可使用手动或自动化程序执行（分别参见图 1 和图 3，第 9 页和第 11 页）。在这两种方案中，分离都从离心步骤开始，从而在 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 中获得核酸沉淀物。洗涤并重悬沉淀物，然后进行手动或自动 RNA 分离。从原则上讲，两种方案都使用相同的试剂盒组件并遵循相同的方案步骤。

### 手动 RNA 分离

具体而言，将重悬的沉淀物与蛋白酶 K (PK) 一起在经过优化的缓冲液中孵育以完成蛋白质消化。使用 PAXgene Shredder 离心柱 (PSC) 再次离心，使细胞裂解物均质化并去除残留细胞碎屑，然后将流经液体的上清液转移至新的微型离心管 (MCT) 中。加入乙醇以调节结合条件，并将裂解物加至 PAXgene RNA 离心柱 (PRC)。在短暂离心过程中，RNA 选择性与 PAXgene 硅胶膜结合，而污染物则会通过硅胶膜。通过几个有效的洗涤步骤去除残留的污染物。在第一个和第二个洗涤步骤之间，使用 DNase I (RNFD) 处理硅胶膜以去除痕量的结合 DNA。在这些洗涤步骤后，使用洗脱缓冲液 (BR5) 洗脱 RNA 并进行热变性。使用 PAXgene Blood RNA System 进行手动 RNA 分离的性能特点请查看第 41 页。

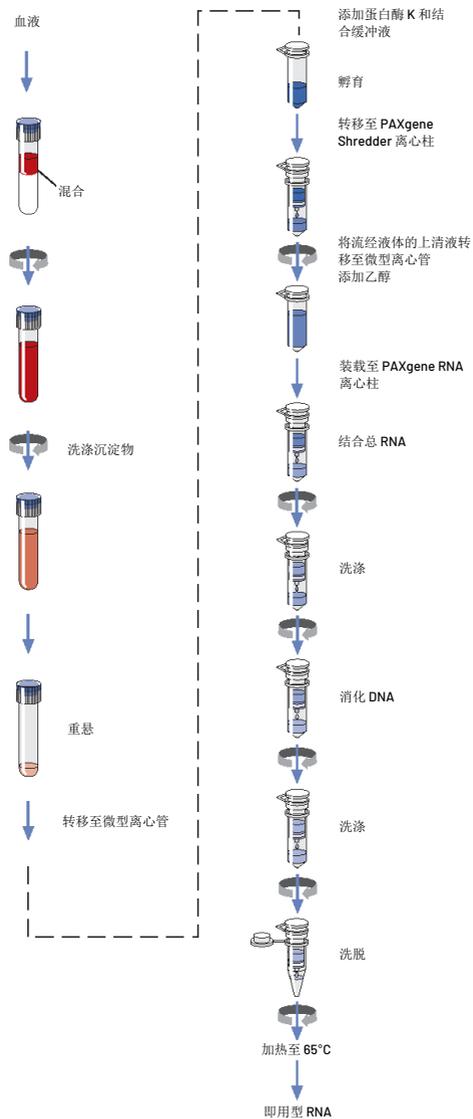


图 1: 手动 PAXgene Blood RNA 纯化程序。

## 自动 RNA 分离

在 QIAGEN QIAcube Connect MDx 上自动进行血液 RNA 分离。创新版仪器采用先进技术对 QIAGEN 离心柱进行处理，从而将自动化的低通量样本制备工作无缝集成到实验室的工作流程中。使用 QIAcube Connect MDx 时的样本制备步骤与手动操作程序相同（即裂解、结合、清洗和洗脱），并且可以使用同一 PAXgene Blood RNA Kit 执行。



图 2: QIAcube Connect MDx。



QIAGEN QIAcube Connect MDx 并非在所有国家/地区都可用。如需更多详细信息，请联系 QIAGEN 技术服务部门。

自动 RNA 分离方案由 2 个部分（或方案）组成，即“PAXgene Blood RNA Part A”（A 部分，将血液在 PAXgene Blood RNA Tube 中洗脱）和“PAXgene Blood RNA Part B”（B 部分，洗脱后随时可用的 RNA），2 个部分之间需要简单的手动干预（参见图 3）。

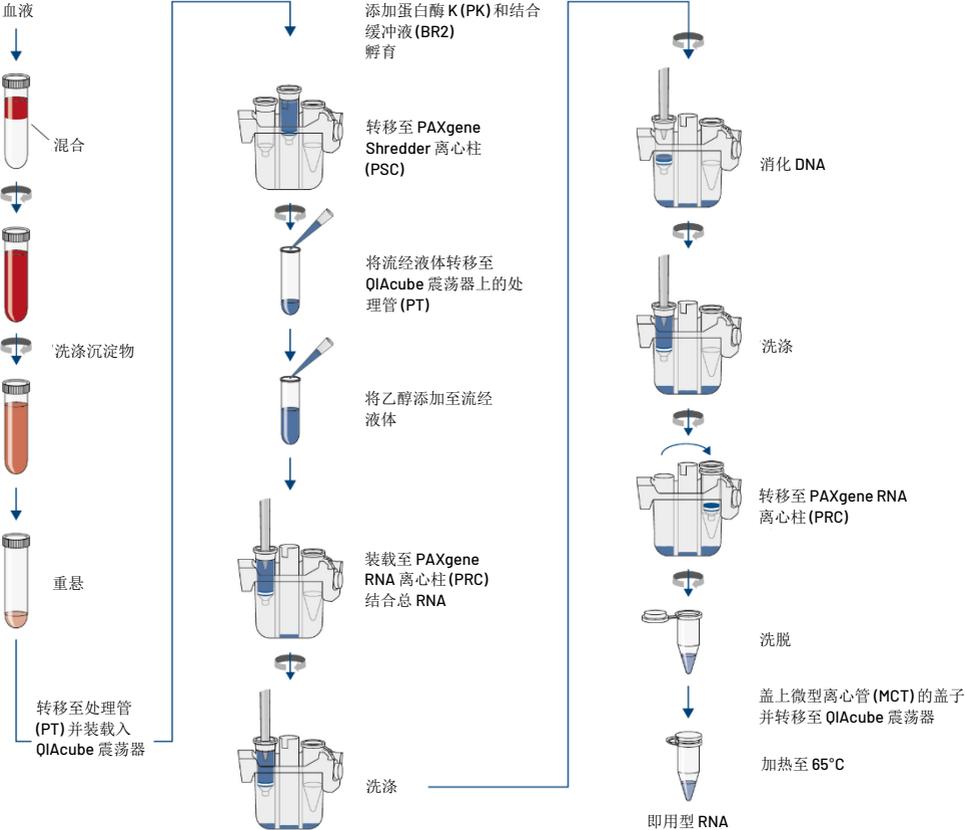


图 3: 自动 PAXgene Blood RNA 纯化程序。

将经过离心、洗涤和重悬的核酸沉淀物（参见第 8 页的“RNA 分离”）从 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 转移到处理管 (PT) 中，然后将其放入 QIAcube Connect MDx 工作台上的恒温振荡器中。操作员从菜单中选择并启动“PAXgene Blood RNA Part A”（A 部分）方案。QIAcube Connect MDx 执行该方案的操作步骤，直至洗脱缓冲液 (BR5) 中洗脱 RNA。操作员将含有纯化后 RNA 的 MCT 转移入 QIAcube Connect MDx 的恒温振荡器中。操作员从菜单中选择并启动“PAXgene Blood RNA Part B”（B 部分）方案，并通过 QIAcube Connect MDx 进行热变性。使用 QIAcube Connect MDx 上的 PAXgene Blood RNA System 进行自动 RNA 分离的性能特点请查看第 49 页。

# 提供的材料

## 试剂盒内容物

PAXgene Blood RNA Kit 目录编号 采集设备数量			(50) 762174 50
组件名称	说明	符号	数量
BR1	Resuspension Buffer (重悬缓冲液)	<b>RES   BUF</b>	20 mL
BR2	Binding Buffer (结合缓冲液) *	<b>BIND   BUF</b>	18 mL
BR3	Wash Buffer 1 (洗涤缓冲液 1) *	<b>WASH   BUF   1</b>	45 mL
BR4	Wash Buffer 2 (洗涤缓冲液 2) (浓缩液) †	<b>WASH   BUF   2   CONC</b>	11 mL
BR5	Elution Buffer (洗脱缓冲液)	<b>ELU   BUF</b>	6 mL
RNFW	RNase-Free Water (不含 RNase 的水) (瓶装)	<b>PEL   WASH</b>	2 × 125 mL
PK	Proteinase K (蛋白酶 K) (绿色盖)	<b>PROTK</b>	2 × 1.4 mL
PRC	PAXgene RNA Spin Column (PAXgene RNA 离心柱) (红色) ‡	<b>PAXgene   RNA   COL</b>	5 × 10
PT	Processing Tubes (处理试管) (2 mL) §	<b>PROC   TUBE</b>	6 × 50
Hemogard™	Secondary BD Hemogard Closure (辅助 BD Hemogard 瓶盖)	<b>SEC   CLOS</b>	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (微型离心管) (1.5 mL) §	<b>MIC   TUBE</b>	3 × 50、1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (不含 RNase 的 DNase I) (冻干)	<b>DNA   REM</b>	1500 孔尼兹单位 ¶
RDD	DNA Digestion Buffer (DNA 消化缓冲液) (白色盖)	<b>DNA   DIG   BUF</b>	2 × 2 mL
DRB	DNase Resuspension Buffer (DNase 重悬缓冲液) (试管, 淡紫色盖)	<b>DNase   RES   BUF</b>	2 mL
PSC	PAXgene Shredder Spin Column (PAXgene Shredder 离心柱) (淡紫色) ‡	<b>PAXgene   SHRED   COL</b>	5 × 10
手册	PAXgene Blood RNA Kit Handbook (PAXgene Blood RNA Kit 手册) (第 3 版)		1

- \* 与含有漂白剂的消毒剂不相容。含有胍盐。安全信息，见第 17 页。
- † 洗涤缓冲液 2 (BR4) 以浓缩液形式提供。首次使用前，按瓶身上说明添加 4 倍体积的乙醇（96–100% v/v，纯度等级 p.a.）制备工作溶液。
- ‡ 每个柱均包装在泡罩中，仅供一次性使用。处置说明请参见安全信息。
- § 管包装在塑料袋中，每根管仅供一次性使用。处置说明请参见安全信息。
- ¶ 孔尼兹单位是用于测量 DNase I 的常用单位，定义为在 25°C、pH 5.0 并且以高度聚合 DNA 作为底物的情况下，导致每毫升样本每分钟  $A_{260}$  增加 0.001 的 DNase I 含量（Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* 33, 349 和 363）。

## 试剂盒组件

组件名称	说明	活性成分	浓度
BR1	Resuspension Buffer（重悬缓冲液）	无	-
BR2	Binding Buffer（结合缓冲液）	硫氰酸胍	≥30 至 <50% w/w
BR3	Wash Buffer 1（洗涤缓冲液 1）	硫氰酸胍 乙醇	≥10 至 <20% w/w ≥3 至 <10% w/w
BR4	Wash Buffer 2（洗涤缓冲液 2）（浓缩液）	无	-
BR5	Elution Buffer（洗脱缓冲液）	无	-
RNFW	RNase-Free Water（不含 RNase 的水）（瓶装）	无	-
PK	Proteinase K（蛋白酶 K）（绿色盖）	蛋白酶 K	≥1 至 <3% w/w
RNFD	DNase I, RNase-free（不含 RNase 的 DNase I）（冻干）	DNase	≥90 至 ≤100% w/w
RDD	DNA Digestion Buffer（DNA 消化缓冲液）（白色盖）	无	-
DRB	DNase Resuspension Buffer（DNase 重悬缓冲液）（试管，淡紫色盖）	无	-

# 使用者应自备的材料

工作中如接触化学品，则必须始终穿着合适的实验工作服，并戴好一次性手套和护目镜。如需更多信息，请参考相关的安全数据表 (Safety Data Sheet, SDS)，该表可从产品供应商处获得。

## 所有操作方案用材

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; 目录编号 762165)
- 乙醇 (96 - 100% v/v, 纯度等级 p.a.)
- 移液管 \*(10  $\mu$ L–4 mL)
- 无菌且不含 RNase 的气溶胶屏障吸头 †
- 量筒 ‡
- 离心机\*, 离心力能够达到 3000–5000  $\times g$  配有摆桶式转子以容纳 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- 涡旋混合器\*
- 碎冰
- 记号笔

## 手动操作方案用材

- 变速微型离心机\*, 能够达到至少 1000–8000  $\times g$  的离心力范围，但可以使用更低和更高的  $g$  离心力 (详细信息参见操作方案步骤)，并且配有用于 2 mL MCT 的转子

\* 确保已根据制造商的建议定期对设备和仪器进行了检查、维护和校准。

† 确保熟悉 RNA 处理指导原则 (附录 A, 第 75 页)。

‡ 用于向缓冲液 BR4 浓缩液中添加乙醇。

- 震荡孵育箱 \*能够在 55°C 和 65°C 下孵育并且能够以  $\geq 400$  rpm 但不超过 1400 rpm 的转速震荡（例如 Eppendorf® Thermomixer Compact 或同等产品）

## 自动操作方案用材

- 剪刀
- QIAcube Connect MDx\*（QIAGEN，目录编号 9003070）

### QIAcube Connect MDx 耗材：

- Filter-Tips, 1000  $\mu$ L (1024)（QIAGEN，目录编号 990352）<sup>†</sup>
- Reagent Bottles, 30 mL (6)（QIAGEN，目录编号 990393）<sup>†</sup>
- Rotor Adapters (10  $\times$  24)（QIAGEN，目录编号 990394）<sup>†</sup>

### QIAcube Connect MDx 附件：

- Rotor Adapter Holder（QIAGEN，目录编号 990392）<sup>†</sup>

### QIAcube Connect MDx 服务包：

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

\* 确保已根据制造商的建议定期对设备和仪器进行了检查、维护和校准。

<sup>†</sup> 还包括在 Starter Pack, QIAcube（QIAGEN，目录编号 990395）中。

# 警告与预防措施

对于欧盟用户，请注意，要求您将用户和/或患者发生的明确与设备有关的严重事件报告给制造商和成员国主管机构。

对于非欧盟用户，请注意，要求您根据当地法规将用户和/或患者发生的明确与设备有关的严重事件报告给制造商和/或其授权代表和监管机构。

## 安全信息

工作中如需接触化学品和生物危害性材料，则必须始终穿着合适的实验工作服，并戴好一次性手套和护目镜。如需更多信息，请参阅相关安全数据表（SDS）。在 [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) 网页上可轻松获取 PDF 格式的安全数据表，还可查找、浏览、打印每一种 QIAGEN 试剂盒及组分的 SDS 文件。

- 所有化学品及生物材料均有潜在危害性。血液标本和样本均具有潜在传染性，必须将其作为生物危害性材料进行处理。
- 生物危险废弃物和试剂盒废弃物的处理应遵循当地安全流程。

