

Leden 2020

Příručka pro sadu PAXgene[®] Blood RNA Kit

Verze 2



50 (kat. čís. 762174)

R3 **MAT** 1120409CZ

REF 762174



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Vyrobeno společností QIAGEN GmbH pro PreAnalytiX

Ochranné známky: PAXgene®, PreAnalytiX™ (PreAnalytiX GmbH); QIAGEN®, QIAcube® (skupina QIAGEN); BD Vacutainer®, BD Hemogard™, Safety-Lok™ (Becton, Dickinson and Company); Eppendorf® (Eppendorf AG).

Sady PAXgene Blood RNA Kit nejsou dostupné ve všech zemích; prosím informujte se.

Omezená licenční smlouva

Použitím produktu vyjadřuje kupující nebo uživatel sady PAXgene Blood RNA Kit souhlas s následujícími podmínkami:

1. Sada PAXgene Blood RNA Kit smí být používána výhradně v souladu s *Příručkou pro sadu PAXgene Blood RNA Kit* a pouze s komponenty obsaženými v sadě. Společnost PreAnalytiX neposkytuje žádnou licenci v rámci kteréhokoliv svého duševního vlastnictví k použití nebo k začlenění přiložených komponent sady s komponenty, které nejsou v této sadě zahrnuty, s výjimkou případů uvedených v *Příručce pro sadu PAXgene Blood RNA Kit* a dodatečných protokolech dostupných na www.preanalytix.com.
2. Mimo výslovně uvedenou licenci společnost PreAnalytiX neposkytuje žádnou záruku, že tato sada a/nebo její použití neporušuje práva třetích stran.
3. Tato sada a její komponenty jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepracovávat ani opakovaně prodávat.
4. Společnost PreAnalytiX zvláště vylučuje odpovědnost za jakékoli jiné licence, vyjádřené či implikované, než výslovně uvedené.
5. Kupující a uživatel této sady souhlasí s tím, že nepodnikne ani nikomu jinému neumožní podniknout žádné kroky, které by mohly vést k jakémukoli shora zakázané činnosti nebo ji usnadnily.
6. Společnost PreAnalytiX může základy této omezené licenční smlouvy uplatnit u každého soudu a vyžadovat úhradu všech vyšetřovacích a soudních poplatků, včetně poplatků za advokáta, v rámci jakéhokoli žaloby k prosazení této omezené licenční smlouvy nebo jakýchkoli svých práv k duševnímu vlastnictví, která se vztahují na tuto sadu a/nebo její komponenty.

Aktualizované licenční podmínky viz www.preanalytix.com.

Podmíněný prodej

Tento produkt je dodáván s licencí na základě patentových nároků US-7,270,953 a US-7,682,790 a dále EP-1820793 B1, případně zahraničních variant těchto patentových nároků, které se vztahují na používání produktu ke zpracování komplexu nukleových kyselin vzniklého v průběhu odběru vzorku do zkumavky pro odběr RNA z krve (PAXgene Blood RNA Tube).

HB-0101-006 BD-8945 1120409 © 2005-2020 PreAnalytiX GmbH, všechna práva vyhrazena.

Společnost PreAnalytiX

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Švýcarsko

www.preanalytix.com

Distributoři společnosti PreAnalytiX

Produkty PreAnalytiX jsou pro společnost PreAnalytiX vyráběny společností QIAGEN nebo BD a jsou jí společností QIAGEN nebo BD dodávány. Produkty nelze objednat u společnosti PreAnalytiX GmbH.

Kontaktní informace vašeho regionálního distributora PreAnalytiX naleznete na poslední straně.

Obsah

Obsah sady	5
Symbols.....	7
Podmínky skladování	9
Účel použití.....	9
Omezení použití produktu	10
Kontrola kvality	10
Technická podpora	10
Informace o bezpečnosti	11
Úvod	14
Princip a popis postupu	14
Odběr a stabilizace vzorku	15
Koncentrace a purifikace RNA	20
Manuální purifikace RNA.....	20
Automatizovaná purifikace RNA.....	30
Vybavení a reagentie, které má zajistit uživatel	36
Důležité poznámky	38
Používání přístroje QIAcube	38
Spuštění přístroje QIAcube	38
Instalace protokolů na přístroji QIAcube.....	38
Naplnění přístroje QIAcube	40
Protokol: Manuální purifikace celkové RNA z plné lidské krve odebrané do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	49

Protokol: Automatizovaná purifikace celkové RNA z plné lidské krve odebrané do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	57
Řešení problémů	64
Příloha A: Obecné pokyny pro manipulaci s RNA	67
Příloha B: Určení koncentrace, výtěžku a čistoty celkové RNA.....	68
Příloha C: Manipulace se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	70
Informace pro objednání.....	71
Historie revizí příručky.....	73


Obsah sady

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Katalogové č.			762174
Počet prep.			50
BR1	Resuspension Buffer (Pufr k resuspenzi)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Vazebný pufr)*	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (Promývací pufr 1)*	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) (Promývací pufr 2 (koncentrát))†	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Eluční pufr)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-free Water (bottle) (Voda bez obsahu RNázy (lahev))	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid) (Proteináza K (zelené víčko))	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (Kolonky PAXgene k odstředění RNA (červené))	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (2 ml) (Zkumavky na zpracování vzorku (2 ml))	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures (Sekundární závěry BD Hemogard™)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (1.5 ml) (Mikrocentrifugační zkumavky (1,5 ml))	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNáza I bez obsahu RNázy (lyofilizovaná))	DNA REM	1500 jednotek Kunitz‡

*Nesmí přijít do kontaktu s desinfekčními prostředky, které obsahují bělidla. Obsahuje sůl guanidinu. Viz bezpečnostní informace na straně 11.

† Promývací pufr 2 (BR4) je dodáván jako koncentrát. Před prvním použitím přidejte do lahvičky 4násobný objem ethanolu (96–100 %, stupeň čistoty p.a.), jak je popsáno na štítku, abyste vytvořili pracovní roztok.

‡ Jednotka Kunitz je běžně užívaná jednotka pro měření DNázy I; je definovaná jako množství DNázy I způsobující nárůst absorbance A při 260 nm o 0,001 za minutu na mililitr při 25 °C a pH 5,0, přičemž je jako substrát použita vysoce polymerní DNA (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 a 363).

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Katalogové č.			762174
Počet prep.			50
RDD	DNA Digestion Buffer (Pufr k digesci DNA; bílé víčko)	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (Pufr k resuspenzi DNázy (zkumavka, fialové víčko))	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (Kolonky PAXgene Shredder k rozmělnění a odstředění vzorku (fialové))	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Handbook (Příručka)	Příručka pro sadu PAXgene Blood RNA, verze 2)		1

Symboly



Obsahuje činidla pro <N> testů



Viz návod k použití



Použijte do



Diagnostický zdravotnický prostředek in-vitro



Katalogové číslo



Číslo šarže



Číslo materiálu



Součásti



Počet



Sterilizační metoda ozařováním



Jednotky Kunitz



Přidání



Obsahuje



Rekonstituováno



Deoxyribonukleáza I



Ethanol

GITC

Guanidin isothiokyanát

RNase-Free DNase Set

Sada RNase-Free DNase Set

GTIN

Globální číslo obchodní položky



Nepoužívejte opakovaně



Teplotní omezení



Horní teplotní limit



Výrobce



Důležitá poznámka



Zapište aktuální datum přidání ethanolu do lahvičky



Při dodání



Pokračování

Podmínky skladování

Kolonky PAXgene k odstředění RNA (PRC), kolonky PAXgene Shredder k rozmělnění a odstředění vzorku (PSC), proteináza K (PK) a pufrы (BR1, BR2, BR3, BR4 a BR5) mohou být skladovány v suchu při teplotě uvedené na štítku sady.

Sada RNase-Free DNase Set, která obsahuje DNázu I (RNFD), pufr k digesci DNA (RDD) a pufr k resuspenzi DNázy (DRB), je přepravována při teplotě okolního prostředí. Všechny komponenty sady RNase-Free DNase Set ihned po dodání uskladněte při teplotě uvedené na štítku. Při správném uchovávání je sada stabilní až do konce doby použitelnosti uvedeného na krabici sady.