## 紧急情况应对信息

CHEMTREC

美国和加拿大以外 +1 703-527-3887

## 预防措施

当进行血液操作时，应采取通用预防措施，以避免血源性病原体（例如 HIV、乙型肝炎和其他血源性病毒）潜在暴露风险。使用手套、防护服、护目镜、其他个人防护设备和工程控制装置防止血液暴露。如需更多信息，请参阅相关安全数据表（SDS）。这些表格在 [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) 网页上以 PDF 压缩文件形式提供，您可以在该网页上查找、浏览和打印本试剂盒的 SDS。

警示



不得将漂白剂或酸性溶液直接添加到样本制备产生的废弃物中。

结合缓冲液 (BR2) 和洗涤缓冲液 1 (BR3) 中含有硫氰酸胍，与漂白剂混合时会形成高活性化合物。如果结合缓冲液 (BR2) 和洗涤缓冲液 1 (BR3) 泼洒出来，请使用合适的实验室洗涤剂和水进行清理。如果含有潜在传染性病原体的液体泼洒出来，请首先使用实验室洗涤剂和水清洁受影响区域，然后使用 1% (v/v) 次氯酸钠（漂白剂）进行清洁。

可以每 9 倍体积的 RNA 稳定溶液和血液混合物使用 1 倍体积的商业漂白溶液（5% 次氯酸钠）对来自 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 的 RNA 稳定溶液和血液混合物进行消毒。

样本制备产生的废弃物，例如 RNA 分离程序中离心步骤产生的上清液，被视为具有潜在传染性。使用生物危害容器处置生物材料。必须根据您所在机构的当地法规和程序进行处置。

PAXgene Blood RNA Kit 特定组件仅供一次性使用。有关各组件的信息，请参见第 13 页 试剂盒内容物。

以下危险和预防声明适用于 PAXgene Blood RNA Kit 的组件。有关 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 的安全信息，请参阅 *PAXgene Blood RNA Tube 手册*。

#### Buffer BR2



含有：硫氰酸胍危险！吞食有害。接触皮肤或吸入可能造成伤害。导致严重眼部损伤。对水生生物有持久伤害。与酸接触会释放高毒性的气体。避免释放到环境中。使用防护手套/防护衣/护目镜/面部护具。如果入眼：用水小心地冲洗几分钟。摘下隐形眼镜（如果有且容易摘下），继续冲洗。如果已接触或担心接触：立即呼叫毒物中心或者医生/内科医师。将其中内容物/容器交给获批的废物处理厂处理。

#### Buffer BR3



含有：乙醇；硫氰酸胍。危险！易燃液体和蒸汽。导致严重眼部损伤。与酸接触会释放高毒性的气体。远离热源/火花/明火/热表面。禁止吸烟。使用防护手套/防护衣/护目镜/面部护具。如果入眼：用水小心地冲洗几分钟。摘下隐形眼镜（如果有且容易摘下），继续冲洗。立即呼叫毒物中心或者医生/内科医师。

## DNase I



含有：DNase。危险！可能引发过敏性皮肤反应。如果吸入，可能导致过敏、哮喘症状或者呼吸困难。避免吸入灰尘。使用防护手套/防护衣/护目镜/面部护具。佩戴呼吸防护用具。如果已接触或担心接触：请呼叫毒物中心或者医生/内科医师。请将人员移到空气新鲜的地方，保持舒适顺畅的呼吸。受污染的衣服清洗后再重复使用。

# 试剂的存放与处理

PAXgene RNA 离心柱 (PRC)、PAXgene Shredder 离心柱 (PSC)、蛋白酶 K (PK) 以及各种缓冲液 (BR1、BR2、BR3、BR4 和 BR5) 应在试剂盒标签上标明的温度下干燥保存。

不含 RNase 的 DNase 套件, 包括 DNase I (RNFD)、DNA 消化缓冲液 (RDD) 和 DNase 重悬缓冲液 (DRB), 可在常温下运输。收到不含 RNase 的 DNase 套件后, 应立即在标签上标明的温度下存放所有组分。如果存放得当, 试剂盒可在试剂盒箱上的失效日期前保持稳定。

应留意试剂盒和各组件标签上的失效日期和存储条件。请勿使用过期或储存不当的组件。

## 使用中稳定性

首次使用试剂盒后, 原试剂瓶中的试剂在室温下可保持稳定, 并直至试剂盒包装标签上注明的失效日期。

灌装于 QIAcube Connect MDx 试剂瓶中的试剂在室温 (15–25°C) 下可稳定存放 3 个月。

复溶 DNase I (RNFD) 在原玻璃瓶 (储备液) 中于 2–8°C 下可稳定存放 6 周。

1.5 mL MCT 中储备液一次性等分试样 (随试剂盒提供) 在 -20°C 下可稳定存放 9 个月。解冻后, 一次性等分试样在 2–8°C 下可稳定存放 6 周。

## 标本采集、存储和处理

PAXgene Blood RNA Kit 用于从 PAXgene Blood RNA Tubes 内采集血液。必须根据 PAXgene Blood RNA Tube 手册中的说明使用 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 采集血液。如有必要，请参阅附录 C（第 75 页）以获取有关 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 的操作建议。应将所有样本均视为存在潜在危害性。使用 FOS 和 IL1B 基因转录物建立了 PAXgene Blood RNA System 的性能特点，请查看第 37–40 页。

# 方案：从 PAXgene Blood RNA Tubes 采集的人体全血中手动分离总 RNA

## 实验前准备工作

- 确保试剂盒包装箱完好无损，并且缓冲液没有渗漏。请勿使用已损坏的试剂盒。
- 使用移液器时，请确保将其设置为正确的体积，然后小心且完全地吸取和分配液体。
- 为避免将样本转移至错误的试管或离心柱，请确保使用记号笔正确标记所有试管和离心柱。标记每个试管(PT, MCT)的盖子和管身。对于离心柱，请标记其 PT 的管身。在转移液体后盖上每个试管或离心柱。
- 样本和缓冲液在操作过程中溅出可能会降低 RNA 的产量和纯度。
- 除非另有说明，否则该操作方案的所有步骤（包括离心步骤）均应在室温(15–25°C)下进行。

由于核酸扩增技术的灵敏度，在处理样本时需要采取以下预防措施以避免交叉污染：

- 小心地将样本移入离心柱(PSC, PRC)中，不要弄湿离心柱的边缘。
- 两次液体转移之间，请务必更换移液器吸头。使用气溶胶屏障吸头。
- 避免移液器吸头碰到离心柱(PSC, PRC)薄膜。
- 涡旋混合或加热 MCT 后，进行短暂离心以除去盖子内部的液滴。
- 在整个程序期间戴手套。如果手套接触到样本，立即更换手套。
- 在盖上盖子之后再把离心柱(PSC, PRC)放入微型离心机中。按照操作步骤中所述进行离心。
- 一次只打开一个离心柱(PSC, PRC)，并注意避免产生气溶胶。
- 为了同时有效处理多个样本，将 PT 装满架子，离心后可以将离心柱(PSC, PRC)转移到处理管上。丢弃使用过的含有流经液体的 PT，将离心柱(PSC, PRC)置于新的 PT 中，然后转移回微型离心机中。

## 开始之前的准备事项

- 必须根据 *PAXgene Blood RNA Tube 手册* 中的说明使用 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 采集血液。如有必要，请参阅附录 C（第 75 页）以获取有关 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 的操作建议。
- 确保采血后将 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 在室温下孵育至少 2 h 以确保血细胞完全裂解和 RNA 沉淀。将 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 孵育过夜可提高产量。如果在 2–8°C、–20°C 或 –70°C 下储存前未在室温下进行 2 h 初始血液培养，则首先将 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 平衡至室温，然后在室温下培养 2 h 后开始操作。
- 请阅读第 17 页上的安全信息。
- 请阅读有关处理 RNA 的指导原则（附录 A，第 72 页）。
- 确保已按照制造商的建议对仪器（例如移液器和震荡孵育箱）进行定期检查和校准。
- 在第 5 步和第 20 步中需要一个震荡孵育箱。将震荡孵育箱的温度设置为 55°C。
- 结合缓冲液 (BR2) 在储存期间可能形成沉淀。如有必要，加热至 37°C 以溶解沉淀。
- 洗涤缓冲液 2 (BR4) 以浓缩液形式提供。首次使用前，按瓶身上说明添加 4 倍体积的乙醇（96 – 100% v/v，纯度等级 p.a.）制备工作溶液。
- 如果是首次使用不含 RNase 的 DNase 套件，请制备 DNase I 储备液。将固态 DNase I (RNFD; 1500 孔尼兹单位) \*溶解于套件随附的 550  $\mu$ L DNase 重悬缓冲液 (DRB)。开瓶时注意不要损失 DNase I (RNFD)。请勿涡旋混合复溶的 DNase I (RNFD)。DNase I 对物理变性非常敏感。仅应以轻轻倒置玻璃瓶的方式混合。
- 复溶 DNase I (RNFD) 可在原玻璃瓶（储备液）中于 2–8°C 下保存，也可从玻璃瓶中取出储备液并分装为一次性使用的等分试样后于 –20°C 下保存（使用试剂盒随附的 1.5 mL MCT；足以分装为 5 份等分试样）。解冻后的等分试样可在 2–8°C 下储存。请勿在解冻后重新冷冻等分试样。
- 复溶和等分试样 DNase I (RNFD) 时，请确保遵循处理 RNA 的指导原则（附录 A，第 72 页）。

\* 孔尼兹单位是用于测量 DNase I 的常用单位，定义为在 25°C、pH 5.0 并且以高度聚合 DNA 作为底物的情况下，导致每毫升样本每分钟  $A_{260}$  增加 0.001 的 DNase I 含量（Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* **33**, 349 和 363）。

## 流程步骤

1. 使用摆桶式转子以  $3000\text{--}5000 \times g$  的离心力将 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 离心 10 min。



确保 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 内的血样已在室温 ( $15\text{--}25^\circ\text{C}$ ) 下孵育至少 2 h，以实现血细胞的完全裂解和 RNA 沉淀。



转子必须包含用于圆底管的试管适配器。如果使用其他类型的试管适配器，试管在离心过程中可能会破裂。

2. 通过倾析或移液除去上清液。将 4 mL 不含 RNase 的水 (RNFW) 添加到沉淀物中，并使用新的辅助 BD Hemogard 瓶盖（试剂盒随附）封闭试管。

在倾析上清液时，请注意不要干扰沉淀物，并用干净的纸巾擦干试管边缘。

3. 涡旋混合直至沉淀明显溶解，并使用摆桶式转子以  $3000\text{--}5000 \times g$  的离心力离心 10 min。除去并丢弃全部上清液。

涡旋后但离心前残留在上清液中的微小碎屑不会影响操作。



未完全去除上清液会抑制裂解并稀释裂解物，从而影响 RNA 与 PAXgene 薄膜的结合条件。

4. 加入  $350 \mu\text{L}$  重悬缓冲液 (BR1) 并涡旋混合，直到沉淀物明显溶解为止。

5. 将样本吸取至 1.5 mL MCT 中。加入  $300 \mu\text{L}$  结合缓冲液 (BR2) 和  $40 \mu\text{L}$  蛋白酶 K (PK)。涡旋混合 5 s，然后使用震荡孵育箱以  $400\text{--}1400 \text{ rpm}$  的转速在  $55^\circ\text{C}$  下孵育 10 min。孵育后，将震荡孵育箱的温度设置为  $65^\circ\text{C}$ （第 20 步）。



在样本中加入结合缓冲液 (BR2) 和蛋白酶 K (PK) 之前，请勿将其混合在一起。

6. 将裂解物直接移入置于 2 mL PT 内的 PSC（淡紫色）中，并以最大速度（但不要超过  $20,000 \times g$ ）离心 3 min。



小心地将裂解物移入离心柱 (PSC) 内，并目视检查裂解物是否已完全转移至离心柱 (PSC)。

为防止损坏离心柱 (PSC) 和处理管 (PT)，离心力请勿超过  $20,000 \times g$ 。



某些样本可能未经离心就流经 PSC。这是由于某些样本的粘度偏低，不应将其视为产品故障的迹象。

- 小心地将流经液体的全部上清液转移到新的 1.5 mL MCT 中，而不要干扰 PT 中的沉淀物。
- 加入 350  $\mu$ L 乙醇（96–100% v/v，纯度等级 p.a.）。涡旋混合并短暂离心（500–1000  $\times$  g，1–2 s）以除去管盖内部的液滴。



离心时间不得超过 1–2 s，因为这可能会导致核酸沉淀和降低总 RNA 产量。

- 将 700  $\mu$ L 样本移入置于 2 mL PT 内的 PRC（PRC；红色）中，并在 8000–20,000  $\times$  g 下离心 1 min。将离心柱（PRC）放在新的 2 mL PT 内，并丢弃含有流经液体的旧 PT。
- 将剩余的样本移入 PRC（PRC；红色）中，并在 8000–20,000  $\times$  g 下离心 1 min。将离心柱（PRC）放在新的 2 mL PT 内，并丢弃含有流经液体的旧 PT。



小心地将样本移入离心柱（PRC）内，并目视检查样本是否已完全转移至离心柱（PRC）。

- 将 350  $\mu$ L 洗涤缓冲液 1 (BR3) 移入 PRC 内。在 8000–20,000  $\times$  g 下离心 1 min。将离心柱（PRC）放在新的 2 mL PT 内，并丢弃含有流经液体的旧 PT。
- 将 10  $\mu$ L DNase I (RNFD) 储备液加入放置在 1.5 mL MCT 内的 70  $\mu$ L DNA 消化缓冲液 (RDD) 中。轻弹离心管进行混合，并短暂离心以收集离心管侧壁的残留液体。例如，如果要处理 10 个样本，则将 100  $\mu$ L DNase I (RNFD) 储备液添加到 700  $\mu$ L DNA 消化缓冲液 (RDD) 中。使用试剂盒随附的 1.5 mL MCT。



DNase I 对物理变性非常敏感。仅应轻弹试管进行混合。请勿以旋涡方式混合。

- 将 DNase I (RNFD) 孵育混合物 (80  $\mu$ L) 直接移取至 PRC 薄膜，并在试验台上放置 15 min (20–30°C)。



确保将 DNase I (RNFD) 孵育混合物直接置于薄膜上。如果部分混合物接触并保留在离心柱（PRC）的壁或 O 形环上，则 DNase 消化将不完全。

14. 将 350  $\mu\text{L}$  洗涤缓冲液 1(BR3) 移入 PRC (PRC; 红色) 中, 并在  $8000\text{--}20,000 \times g$  下离心 1 min。将离心柱 (PRC) 放在新的 2 mL PT 内, 并丢弃含有流经液体的旧 PT。
15. 将 500  $\mu\text{L}$  洗涤缓冲液 2(BR4) 移入 PRC (PRC; 红色) 中, 并在  $8000\text{--}20,000 \times g$  下离心 1 min。将离心柱 (PRC) 放在新的 2 mL PT 内, 并丢弃含有流经液体的旧 PT。



洗涤缓冲液 2(BR4) 以浓缩液形式提供。使用前, 请确保已将乙醇加入洗涤缓冲液 2(BR4) 中 (参见第 24 页的“开始之前的准备事项”)。

16. 将另外 500  $\mu\text{L}$  洗涤缓冲液 2(BR4) 加入 PRC 内。以  $8000\text{--}20,000 \times g$  的速度离心 3 min。
17. 丢弃含流经液体的 PT, 并将 PRC 放入新的 2 mL PT 中。以  $8000\text{--}20,000 \times g$  的速度离心 1 min。
18. 丢弃含流经液体的 PT。将 PRC 放入 1.5 mL MCT 内, 然后将 40  $\mu\text{L}$  洗脱缓冲液 (BR5) 直接移液至 PRC 薄膜上。以  $8000\text{--}20,000 \times g$  的离心力离心 1 min 以洗脱 RNA。

使用洗脱缓冲液 (BR5) 润湿整个薄膜对于实现最高洗脱效率至关重要。

19. 使用 40  $\mu\text{L}$  洗脱缓冲液 (BR5) 和相同的 MCT, 按照第 18 步所述重复洗脱步骤。
20. 在不进行震荡的情况下, 将洗脱液在震荡孵育箱内 (来自第 5 步) 在  $65^\circ\text{C}$  下孵育 5 min。孵育后, 立即在冰上冷却。



在  $65^\circ\text{C}$  下孵育样本会使 RNA 变性以用于下游应用。即使下游应用包括热变性步骤, 也不要忽略此步骤。此时充分的 RNA 变性对于在下游应用中实现最大效率至关重要。

请勿超过上述孵育时间或温度。

21. 如果 RNA 样本不立即使用, 请在  $-20^\circ\text{C}$  或  $-70^\circ\text{C}$  下储存。

由于 RNA 在反复冻融后仍保持变性, 因此无需在  $65^\circ\text{C}$  下重复孵育。如果在诊断检测中使用 RNA 样本, 请遵循制造商提供的说明。

要根据 260 nm 下的吸光率准确定量 RNA, 我们建议使用 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 稀释样本\*。在不含 RNase 的水中稀释样本可能会导致数值不准确 (偏低)。

\*工作中如接触化学品, 则必须始终穿着合适的实验工作服, 并戴好一次性手套和护目镜。如需更多信息, 请参考相关的安全数据表 (Safety Data Sheet, SDS), 该表可从产品供应商处获得。

使用与被测样本中相同比例的洗脱缓冲液(BR5)和 Tris-HCl 缓冲液组成的空白样本将分光光度计归零。洗脱缓冲液(BR5)在 220 nm 下具有高吸光率，如果分光光度计未正确归零，可能导致高背景吸光率水平。



要在 Tris HCl 缓冲液中进行定量，使用关系式  $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/mL}$ 。请参阅第 73 页的附录 B。

22. 重新封闭所有含缓冲液和无核糖核酸酶水的试剂瓶、含有酶和酶缓冲液的样本瓶和管，以及方案所用试剂盒中含有塑料材料的袋子。按照“试剂的存放与处理”（第 21 页）和“使用中稳定性”（第 21 页）章节所述储存试剂盒的剩余内容物，直至进一步使用。

# 方案：从 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 采集的人体全血中自动分离总 RNA

## 实验前准备工作

- 确保试剂盒包装箱完好无损，并且缓冲液没有渗漏。请勿使用已损坏的试剂盒。
- 使用移液器时，请确保将其设置为正确的体积，然后小心且完全地吸取和分配液体。
- 为避免将样本转移至错误的试管和塑料耗材，请确保使用记号笔正确标记所有 PT、MCT 和转子适配器。标记每个 MCT 的盖子和管身、每个 PT 的管身以及每个转子适配器的外壁。
- 样本和缓冲液在操作过程中溅出可能会降低 RNA 的产量和纯度。
- 除非另有说明，否则该操作方案的所有步骤（包括离心步骤）均应在室温（15–25°C）下进行。

由于核酸扩增技术的灵敏度，在处理样本时需要采取以下预防措施以避免交叉污染：

- 小心地将样本移入 PT，注意要移入处理管的底部，而不要弄湿边缘。
- 两次液体转移之间，请务必更换移液器吸头。使用气溶胶屏障吸头。
- 避免移液器吸头碰到离心柱 (PSC, PRC) 薄膜。
- 涡旋混合或加热 MCT 后，进行短暂离心以除去盖子内部的液滴。
- 在整个程序期间戴手套。如果手套接触到样本，立即更换手套。

## 开始之前的准备事项

- 必须根据 *PAXgene Blood RNA Tube 手册* 中的说明使用 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 采集血液。如有必要，请参阅附录 C（第 75 页）以获取有关 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 的操作建议。
- 确保采血后将 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 在室温下孵育至少 2 h 以确保血细胞完全裂解和 RNA 沉淀。将 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 孵育过夜可提高产

量。如果采血后在 2–8°C、–20°C 或 –70°C 下储存 PAXgene Blood RNA Tube (BRT)，请先将其平衡至室温，然后在室温下放置 2 h，然后再开始操作程序。

- 请阅读第 17 页上的安全信息。
- 请阅读第 53 页的“重要事项”。
- 请阅读有关处理 RNA 的指导原则（附录 A，第 72 页）。
- 请阅读适当的 QIAcube Connect MDx 用户手册以及仪器随附的任何其他信息，并特别留意安全信息。
- 确保已按照制造商的建议对设备和仪器（例如移液器和 QIAcube Connect MDx）进行定期检查和校准。
- 结合缓冲液 (BR2) 在储存期间可能形成沉淀。如有必要，加热至 37°C 以溶解沉淀。
- 洗涤缓冲液 2 (BR4) 以浓缩液形式提供。首次使用前，按瓶身上说明添加适当体积的乙醇（96 – 100% v/v，纯度等级 p.a.）制备工作溶液。
- 如果是首次使用不含 RNase 的 DNase 套件，请制备 DNase I 储备液。将固态 DNase I (RNFD; 1500 孔尼兹单位) \*溶解于套件随附的 550 µL DNase 重悬缓冲液 (DRB)。开瓶时注意不要损失 DNase I (RNFD)。请勿涡旋混合复溶的 DNase I (RNFD)。DNase I 对物理变性非常敏感。仅应以轻轻倒置玻璃瓶的方式混合。
- 复溶 DNase I (RNFD) 可在原玻璃瓶（储备液）中于 2–8°C 下保存，也可从玻璃瓶中取出储备液并分装为一次性使用的等分试样后于 –20°C 下保存（使用试剂盒随附的 1.5 mL MCT；足以分装为 5 份等分试样）。解冻后的等分试样可在 2–8°C 下储存。请勿在解冻后重新冷冻等分试样。
- 复溶和等分试样 DNase I (RNFD) 时，请确保遵循处理 RNA 的指导原则（附录 A，第 72 页）。
- 安装正确的震荡器适配器（QIAcube Connect MDx 随附；使用标记为“2”的 2 mL 安全锁定试管的适配器），然后将震荡器架放在适配器顶部。
- 检查废弃物抽屉，必要时将其清空。

\* 孔尼兹单位是用于测量 DNase I 的常用单位，定义为在 25°C、pH 5.0 并且以高度聚合 DNA 作为底物的情况下，导致每毫升样本每分钟  $A_{260}$  增加 0.001 的 DNase I 含量 (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 和 363)。

- 如果以前的运行批次尚未完成，请安装相关操作方案。QIAcube Connect MDx 需要安装待下载相关 zip 文件中的所有操作方案。参见第 55 页的“在 QIAcube Connect MDx 上安装操作方案”。

## 流程步骤

1. 关闭 QIAcube Connect MDx 机罩，使用电源开关打开仪器（参见第 54 页图 15）。系统将发出“哔”声，并将显示开机屏幕。仪器将自动进行初始化测试。
  2. 打开 QIAcube Connect MDx 机罩，然后将必要的试剂和塑料器具加载入仪器。参见第 56 页的“加载 QIAcube Connect MDx”。
- 为了节省时间，可以在随后的一个或两个 10 min 离心步骤（第 3 步和第 5 步）中进行加载。

3. 使用摆桶式转子以  $3000\text{--}5000 \times g$  的离心力将 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 离心 10 min。



确保 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 内的血样已在室温 (15–25°C) 下孵育至少 2 h，以实现血细胞的完全裂解和 RNA 沉淀。



转子必须包含用于圆底管的试管适配器。如果使用其他类型的试管适配器，试管在离心过程中可能会破裂。

4. 通过倾析或移液除去上清液。在倾析上清液时，请注意不要干扰沉淀物，并用干净的纸巾擦干试管边缘。将 4 mL 不含 RNase 的水 (RNFw) 添加到沉淀物中，并使用新的辅助 BD Hemogard 瓶盖（试剂盒随附）封闭试管。
5. 涡旋混合直至沉淀明显溶解，并使用摆桶式转子以  $3000\text{--}5000 \times g$  的离心力离心 10 min。除去并丢弃全部上清液。

涡旋后但离心前残留在上清液中的微小碎屑不会影响操作。



未完全去除上清液会抑制裂解并稀释裂解物，从而影响 RNA 与 PAXgene 薄膜的结合条件。

6. 加入 350  $\mu\text{L}$  重悬缓冲液 (BR1) 并涡旋混合，直到沉淀物明显溶解为止。
7. 将样本吸取至 2 mL PT 中。



使用 PAXgene Blood RNA Kit 中随附的 2 mL PT。

- 将含有样本并且已经打开的 PT 装入 QIAcube Connect MDx 震荡器中（参见图 18，第 58）。样本位置已经编号，便于装载。将 QIAcube Connect MDx 随附的震荡器架塞子沿震荡器架边缘紧靠每个 PT 插入插槽中。这样可以在装载检查期间检测样本。



确保已经安装正确的震荡器适配器（Shaker Adapter，2 mL，安全锁定试管，标记为“2”，QIAcube Connect MDx 随附）。



如果处理的样本少于 12 个，请确保按照第 62 页图 22 所示装载震荡器架。无法处理一个 (1) 个样本或 11 个样本。震荡器架内的位置编号与离心机中的位置编号相对应。

- 关闭 QIAcube Connect MDx 的机罩（参见图 15，第 54 页）。
- 选择“PAXgene Blood RNA Part A”（A 部分）操作方案并启动该方案。

请按照 QIAcube Connect MDx 触摸屏上给出的说明进行操作。



确保两个程序部分（A 部分和 B 部分）都已安装在 QIAcube Connect MDx 上（参见第 55 页的“在 QIAcube Connect MDx 上安装操作方案”）。



仪器将执行样本、吸头、转子适配器和试剂瓶的负载检查。

- 完成“PAXgene Blood RNA Part A”（A 部分）操作方案后，打开 QIAcube Connect MDx 机罩（参见图 15，第 54 页）。从转子适配器中取出 PRC 并从震荡器中取出空的 PT 然后丢弃。



在运行期间，仪器会将离心柱从转子适配器位置 1（盖子位置 L1）转移到转子适配器位置 3（盖子位置 L2）（参见图 20，第 60 页）。

- 关闭转子适配器中所有含纯化 RNA 的 1.5 mL MCT 的盖子（位置 3，盖子位置 L3，参见图 20，第 60 页）。将 1.5 mL MCT 转移到 QIAcube Connect MDx 震荡器适配器中（参见图 18，第 58 页）。
- 关闭 QIAcube Connect MDx 的机罩（参见图 15，第 54 页）。

- 选择“PAXgene Blood RNA Part B”（B 部分）操作方案并启动该方案。

请按照 QIAcube Connect MDx 触摸屏给出的说明进行操作。



该程序可在 65°C 下孵育样本并使 RNA 变性以用于下游应用。即使下游应用包括热变性步骤，也不要忽略此步骤。此时充分的 RNA 变性对于在下游应用中实现最大效率至关重要。

15. 完成“PAXgene Blood RNA Part B”（B 部分）操作程序后，打开 QIAcube Connect MDx 机罩（参见图 15，第 54 页）。立即将装有纯化 RNA 的 MCT 置于冰上。



**警告：** 高温表面。震荡器的温度可达 70°C (158°C)。如果震荡器温度很高，请不要触碰。



请勿让纯化的 RNA 留在 QIAcube Connect MDx。由于样本未经冷却，因此纯化的 RNA 可能会降解。因此，建议不要进行无人值守的过夜样本制备运行。

16. 如果 RNA 样本不立即使用，请在 -20°C 或 -70°C 下储存。

由于 RNA 在反复冻融后仍保持变性，因此无需重复进行加热孵育方案（“PAXgene Blood RNA Part B”）（B 部分）。如果在诊断检测中使用 RNA 样本，请遵循制造商提供的说明。

要根据 260 nm 下的吸光率准确定量 RNA，我们建议在 10 mM Tris-HCl，pH 7.5 中稀释样本\*。在不含 RNase 的水中稀释样本可能会导致数值不准确（偏低）。

使用与被测样本中相同比例的洗脱缓冲液 (BR5) 和 Tris-HCl 缓冲液组成的空白样本将分光光度计归零。洗脱缓冲液 (BR5) 在 220 nm 下具有高吸光率，如果分光光度计未正确归零，可能导致高背景吸光率水平。



要在 Tris HCl 缓冲液中进行定量，使用关系式  
 $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/mL}$ 。请参阅第 73 页的附录 B。

17. 从 QIAcube Connect MDx 工作台上取下 Reagent Bottle Rack（参见图 18，第 58 页），然后使用带有适当标签的瓶盖封闭所有试剂瓶。重新封闭所有含缓冲

\* 工作中如接触化学品，则必须始终穿着合适的实验工作服，并戴好一次性手套和护目镜。如需更多信息，请参考相关的安全数据表 (Safety Data Sheet, SDS)，该表可从产品供应商处获得。

液和无核糖核酸酶水的试剂瓶、含有酶和酶缓冲液的样本瓶和管，以及方案所用试剂盒中含有塑料材料的袋子。按照“试剂的存放与处理”（第 21 页）和“使用中稳定性”（第 21 页）章节所述储存试剂盒和试剂瓶的剩余内容物，直至进一步使用。

去除 QIAcube Connect MDx MCT 插槽内 PT 中的剩余试剂并丢弃。从离心机上卸下转子适配器并丢弃。排空 QIAcube Connect MDx 废弃物抽屉（参见图 15，第 54 页）。关闭仪器机罩，并使用电源开关关闭仪器。

## 产品使用限制

PAXgene Blood RNA Kit 旨在从人体全血 ( $4.8 \times 10^6 - 1.1 \times 10^7$  个白细胞/mL) 中分离细胞内 RNA 用于体外诊断应用。它并非用于从人体全血中分离基因组 DNA 或病毒核酸。因为用于验证稳定规格的转录物数量有限 (FOS 和 IL1B 基因转录物)，所以尚未建立针对所有转录物的性能特点。用户应查看制造商的数据和自己的数据，以确定是否需要对其他转录物进行验证。试剂盒组件预期仅用于本使用说明中描述的手动和自动方案。

有关 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 的使用信息，请参阅 *PAXgene Blood RNA Tube 手册*。

## 质量控制

QIAGEN 利用经 ISO 认证的质量管理系统，对每批 PAXgene Blood RNA Kit 试剂盒的预定规格进行测试，以确保始终如一的产品品质。

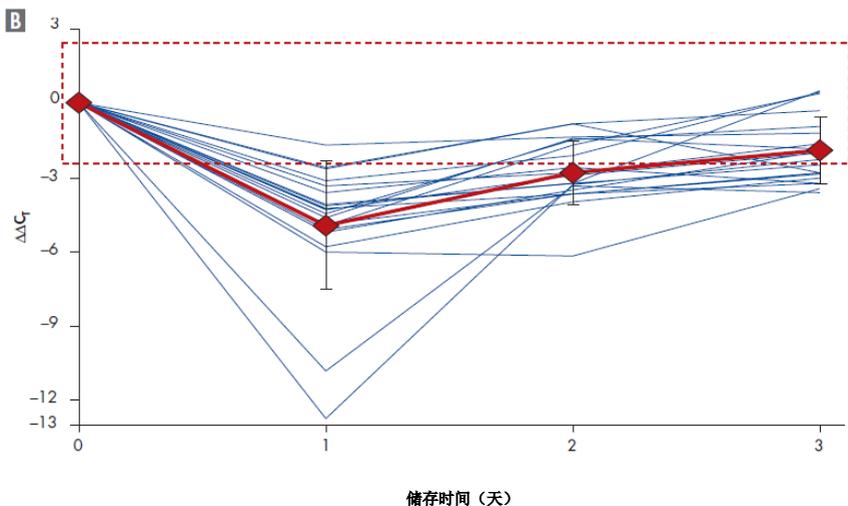
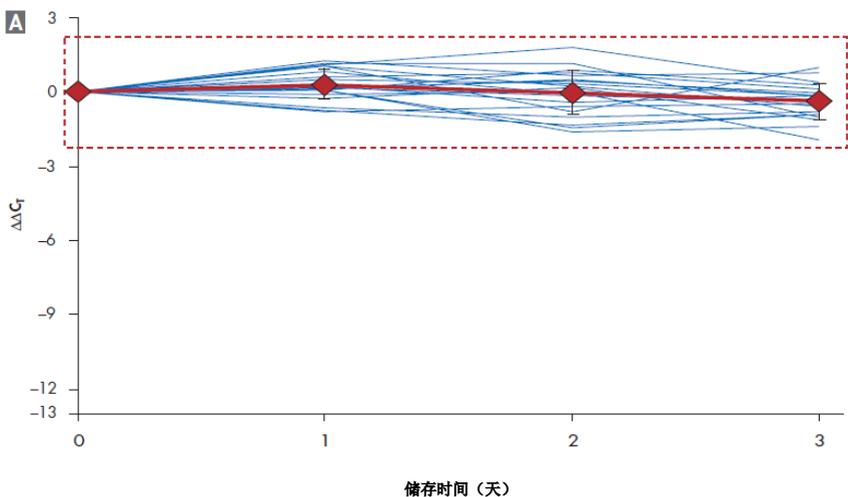
# 性能特点

## 样本采集与稳定

PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 包含专有的 RNA 稳定试剂。该活性成分可保护 RNA 分子免于被 RNase 降解，并最大限度减少基因表达的离体变化。PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 用于采集人体全血并且使细胞 RNA 在 18–25°C 下稳定长达 3 天（图 4 和图 5，第 37 页和第 38 页）或在 2–8°C 下稳定长达 5 天（图 6 和图 7，第 39 页和第 40 页）。此外，稳定血液可冷冻存放。现有的数据表明，细胞 RNA 可以在 -20°C 或 -70°C 下保持稳定至少 11 年\*。有关正在进行的评价更长时间稳定性的研究，请访问 [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) 或联系 QIAGEN 技术服务部门以获取更多信息。

RNA 保持稳定的实际持续时间可能会因细胞 RNA 的种类以及所使用的下游应用而异。因为用于验证稳定规格的转录物数量有限（FOS 和 IL1B 基因转录物），所以尚未建立针对所有转录物的性能特点。用户应查看制造商的数据和自己的数据，以确定是否需要对其他转录物进行验证。

\*一项关于 PAXgene Blood RNA Tubes 中血液存储的长期研究正在进行中。



**图4：18-25°C下血液样本中的RNA稳定性：FOS。**从10名看起来健康的供体中抽取血液，将重复样本在18-25°C下保存指定的天数，然后进行总RNA分离。**[A]**采集血液并存储在PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)内，然后使用PAXgene Blood RNA Kit 纯化总RNA。**[B]**采集血液并存储在EDTA作为抗凝剂的标准血液采样管内，然后使用标准有机分离方法和基于硅胶膜的RNA提纯来纯化总RNA。使用18S rRNA作为内标，通过实时双通道RT-PCR测定FOS的相对转录物水平。使用所有样本的测定值绘图，并显示所有样本的均值和标准差。虚线表示所有检测的 $\pm 3$ 倍总精密度(2.34  $C_t$ )。

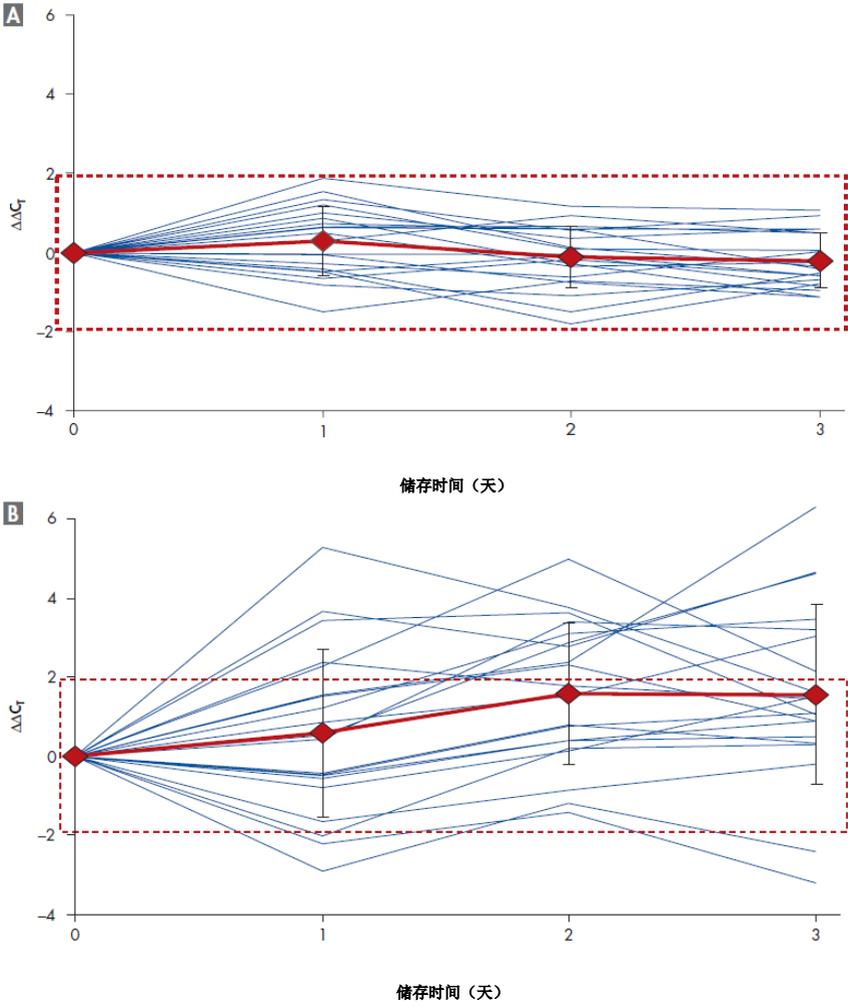
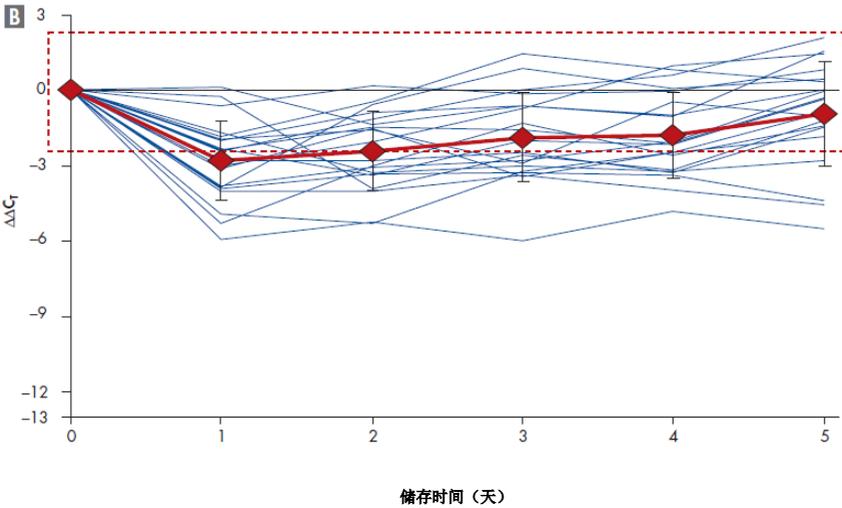
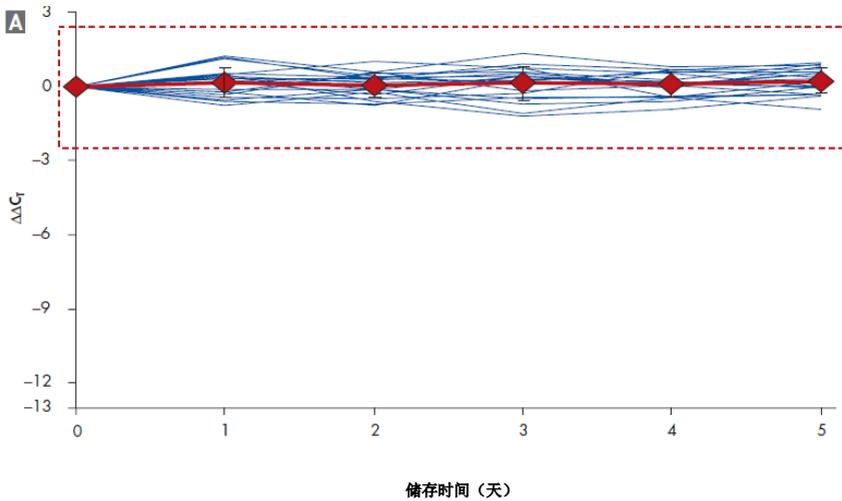
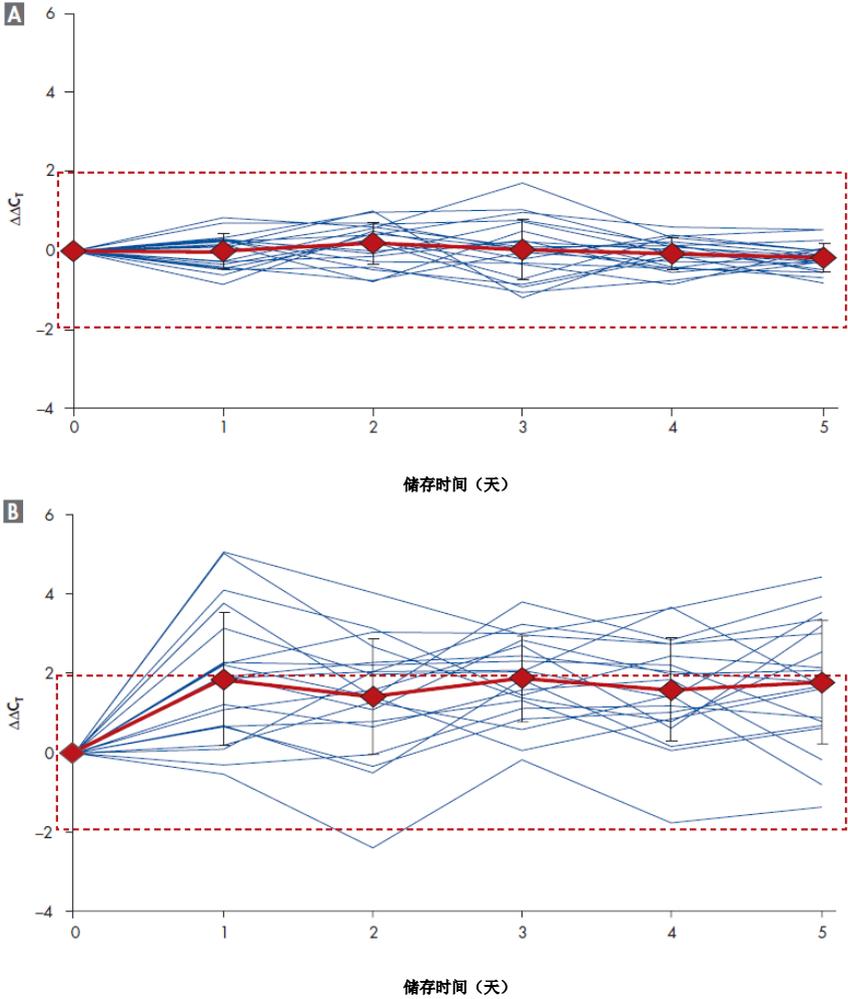


图 5: 18–25°C 下血液样本中的 RNA 稳定性: IL1B。如图 4 所示, 抽取血液并在 18–25°C 下储存, 然后纯化总 RNA。使用 18S rRNA 作为内标, 通过实时双通道 RT-PCR 测定 IL1B 的相对转录物水平。使用所有样本的测定值绘图, 并显示所有样本的均值和标准差。虚线表示所有检测的  $\pm 3$  倍总精密度 ( $1.93 C_T$ )。



**图6：2-8°C下血液样本中的RNA稳定性：FOS。**从10名供体中抽取血液，将重复样本在2-8°C下保存指定的天数，然后进行总RNA分离。**[A]**采集血液并存储在PAXgene Blood RNA Tubes(BRT)内，然后使用PAXgene Blood RNA Kit纯化总RNA。**[B]**采集血液并存储在使用EDTA作为抗凝剂的标准血液采样管内，然后使用标准有机分离方法和基于硅胶膜的RNA提纯来纯化总RNA。使用18S rRNA作为内标，通过实时双通道RT-PCR测定FOS的相对转录物水平。使用所有样本的测定值绘图，并显示所有样本的均值和标准差。虚线表示所有检测的 $\pm 3$ 倍总精密度( $2.34 C_T$ )。



**图7：2-8°C下血液样本中的RNA稳定性：IL1B。**如图6所示，抽取血液并在2-8°C下储存，然后纯化总RNA。使用18S rRNA作为内标，通过实时双通道RT-PCR测定IL1B的相对转录物水平。使用所有样本的测定值绘图，并显示所有样本的均值和标准差。虚线表示所有检测的 $\pm 3$ 倍总精密度( $1.93 C_T$ )。

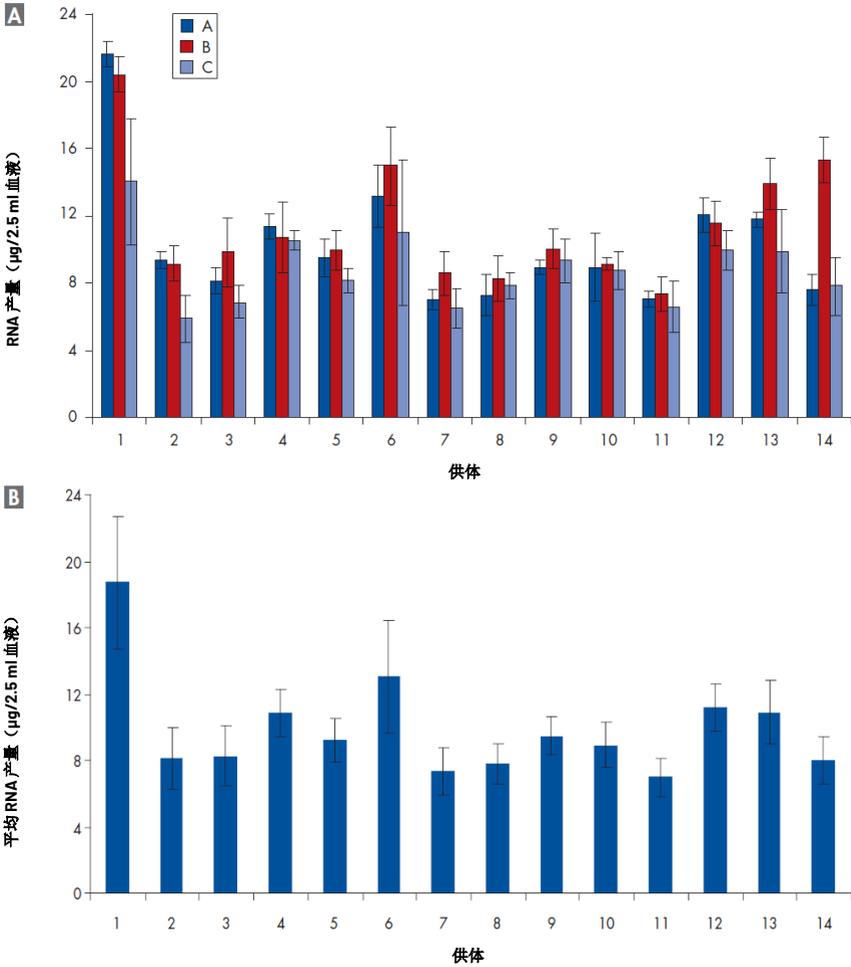
## 手动 RNA 分离

使用 PAXgene Blood RNA System 分离得到的总 RNA 是纯净的。使用手动方案，通过对  $\beta$ -肌动蛋白基因序列进行定量 real-time PCR 测量显示， $A_{260}/A_{280}$  值在 1.8 到 2.2 之间， $\geq 95\%$  的样本的基因组 DNA 含量  $\leq 1\%$  (w/w)。当使用 RT-PCR 反应体系多达 30% 的洗脱液时，至少 95% 的样本在 RT-PCR 中无抑制作用。

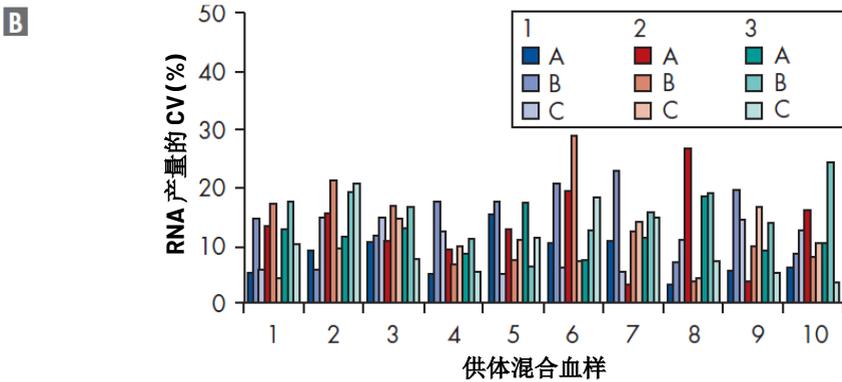
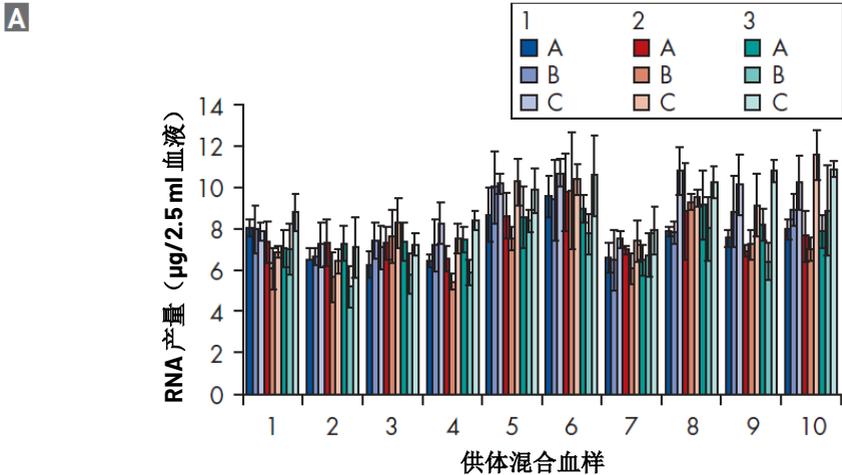
使用手动方案时，平均样本制备时间（基于来自 12 个样本制备运行批次的的数据）约为 90 min\*，而动手时间仅为 40 min。对于  $\geq 95\%$  的处理后样本而言，2.5 mL 健康人体全血的 RNA 产量均  $\geq 3 \mu\text{g}$ 。由于产量高度依赖于供体，因此个体产量可能会有所不同。对于单个供体，PAXgene Blood RNA System 能够提供高度可再现和可重复的产量（图 8 和图 9，第 42 页和第 43 页）以及可再现和可重复的 RT-PCR 结果（图 10 和图 11，第 47 页和第 48 页），使其对于临床诊断测试具有高度的稳健性。

图 8（第 42 页）显示了 PAXgene Blood RNA System 的总体重复性和再现性。已经进行过其他研究以证明不同的 PAXgene Blood RNA Kit 批次和不同的操作员对 RNA 产量的再现性以及实时 RT-PCR 性能的影响。由于这些研究使用混合血液样本而非单个 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)，因此结果并不能反映系统的重复性（包括个体抽血之间的波动），仅反映出样本制备的重复性（参见图 9，第 43 页）。

\* 整个方案运行时间，包括 PAXgene Blood RNA Tubes 的前期处理（离心、沉淀物洗涤和沉淀物重悬）。



**图 8：可再现和可重复的 RNA 分离。** 3 名技术人员 (A, B, C) 分别手动处理来自 14 名供体的一式四份血样。使用了三套设备，由一名技术人员使用同一设备处理所有准备好的样本。【A】显示了来自相同供体和不同技术人员的每份重复样本的 RNA 产量的均值和标准差。【B】由 3 名不同技术人员处理每名供体（共 14 名供体）提供的 12 份重复样本。显示了来自相同供体和所有技术人员的每份样本的 RNA 产量的均值和标准差。对于所有 RNA 样本， $A_{280}/A_{280}$  比值的范围为 1.8 至 2.2。



**图 9: 不同操作员和 PAXgene Blood RNA Kit 批次使用混合血样时的 RNA 产量的重复性和再现性。**在 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 每名供体 12 管, 总共 360 管) 中采集来自 30 名不同供体的血样。混合来自 3 名供体的所有试管中的内容物, 随后重新等分试样为 36 份样本。由 3 名不同的操作员对根据每 3 名供体混合血样等分的 36 份样本进行手动处理。每名操作员使用 3 个不同的 PAXgene Blood RNA Kit 批次对每个供体混合血样 (总共 10 个混合血样) 的一式四份样本进行 RNA 分离和处理。**[A]** 每个操作员-批次组合的 RNA 产量和标准差。由 3 名不同的操作员 (A, B, C) 使用 3 个不同批次的试剂盒 (1, 2, 3) 处理来自 10 个供体混合血样的一式四份样本。显示了不同操作员使用不同试剂盒批次对来自同一供体混合血样的一式四份样本得出的平均产量 (柱) 和标准差 (误差线)。**[B]** 对于所有操作员-批次组合 (A, B, C; 1, 2, 3), 每个供体混合血样 RNA 产量的 CV; 根据图 9A 所示的平均产量和产量的标准差计算得出。

表 1A: 对于选定的供体混合血样 (1, 6, 9, 10), 每个批次和每名用户内部的再现性

数据组合	供体混合血样 1 ( $5.1 \times 10^6$ 个细胞/mL)			供体混合血样 6 ( $6.5 \times 10^6$ 个细胞/mL)		
	平均产量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	平均产量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
批次 1, 用户 A	8.03	0.42	5	9.55	0.99	10
批次 1, 用户 B	7.98	1.17	15	9.38	1.94	21
批次 1, 用户 C	7.87	0.45	6	10.71	0.65	6
批次 2, 用户 A	7.32	0.98	13	9.78	1.89	19
批次 2, 用户 B	6.09	1.04	17	9.82	2.83	29
批次 2, 用户 C	6.87	0.31	4	10.37	0.74	7
批次 3, 用户 A	7.04	0.90	13	8.96	0.68	8
批次 3, 用户 B	6.98	1.22	17	7.73	0.97	13
批次 3, 用户 C	8.78	0.89	10	10.59	1.94	18
数据组合	供体混合血样 9 ( $8.4 \times 10^6$ 个细胞/mL)			供体混合血样 10 ( $10.2 \times 10^6$ 个细胞/mL)		
	平均产量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	平均产量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
批次 1, 用户 A	7.52	0.41	6	7.96	0.49	6
批次 1, 用户 B	8.82	1.72	19	8.90	0.76	9
批次 1, 用户 C	10.14	1.46	14	10.22	1.29	13
批次 2, 用户 A	6.92	0.27	4	7.63	1.23	16
批次 2, 用户 B	7.20	0.71	10	7.00	0.56	8
批次 2, 用户 C	9.14	1.52	17	11.56	1.21	10
批次 3, 用户 A	8.18	0.76	9	7.85	0.82	10
批次 3, 用户 B	6.41	0.88	14	8.88	2.17	24
批次 3, 用户 C	10.78	0.56	5	10.88	0.37	3

表 1B：对于选定的供体混合血样 (1, 6, 9, 10)，每名用户内部和所有批次之间的再现性

数据组合	供体混合血样 1 ( $5.1 \times 10^6$ 个细胞/mL)			供体混合血样 6 ( $6.5 \times 10^6$ 个细胞/mL)		
	平均产量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	平均产量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
用户 A, 所有批次	7.46	0.85	11	9.43	1.22	13
用户 B, 所有批次	7.02	1.31	19	8.98	2.09	23
用户 C, 所有批次	7.84	0.98	13	10.56	1.15	11
数据组合	供体混合血样 9 ( $8.4 \times 10^6$ 个细胞/mL)			供体混合血样 10 ( $10.2 \times 10^6$ 个细胞/mL)		
	平均产量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	平均产量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
用户 A, 所有批次	7.54	0.72	10	7.81	0.82	11
用户 B, 所有批次	7.48	1.50	20	8.26	1.54	19
用户 C, 所有批次	10.02	1.34	13	10.89	1.10	10

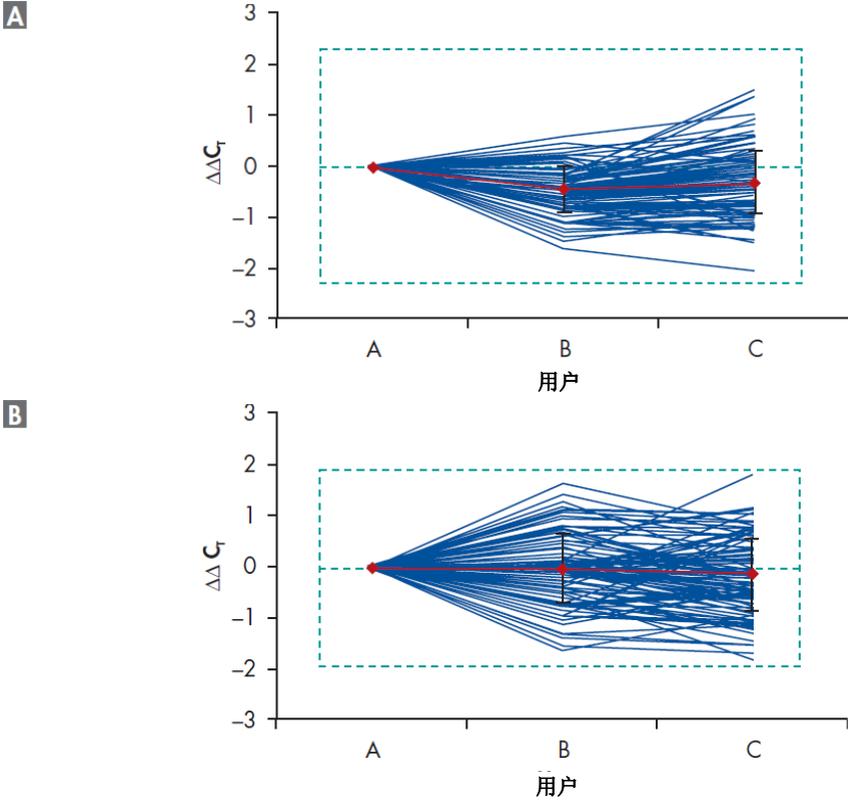
表 1C：对于选定的供体混合血样 (1, 6, 9, 10)，每个批次内部和所有用户之间的再现性

数据组合	供体混合血样 1 ( $5.1 \times 10^6$ 个细胞/mL)			供体混合血样 6 ( $6.5 \times 10^6$ 个细胞/mL)		
	平均产量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	平均产量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
批次 1, 所有用户	7.96	0.69	9	9.88	1.34	14
批次 2, 所有用户	6.76	0.93	14	9.99	1.84	18
批次 3, 所有用户	7.60	1.27	17	9.09	1.71	19
数据组合	供体混合血样 9 ( $8.4 \times 10^6$ 个细胞/mL)			供体混合血样 10 ( $10.2 \times 10^6$ 个细胞/mL)		
	平均产量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	平均产量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
批次 1, 所有用户	8.83	1.63	19	9.02	1.27	14
批次 2, 所有用户	7.75	1.36	18	8.73	2.31	26
批次 3, 所有用户	8.46	1.99	24	9.20	1.80	20

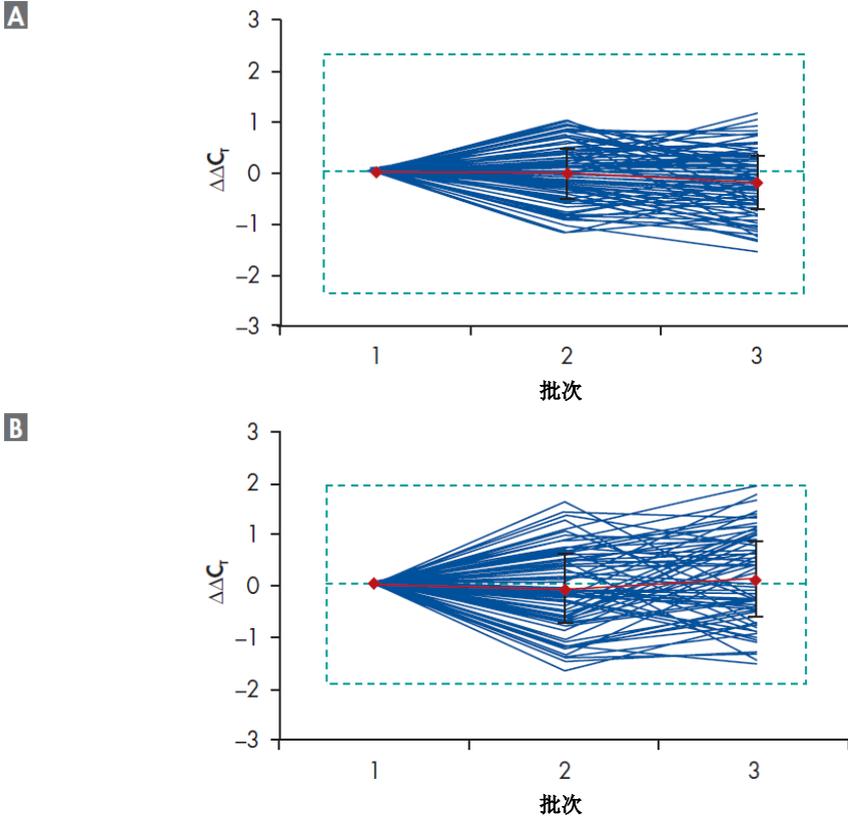
表 1D：对于选定的供体混合血样 (1, 6, 9, 10)，所有批次和所有用户之间的再现性

数据组合	供体混合血样 1 ( $5.1 \times 10^6$ 个细胞/mL)			供体混合血样 6 ( $6.5 \times 10^6$ 个细胞/mL)		
	平均产量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	平均产量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
批次 1, 所有用户	7.44	1.09	15	9.66	1.65	17
数据组合	供体混合血样 9 ( $8.4 \times 10^6$ 个细胞/mL)			供体混合血样 10 ( $10.2 \times 10^6$ 个细胞/mL)		
	平均产量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	平均产量 ( $\mu\text{g}$ )	SD ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
批次 1, 所有用户	8.35	1.70	20	8.99	1.80	20

4 个代表性供体混合血样的详细分析。根据白细胞计数选择混合血样，并反映白细胞计数正常范围 ( $4.8 \times 10^6 - 1.1 \times 10^7$  个白细胞/mL) 的最高值、中位值和最低值。白细胞计数代表来自每个供体混合血样 (3 名供体) 的 3 个白细胞计数的均值。



**图 10: RT-PCR 的再现性—不同用户之间。**按照图 9 所述实验纯化 RNA 并用于实时 RT-PCR。使用 18S rRNA 作为内标，通过实时双通道 RT-PCR 测定[A]FOS 和[B]IL1B 的相对转录物水平。使用所有样本测定值相对于用户 A 测定值的比值绘图（10 个供体混合血样  $\times$  3 个试剂盒批次  $\times$  4 个重复样本 = 每种基因 120 个数据集），并显示所有样本的均值（红线）和标准差（黑线）。虚线表示所有检测的  $\pm 3$  倍总精密度（FOS: 2.34  $C_T$ ; IL1B: 1.93  $C_T$ ）。



**图 11: RT-PCR 的再现性—不同试剂盒批次之间。**按照图 9 所述实验纯化 RNA 并用于实时 RT-PCR。使用 18S rRNA 作为内标，通过实时双通道 RT-PCR 测定 [A] FOS 和 [B] IL1B 的相对转录物水平。使用所有样本测定值相对于试剂盒批次 1 测定值的比值绘图 (10 个供体混合血样  $\times$  3 个试剂盒批次  $\times$  4 个重复样本 = 每种基因 120 个数据集)，并显示所有样本的均值 (红线) 和标准差 (黑线)。虚线表示所有检测的  $\pm 3$  倍总精密度 (FOS: 2.34  $C_t$ ; IL1B: 1.93  $C_t$ )。

表 2: 图 10 和图 11 的 RT-PCR 数据汇总

测试系统	FOS/18S rRNA 检测		IL1B/18S rRNA 检测	
	均值 ( $\Delta\Delta C_T$ )	± SD ( $\Delta\Delta C_T$ )	均值 ( $\Delta\Delta C_T$ )	± SD ( $\Delta\Delta C_T$ )
<b>每个用户内部以及所有批次之间的再现性</b>				
所有用户, 批次 1 - 批次 1	0.00	0.00	0.00	0.00
所有用户, 批次 1 - 批次 2	-0.03	0.48	-0.07	0.66
所有用户, 批次 1 - 批次 3	-0.21	0.52	0.11	0.71
<b>每个用户内部以及所有批次之间的再现性</b>				
所有批次, 用户 A - 用户 A	0.00	0.00	0.00	0.00
所有批次, 用户 A - 用户 B	-0.46	0.44	-0.06	0.69
所有批次, 用户 A - 用户 C	-0.31	0.60	-0.15	0.71

用户: 执行研究的技术人员。

批次: 本研究中使用的试剂盒批次编号。

SD: 标准差。

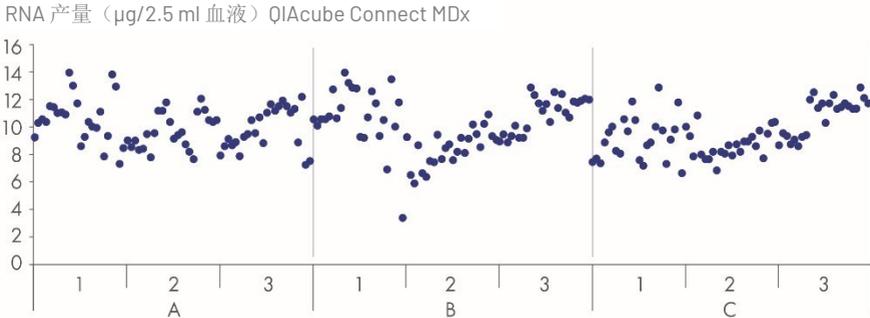
根据图 10 和图 11 提供的数据显示了  $\Delta\Delta C_T$  均值 (N = 120) 和标准差。

## 自动 RNA 分离

对于  $\geq 95\%$  的处理后样本而言, 2.5 mL 健康人体全血的 RNA 产量均  $\geq 3 \mu\text{g}$ 。图 12 (第 50 页) 显示了 3 名操作员使用 3 个试剂盒批次通过自动化方案制备的总共 216 份样本的 RNA 产量。由于这些研究使用了混合血样而非单个 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), 因此结果无法反映单次抽血得到的单份样本的预期 RNA 产量。由于产量高度依赖于供体, 因此个体产量可能会有所不同 (图 12, 第 50 页)。

当使用 RT-PCR 反应体系多达 30% 的洗脱液时, 至少 95% 的样本在 RT-PCR 中无抑制作用。使用自动化方案, 通过定量实时 RT-PCR 对同一运行批次中 RNA 阴性样本 (水) 与配对 RNA 阳性样本 (人体全血) 的 ABL1 和 FOS 转录物序列进行检测, 结果未检测到不同样本之间存在交叉污染。

不存在 RT-PCR 抑制作用且  $A_{260}/A_{280}$  值在 1.8 至 2.2 之间，从而证明使用 PAXgene Blood RNA System 和自动化方案分离得到的 RNA 是纯净的。通过定量 real-time PCR 对  $\beta$ -肌动蛋白基因序列进行测定显示， $\geq 95\%$  的样本中基因组 DNA 的含量  $\leq 1\%$  (w/w)。图 13 和图 14（第 51 页）显示了 3 名操作员使用 3 个试剂盒批次通过自动化方案制备的总共 216 份样本的  $A_{260}/A_{280}$  值和相对基因组 DNA 含量。



**图 12: RNA 产量 — QIAcube Connect MDx 自动化处理。**在 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 中采集来自各名供体的血样。将各个试管的内容物混合为 6 个供体混合血样，然后重新等分试样。由 3 名不同的操作员 (A, B, C) 对总共 216 支试管（即，每个混合血样 36 支）进行处理。每名操作员使用 3 个不同批次 (1, 2, 3) 的 PAXgene Blood RNA Kit 通过 QIAcube Connect MDx 对来自每个供体混合血样（总共 6 个）的样本进行一式四份自动分离和处理。显示了每个操作员-批次组合的所有单个样本的 RNA 产量。

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

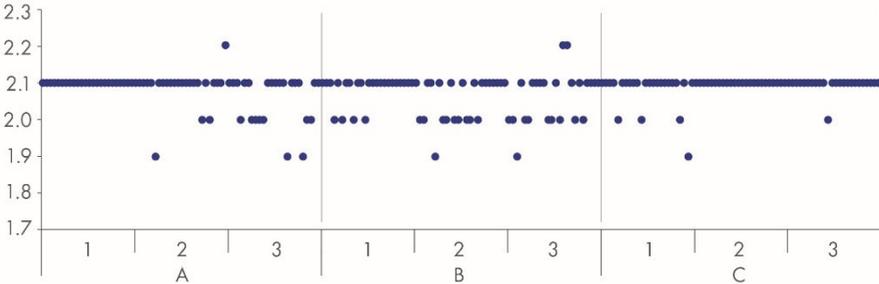


图 13: RNA 纯度 ( $A_{260}/A_{280}$  值) — QIAcube Connect MDx 自动化处理。由 3 名不同的操作员 (A, B, C) 使用 3 个不同批次 (1, 2, 3) 的 PAXgene Blood RNA Kit 按照图 12 所示的实验方案通过 QIAcube Connect MDx 进行 RNA 纯化。显示了每个操作员-批次组合的所有单个样本的  $A_{260}/A_{280}$  值。

基因组 DNA (w/w) [%] QIAcube Connect MDx

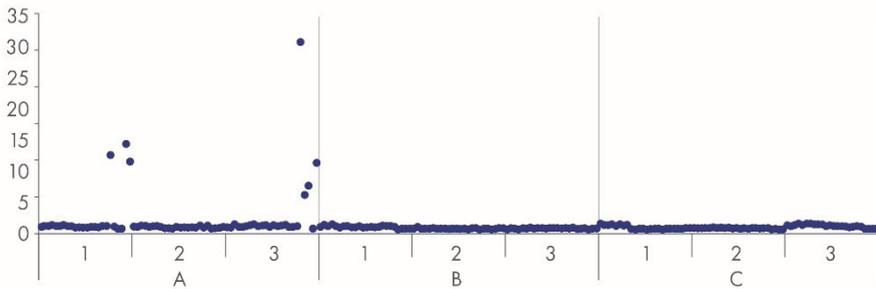


图 14: RNA 纯度 (基因组 DNA 污染百分比) — QIAcube Connect MDx 自动化处理。由 3 名不同的操作员 (A, B, C) 使用 3 个不同批次 (1, 2, 3) 的 PAXgene Blood RNA Kit 按照图 12 所示的实验方案通过 QIAcube Connect MDx 进行 RNA 纯化。显示了每个操作员-批次组合的所有单个样本的基因组 DNA 含量 (w/w)。

使用 PAXgene Blood RNA System 进行的自动化 RNA 分离方案可提供高度可再现和可重复的 RT-PCR 结果，使其对于临床诊断测试具有很高的稳健性。

## 分离的 RNA 的稳定

使用 PAXgene blood RNA Kit 从充满血液的 PAXgene Blood RNA Tubes 中分离的 RNA 样本，在  $-20^{\circ}\text{C}$  下可稳定存放 5 年，在  $-70^{\circ}\text{C}$  下可稳定存放 7 年（研究终点）。

# 重要事项

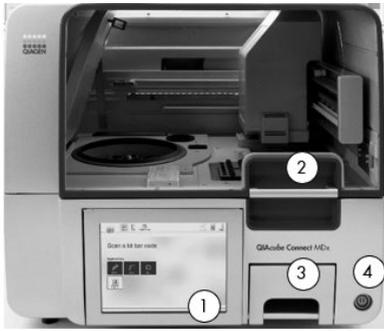
## 使用 QIAcube Connect MDx

确保熟悉 QIAcube Connect MDx 的操作。在开始自动化 PAXgene Blood RNA 操作方案之前，请阅读仪器用户手册以及仪器随附的任何其他信息，并特别留意安全信息。

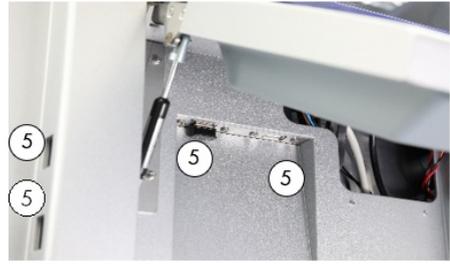
## 开启 QIAcube Connect MDx

关闭 QIAcube Connect MDx 机罩，使用电源开关打开仪器（参见第 54 页图 15）。

系统将发出“哔”声，并将显示开机屏幕。仪器将自动进行初始化测试。



QIAcube Connect MDx 前视图



拉出式触摸屏



QIAcube Connect MDx 的后视图（左侧）



QIAcube Connect MDx 的后视图（右侧）

图 15: QIAcube Connect MDx 的外部特征。

①

触摸屏

②

机罩

③

废物抽屉

④

电源开关

⑤

位于触摸屏左侧的 2 个 USB 端口；位于触摸屏后面的 2 个 USB 端口（Wi-Fi 模块已插入 1 个 USB 端口）

⑥

RJ-45 以太网端口

⑦

电源线接口

⑧

冷却空气出气口

## 触摸屏

QIAcube Connect MDx 可通过触摸屏进行控制。触摸屏允许用户操作仪器并指导用户完成工作台设置。样本处理期间，触摸屏会显示（操作）方案的（进程）状态及剩余时间。



图 16: QIAcube Connect MDx 的拉出式触摸屏。

## 在 QIAcube Connect MDx 上安装操作方案

在 QIAcube Connect MDx 上进行首次 RNA 制备之前，可能需要进行初始操作方案安装。需要安装的操作方案包括“PAXgene Blood RNA Part A”（A 部分）和“PAXgene Blood RNA Part B”（B 部分）。

对于 QIAcube Connect MDx，操作方案的下载地址为 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)，需要下载到仪器随附的 U 盘中。这些操作方案将通过 USB 端口传输至仪器。

USB 端口（位于触摸屏侧面；参见图 15，第 54 页）可用于连接 QIAcube Connect MDx 与仪器随附的 U 盘。此外，也可通过 USB 端口将日志文件或报告文件等数据文件从仪器传输至 U 盘。



USB 端口只能用于 QIAGEN 提供的 U 盘。请勿将其他设备连接到此端口。

 请勿在下载操作方案、传输数据文件或操作方案运行期间拔出 U 盘。

有关将操作方案上传至 QIAcube Connect MDx 过程的更多详细信息，请参阅仪器的用户手册。

## 加载 QIAcube Connect MDx

为了节省时间，可以在第 29 页“方案：从 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 采集的人体全血中自动分离总 RNA”中的一个或两个 10 min 离心步骤（第 3 步和第 5 步）期间执行加载。

### 试剂瓶

在 QIAcube Connect MDx 上进行每个运行批次之前，请小心地向 4 个试剂瓶中装入表 3（第 57 页）中列出的试剂，直至达到最高指示液位，如果这不可行，则达到 PAXgene Blood RNA Kit 随附的缓冲液体积所允许的液位。使用缓冲液名称明确标识试剂瓶和瓶盖，并将装满的试剂瓶放入 Reagent Bottle Rack 的适当位置。如图所示（图 17 和图 18，第 57 页和第 58 页）将试剂瓶架装载至仪器工作台。

 随附的缓冲液 BR2 的体积不会使试剂瓶填充到指示液位。在前几个运行批次中处理多个样本后，缓冲液 BR3 和 BR4 可能无法将试剂瓶填充到指示液位。

 放入工作台之前，确保取下瓶盖。

 PAXgene Blood RNA Kit (50) 随附的缓冲液体积足以在 QIAcube Connect MDx 上进行最多 7 个 RNA 制备运行批次（每个运行批次 2 至 12 份样本）。一般而言，处理每个试剂盒共 50 份样本时，应避免每个运行批次运行少量样本。超过 7 个 RNA 制备运行批次可能会导致缓冲液体积不足以处理最后的样本。

表 3: 在 Reagent Bottle Rack 中的位置

位置	试剂
1	结合缓冲液 (BR2)
2	乙醇 (96 - 100% v/v)
3	洗涤缓冲液 1 (BR3)
4	洗涤缓冲液 2 (BR4)*
5	- (留空)
6	- (留空)

\* 洗涤缓冲液 2 (BR4) 以浓缩液形式提供。首次使用前，按瓶身上说明添加 4 倍体积的乙醇（96–100% v/v，纯度等级 p.a.）制备工作溶液。

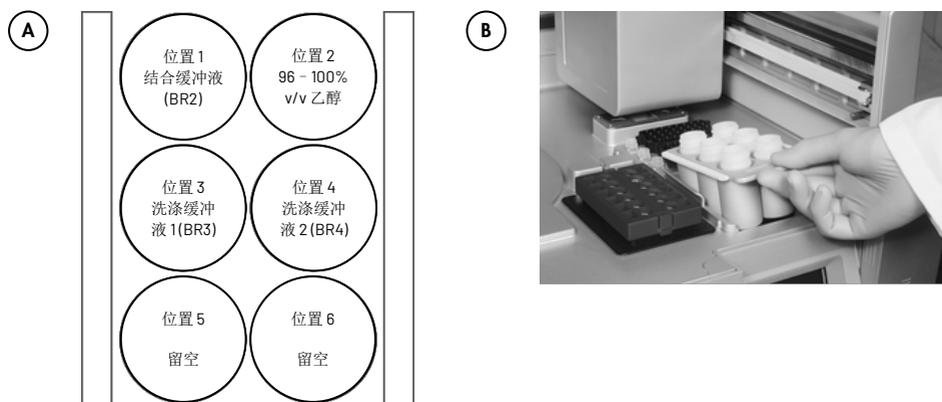


图 17: 装载 Reagent Bottle Rack。【A】试剂瓶在 Reagent Bottle Rack 中的位置以及内容物的示意图。【B】将试剂瓶架装载至 QIAcube Connect MDx。

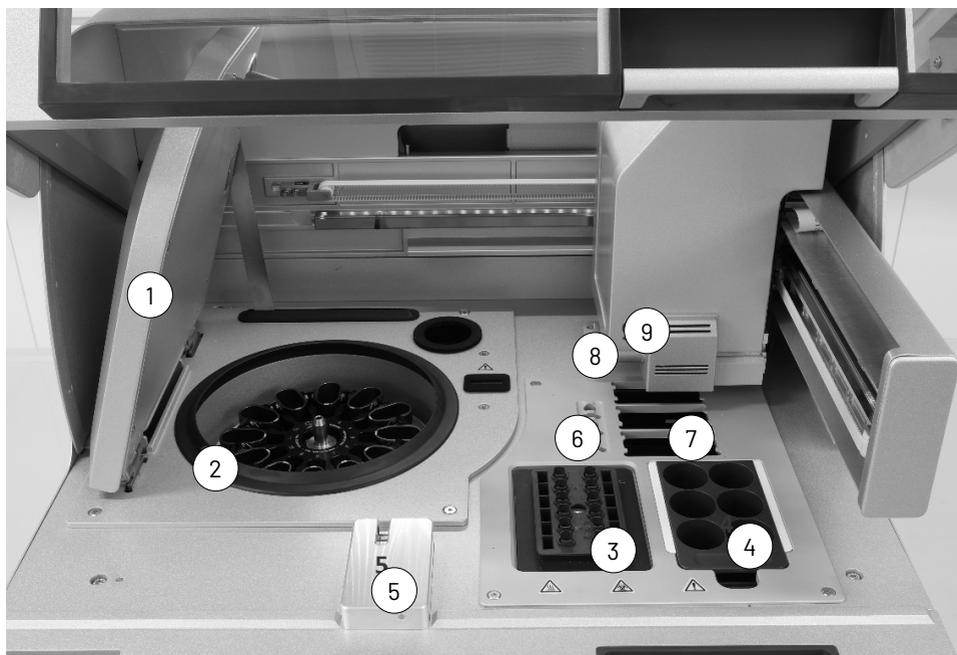


图 18: QIAcube Connect MDx 内视图。

- |   |              |   |  |
|---|--------------|---|--|
| ① | 离心机盖         | ⑥ | MCT 插槽                                   |
| ② | 离心机          | ⑦ | 3 个吸头架插槽                                 |
| ③ | 振荡器          | ⑧ | 吸头和离心柱弃置槽孔                               |
| ④ | 试剂瓶架         | ⑨ | 机械臂 (包括 1 个通道移液器、机械爪、超声和光学传感器以及紫外 LED 灯) |
| ⑤ | 吸头传感器和机罩锁定装置 |   |  |

## 离心柱 (PSC, PRC)、MCT 和 QIAcube Connect MDx 塑料器具

将 2 个装满 Filter-Tips 1000  $\mu$ L 的吸头架放在 QIAcube Connect MDx 上（参见图 18，第 58 页）。必要时，在吸头架上重新加装吸头。

**i** 仅使用设计用于 QIAcube Connect MDx 的 1000  $\mu$ L 过滤吸头。

使用记号笔标记每份样本的转子适配器和 MCT。打开要使用的 PSC 并用剪刀将盖子完全剪掉（参见图 19）。

**i** 为了使 QIAcube Connect MDx 机械爪正确操作，请完全去除（剪掉）PSC 的盖子以及与盖子连接的所有塑料部件（参见图 19）。否则，机械爪将无法正确抓住 PSC。

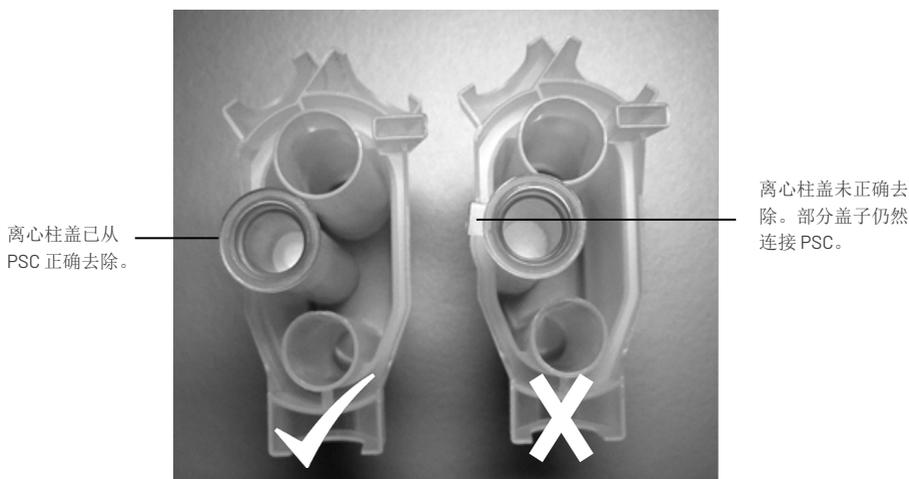


图 19: 加载 PSC。将 PSC 装载至转子适配器的中间位置。装载离心柱之前，请先剪掉 PSC 的盖子。

将 PSC（无盖，参见图 19，第 59 页）、PRC 以及标记好的 MCT 装载入每个标记好的转子适配器的适当位置，如表 4 和图 20 所示。



确保将离心柱 (PRC) 和 MCT 的盖子沿转子适配器边缘完全向下推至插槽底部，否则，盖子在离心过程中会折断。

表 4: 转子适配器中的塑料耗材

位置	试剂	盖子的位置
1	PAXgene RNA spin column (PAXgene RNA 离心柱) (红色, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder Spin Column (PAXgene Shredder 离心柱) (淡紫色, PSC) (在放入转子适配器之前先剪掉盖子)	-
3	MCT*	L3

\* 使用 PAXgene Blood RNA Kit 中随附的 MCT (1.5 mL)。

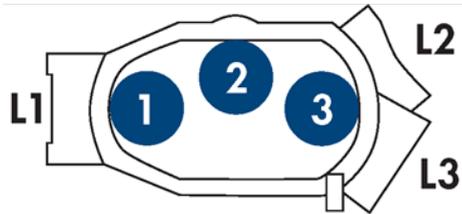


图 20: 在转子适配器中的位置。转子适配器具有 3 个试管位置 (1-3) 和三个盖子位置 (L1-L3)。

## 加载离心机

如下面的图 21 所示，将组装好的转子适配器装入 QIAcube Connect MDx 离心机桶中。



如果处理的样本少于 12 个，请确保径向平衡加载离心机转子（参见图 22，第 62 页）。即便处理的样本少于 12 个，也必须在开始方案运行前安装所有离心机桶。无法处理单个（一个）个样本或 11 个样本。



图 21: 加载 QIAcube Connect MDx 上的离心机。将组装好的转子适配器加载至离心机桶中。

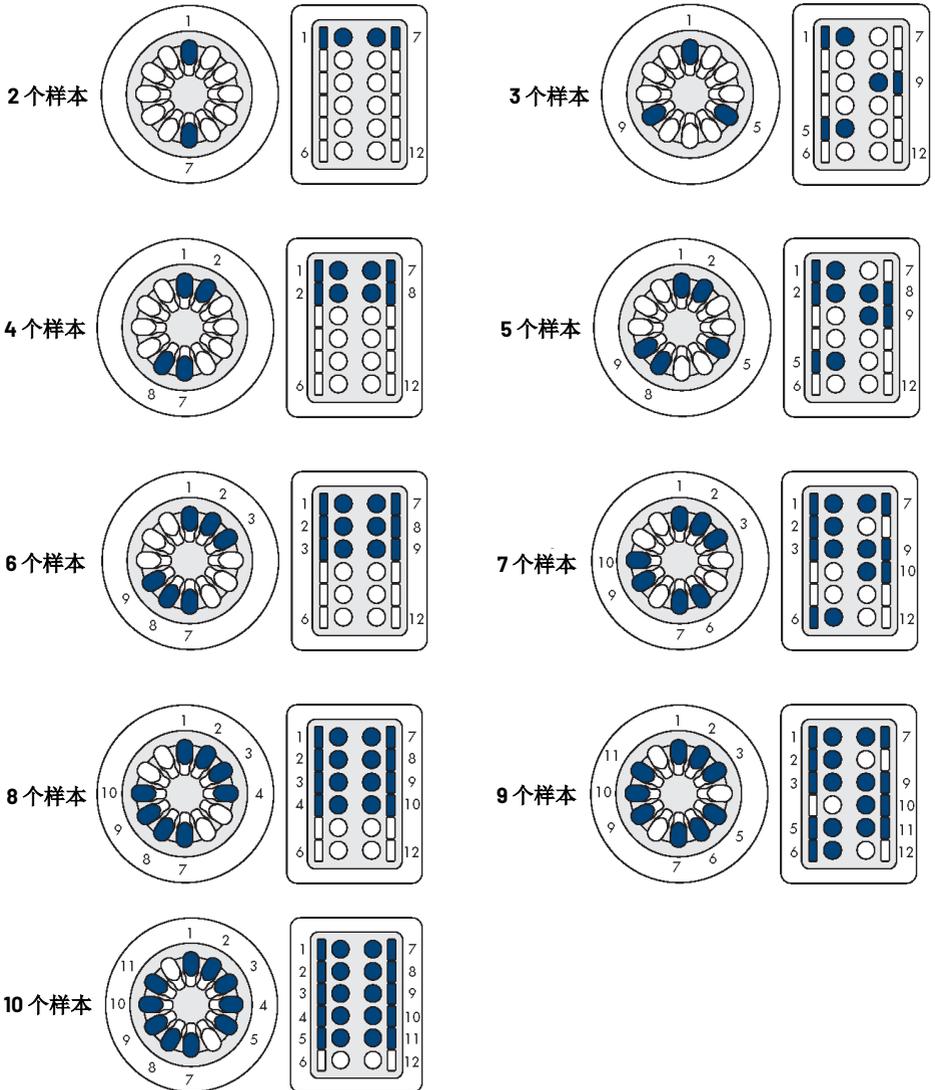


图 22：加载离心机和震荡器。显示了用于处理 2 个到 10 个样本的离心机和震荡器的位置。无法处理一个(1)个样本或 11 个样本。在处理 12 个样本时，将加载所有离心机和震荡器位置（图片未显示）。

## 处理管

取出 MCT 插槽中先前运行批次剩余的所有 PT（参见图 18，第 58 页）。根据运行批次中的样本数量，使用表 5 中列出的试剂体积填充 3 个 PT。

对于 DNase I 孵育混合物，将指定体积的 DNA 消化缓冲液 (RDD) 移入 PT 中，然后添加指定体积的 DNase I (RNFD) 储备液。通过使用 1000  $\mu$ L 移液器吸头轻轻上下吹打 3 次使混合物完全混合。

 使用 PAXgene Blood RNA Kit 中随附的 2 mL PT。如表 6（第 64 页）所示，在处理管上清楚地标明试剂名称，然后将其放置在 MCT 插槽中的适当位置。

 DNase I (RNFD) 对物理变性特别敏感。只能通过吹打进行混合，使用大孔径移液器吸头可减少剪切力。请勿以旋涡方式混合。

确保仅吸取所需的体积，如下面的表 5 所示。

表 5: MCT 插槽的 PT 中所需的试剂体积

样本数量	用于指定样本数量的试剂体积 (μL)		
	蛋白酶 K (PK)	DNase I 孵育混合物	洗脱缓冲液 (BR5)
2	126	187 (23 DNase I + 164 缓冲液 RDD)	313
3	170	261 (33 DNase I + 228 缓冲液 RDD)	399
4	213	334 (42 DNase I + 292 缓冲液 RDD)	486
5	256	407 (51 DNase I + 356 缓冲液 RDD)	572
6	299	481 (60 DNase I + 421 缓冲液 RDD)	658
7	342	554 (69 DNase I + 485 缓冲液 RDD)	745
8	386	627 (78 DNase I + 549 缓冲液 RDD)	831
9	429	701 (88 DNase I + 613 缓冲液 RDD)	918
10	472	775 (97 DNase I + 678 缓冲液 RDD)	1004
12	558	921 (115 DNase I + 806 缓冲液 RDD)	1177

表 6: MCT 插槽

	位置		
	A	B	C
内容	蛋白酶 K	DNase I 孵育混合物	洗脱缓冲液 (BR5)
容器	处理管*	处理管*	处理管*

\* 使用 PAXgene Blood RNA Kit 中随附的 2 mL PT。

# 处置

关于标本采集和手动 RNA 分离后的安全处置，请分别参见第 17 页和第 18 页的安全信息和预防措施。

此外，对于使用 QIAcube Connect MDx 的自动 RNA 分离，请分别参见第 61 页和第 62 页的图 21 和图 22，分别说明用于已使用吸头和色谱柱处置的专用槽。

## 参考文献

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.

# 故障排除向导

故障排除向导能帮助解决可能出现的任何问题。如需更多信息，请参见我们技术支持中心的常见问答网页：[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx)。QIAGEN 技术服务部门的专家始终乐意为您解答有关本手册中的信息和方案或样本和检测技术的问题（联系方式请参见最后一页或访问 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)）。

意见和建议	
<b>RNA 被降解</b>	
a) RNase 污染	 在操作步骤或以后的处理过程中，注意不要将任何 RNase 引入试剂中（参见第 72 页的附录 A）。
<b>RNA 产量低</b>	
b) PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 中采集的血容量不足 2.5 mL	 确保在 PAXgene Blood RNA Tube (BRT；参见 <i>PAXgene Blood RNA Tube 手册</i> ) 中采集 2.5 mL 血液
c) 在水中测量 RNA 浓度	 必须在 10 mM Tris-HCl, pH 7.5* 中稀释 RNA 以进行准确定量（参见第 73 页的附录 B）。
d) 在手动操作方案的第 9 步和第 10 步中将细胞碎屑转移至 PRC	 在手动操作方案的第 7 步中移取上清液时，避免转移较大的颗粒（转移小碎屑不会影响该操作步骤）。
e) 在第 3 步中未完全除去上清液	 确保除去全部上清液。如果倾析上清液，应使用纸巾从 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 边缘拭去液滴。采取适当的预防措施以防止交叉污染。
f) 使用 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 采样后，血液孵育不足 2 h	 采样后将血液在 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 中孵育至少 2 h。

\* 工作中如接触化学品，则必须始终穿着合适的实验工作服，并戴好一次性手套和护目镜。如需更多信息，请参考相关的安全数据表 (Safety Data Sheet, SDS)，该表可从产品供应商处获得。

意见和建议	
<b>A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 值低</b>	
g) 使用水稀释 RNA 后进行 A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> 测量	 在测量纯度之前，使用 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 稀释 RNA*（参见第 73 页的附录 B）。
h) 分光光度计未正确归零	 使用与被测样本中相同比例的洗脱缓冲液 (BR5) 和 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 组成的空白样本将分光光度计归零。洗脱缓冲液 (BR5) 在 220 nm 下具有高吸光率，如果分光光度计未正确归零，可能导致高背景吸光率水平。
<b>仪器故障</b>	
i) QIAcube Connect MDx 无法正常运行	阅读 <i>QIAcube Connect MDx 用户手册</i> ，特别注意“故障排除”部分。确保按照用户手册中的说明正确维护仪器。

\* 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.

# 符号

使用说明或包装和标签上可能出现下列符号。其他符号的说明见 试剂盒内容物（第 6 页）。

符号	符号定义
V<N1>	第 <N1> 版产品
 <N2>	包含足够进行 <N2> 次测试的试剂
	参阅使用说明
	使用截止日期
<b>IVD</b>	体外诊断医疗器械
<b>REF</b>	目录编号
<b>LOT</b>	批号
<b>MAT</b>	材料编号
<b>COMP</b>	组件
<b>NUM</b>	数量
<b>KU</b>	孔尼兹单位
<b>ADD</b>	添加
<b>CONT</b>	含有
<b>RCNS</b>	重组

**DNase**

脱氧核糖核酸酶 I

**EtOH**

乙醇

**GITC**

异硫氰酸胍

**RNase-Free DNase Set**

不含 RNase 的 DNase 套件

**GTIN**

全球贸易项目代码



温度限制



温度上限



制造商

**EC REP**

根据法规 (EU) 2017/746 的欧洲授权代表



重要事项



添加乙醇



CE 标志。本产品符合体外诊断医疗器械法规 (EU) 2017/746 的要求。

**UDI**

独特设备标识符



警示



警告：高温表面

# 联系信息

QIAGEN 员工均为公司技术支持的品质和效率而自豪。我们技术服务部门的员工均为经验丰富的专家，他们在分子生物学和 PreAnalytiX 产品使用方面具备广泛的实践和理论知识。如果您对 PAXgene Blood RNA Kit 有任何疑问，请随时与我们联系。

如需技术支持和更多信息，请参见技术支持中心网页 [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support)，拨打 00800-22-44-6000，或与 QIAGEN 技术服务部门或当地经销商（参见封底或访问 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)）联系。

# 附录 A：有关 RNA 处理的一般说明

## RNA 处理



核糖核酸酶 (RNase) 是一种非常稳定且活跃的酶类，其作用功能的发挥一般不需要辅助因子。由于 RNase 难以灭活，且只需微量便足以降解 RNA，因此，在使用任何塑料制品或玻璃器具之前，请务必先消除可能存在的 RNase 污染。应非常小心地避免在分离操作流程之中或之后在不经意间将 RNase 引入 RNA 样本。为了形成和保持一个不含 RNase 的环境，处理 RNA 时，在预处理过程中以及在使用一次性和非一次性容器和溶液时，必须采取预防措施。

## 一般处理



处理 RNA 时始终采用正确的微生物无菌操作技术。手和尘粒携带细菌和霉菌，且是最常见的 RNase 污染源。处理试剂和 RNA 样本时始终佩戴乳胶或塑料手套，以避免来自皮肤表面或多尘实验室设备的 RNase 污染。频繁更换手套并尽可能始终保持试管封闭。在为下游应用进行等分试样移液时，应将纯化的 RNA 置于冰上保存。

从玻璃器具和溶液中去 RNase 污染的方案可参见一般分子生物学指南，例如 Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

# 附录 B: 总 RNA 的定量和质量测定

## RNA 的定量

应通过使用分光光度计测量 260 nm 下的吸光率 ( $A_{260}$ ) 来确定 RNA 的浓度。为确保测量结果具有意义, 读数应在分光光度计的线性范围内。260 nm 下 1 个单位的吸光率对应每毫升 44  $\mu\text{g}$  的 RNA ( $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/mL}$ )。该关系式仅对在 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 中测量时有效。\*因此, 如果有必要稀释 RNA 样本, 应在 10 mM Tris-HCl 中进行。如下所述 (参见第 74 页的“RNA 的纯度”), 260 和 280 nm 下的吸光率比值给出了 RNA 纯度的估计值。测量 RNA 样本时, 应确保比色杯不含 RNase。使用与被测样本中相同比例的洗脱缓冲液 (BR5) 和 Tris-HCl 缓冲液组成的空白样本将分光光度计归零。洗脱缓冲液 (BR5) 在 220 nm 下具有高吸光率, 如果分光光度计未正确归零, 可能导致高背景吸光率水平。RNA 定量所涉及的计算示例如下所示。

RNA 样本体积	=	80 $\mu\text{L}$
稀释度 (1/15)	=	10 $\mu\text{L}$ RNA 样本 + 140 $\mu\text{L}$ 10 mM Tris-HCl, pH 7.5
测量比色杯 (不含 RNase) 中稀释样本的吸光率。		
$A_{260}$	=	0.3
样本浓度	=	$44 \times A_{260} \times \text{稀释因子}$
	=	$44 \times 0.3 \times 15$
	=	198 $\mu\text{g/mL}$
总产量	=	浓度 $\times$ 样本体积 (毫升)
	=	$198 \mu\text{g/mL} \times 0.08 \text{ mL}$
	=	15.8 $\mu\text{g}$ RNA

\* 工作中如接触化学品, 则必须始终穿着合适的实验工作服, 并戴好一次性手套和护目镜。如需更多信息, 请参考相关的安全数据表 (Safety Data Sheet, SDS), 该表可从产品供应商处获得。

## RNA 的纯度

260 nm 和 280 nm 下的读数比值 ( $A_{260}/A_{280}$ ) 提供了 RNA 纯度相对于在 UV 中吸收的污染物（例如蛋白质）的估计值。但是， $A_{260}/A_{280}$  比值受 pH 的影响很大。较低的 pH 值会导致较低的  $A_{260}/A_{280}$  比值并降低对蛋白质污染的灵敏度。\*为了获得准确的测量值，建议在 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 中测量吸光率。纯 RNA 在 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 中的  $A_{260}/A_{280}$  比值为 1.8 - 2.2。使用与被测样本中相同比例的洗脱缓冲液 (BR5) 和 Tris-HCl 缓冲液组成的空白样本将分光光度计归零。洗脱缓冲液 (BR5) 在 220 nm 下具有高吸光率，如果分光光度计未正确归零，可能导致高背景吸光率水平。

\* 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.

## 附录 C: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 的处理



BD 的以下建议在处理 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 时可能会有所帮助。有关 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 的更多信息，请参阅 *PAXgene Blood RNA Tube 手册*。

### 去除 BD Hemogard 瓶盖的说明

1. 用一只手抓住 PAXgene Blood RNA Tube (BRT)，将拇指放在 BD Hemogard 瓶盖下方。（为增加稳定性，请将手臂靠在坚固的表面上。）用另一只手扭动 BD Hemogard 瓶盖，同时用拇指向上推动，在管塞松开时立即收力。
2. 在提起瓶盖前先移开拇指。请勿用拇指推开 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 的瓶盖。警示：如果 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 装有血液，则存在暴露危险。为了防止在去除瓶盖过程中造成损伤，一旦 BD Hemogard 瓶盖松开，向上推动瓶盖的拇指就必须脱离 PAXgene Blood RNA Tube (BRT)，这一点非常重要。
3. 提起 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 的瓶盖。万一塑料护罩与橡胶塞分离，请勿重新组装瓶盖。小心地从 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 上取下橡皮塞。

## 插入辅助 BD Hemogard 瓶盖的说明

1. 更换 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 的瓶盖。
2. 扭动并向下推动直到瓶塞完全就位。瓶塞必须完全重新插入，以便瓶盖能够在处理过程中牢固地保留在 PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 上。

# 订购信息

产品名称	内容	目录编号
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 个 PAXgene 离心柱, 50 个 Shredder 离心柱, 处理管, 不含 RNase 的 DNase I, 不含 RNase 的试剂和缓冲液。与 PAXgene Blood RNA Tubes 配套使用	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 个采血管	762165
<b>可以从 QIAGEN 订购的相关产品用于在 QIAcube 上自动进行 RNA 分离</b>		
Starter Pack, QIAcube	试剂包包括: Reagent Bottle Rack (3); Reagent Bottle Rack 标记条 (8); 200 $\mu$ L 过滤吸头 (1024); 1000 $\mu$ L 过滤吸头 (1024); 1000 $\mu$ L 大孔径过滤吸头 (1024); 30 mL 试剂瓶 (18); 转子适配器 (240); Rotor Adapter Holder	990395
Filter-Tips, 1000 $\mu$ L (1024)	一次性无菌过滤吸头, 镶入	990352
Reagent Bottles, 30 mL (6)	带盖子的试剂瓶 (30 mL); 每包 6 个; 用于 QIAcube Reagent Bottle Rack	990393
Rotor Adapters (10 $\times$ 24)	用于 240 次制备: 240 个一次性转子适配器; 用于 QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	能够在 QIAcube 工作台上容纳 6 $\times$ 30 mL 试剂瓶的架子	9026197
Rotor Adapter Holder	适用于 12 个一次性转子转接器的固定装置; 与 QIAcube 配套使用	990392
<b>可以从 BD* 订购的相关产品用于 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)* 采血</b>		
BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set	21G, 0.75 英寸 (0.8 $\times$ 19 mm) 针头, 带鲁尔接头的 12 英寸 (305 mm) 导管; 每盒 50 个, 每箱 200 个	367286/ 367281

产品名称	内容	目录编号
BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set	21G, 3/4 英寸 (0.8 × 19 mm) 针头, 带鲁尔接头的 12 英寸 (305 mm) 导管。50 个/盒, 200 个/箱	367344
BD Vacutainer One-Use Holder	外壳仅适用于直径 13 mm 和 16 mm; 1000 个/箱	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 × 75 mm 4.0 mL 采血管, 带有红色 BD Hemogard 瓶盖和纸质标签; 100 个/盒, 1000 个/箱	368975/ 367812
BD Vacutainer EST Tube	13 × 75 mm 3.0 mL 采血管, 带有透明 BD Hemogard 瓶盖, 透明标签; 100 个/盒, 1000 个/箱	362725
BD Vacutainer No Additive (Z) Tube	13 × 75 mm 3.0 mL 采血管, 带有透明 BD Hemogard 瓶盖和纸质标签; 100 个/盒, 1000 个/箱	366703

\* 这些采血配件代表可与 PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 配套使用的典型产品。要了解有关这些配件的更多信息, 包括订购方式, 请访问 [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)。

# 文档修订历史

日期	更改
[R1]2022 年 4 月	初次 IVDR 发布
[R2]2023 年 2 月	PreAnalytiX GmbH 的街道地址已从“Feldbachstrasse”变更为“Garstligweg 8”。在“订购信息”中添加 BD 产品。更新安全信息。

提示



有关最新许可信息以及产品特定免责声明，请参阅相应的 PreAnalytiX 或 QIAGEN 试剂盒手册或用户手册。PreAnalytiX 和 QIAGEN 试剂盒手册及用户手册可从 [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) 和 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) 获得或向 QIAGEN 技术服务部门索取。

**Better samples**  
**More to explore**

 **PreAnalytiX**  
A QIAGEN / BD Company

探索更多请访问: [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)

HB-3009-002 02/2023

订购: [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | 技术支持: [www.support.qiagen.com](http://www.support.qiagen.com) | 网站: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) 或 [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)