Účel použití

Sada PAXgene Blood RNA Kit slouží k purifikaci intracelulární RNA z plné krve, která byla odebrána do zkumavky PAXgene Blood RNA Tube pro odběr RNA z krve (BRT). Pokud sadu použijete ve spojení se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tube (BRT), získáte ze vzorků plné krve purifikovanou intracelulární RNA, která může být použita v molekulárních diagnostických testech založených na reakci RT-PCR. Pokyny k použití zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) naleznete v *příručce ke zkumavce PAXgene Blood RNA Tube* (PAXgene Blood RNA Tube Handbook).

Charakteristika účinnosti systému PAXgene Blood RNA System platí pouze pro transkripty genů FOS a IL1B. Za stanovení odpovídající charakteristiky účinnosti systému PAXgene Blood RNA System pro jiné transkripty je odpovědný uživatel.

Omezení použití produktu

Sada PAXgene Blood RNA Kit je koncipována jako prostředek k purifikaci intracelulární RNA z plné lidské krve ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocytů/ml) pro diagnostické použití in vitro. Není určena k purifikaci genomické DNA nebo virových nukleových kyselin z plné lidské krve. Vzhledem k tomu, že byl pro stabilizační podmínky validován jen omezený počet transkriptů RNA (transkripty genů FOS a IL1B), charakteristika účinnosti nebyla stanovena pro všechny transkripty. Uživatel sady by měl zhodnotit vlastní data a údaje výrobce, aby určil, zda je validace nezbytná i pro jiné transkripty.

Tento produkt je určen pro použití profesionálními uživateli, např. techniky a lékaři vyškolenými v postupech diagnostiky in vitro.

Kontrola kvality

V souladu se systémem managementu jakosti společnosti QIAGEN certifikovaným podle norem ISO byla každá šarže sady PAXgene Blood RNA Kit testována podle předem stanovených kritérií, aby byla zaručena jednotná kvalita produktu.

Technická podpora

Ve společnosti QIAGEN jsme hrdi na kvalitu a dostupnost naší technické podpory. V našich odděleních technické podpory pracují zkušení vědci s rozsáhlými praktickými a teoretickými zkušenostmi v oblasti molekulární biologie a využívání produktů PreAnalytiX. Pokud máte otázky ohledně sady PAXgene Blood RNA Kit, neváhejte a kontaktujte nás.

Pro technickou asistenci a další informace kontaktujte prosím technický servis společnosti QIAGEN.

Informace o bezpečnosti

Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle.

Aby se vyloučilo riziko infekce (např. virem HIV nebo hepatitidy B) nebo zranění, noste při manipulaci s biologickými a chemickými materiály vždy vhodný laboratorní oděv, jednorázové ochranné rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (safety data sheets, SDS). Bezpečnostní listy jsou k dispozici online v pohodlném a kompaktním formátu PDF na stránkách www.preanalytix.com, kde můžete nalézt, zobrazit a vytisknout BL pro tuto sadu.

UPOZORNĚN NEPŘIDÁVEJTE roztoky bělicích prostředků nebo kyselin přímo do odpadních materiálů z přípravy vzorků.



Vazebný pufr (BR2) a promývací pufr 1 (BR3) obsahují guanidin isothiokyanát, který může při kontaktu s bělidly vytvářet vysoce reaktivní sloučeniny. Pokud se rozlije kapalina obsahující vazebný pufr (BR2) nebo promývací pufr 1 (BR3), vyčistěte zasažené místo vhodným laboratorním detergentem a vodou. Obsahuje-li rozlitá kapalina potenciálně infekční látky, vyčistěte zasažené místo nejprve laboratorním detergentem a vodou a potom 1 % (obj.) chlornanem sodným.

Stabilizační roztok RNA a směs krve ze zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mohou být dezinfikovány pomocí 1 jednotky objemu roztoku bělidla (5 % chlornan sodný) na 9 jednotek objemu stabilizačního roztoku RNA a směsi krve.

Odpad vznikající při přípravě vzorku, např. supernatanty po centrifugaci v rámci purifikace RNA, by měl být vždy považován za potenciálně infekční. Proto by měl být odpad před likvidací autoklávován nebo spálen, aby byl infekční materiál zničen. Postupujte v každém případě podle platných předpisů a směrnic pro likvidaci.

Pro jednotlivé komponenty sady PAXgene Blood RNA Kit platí následující pokyny týkající se rizika a bezpečnostních opatření. Bezpečnostní pokyny týkající se zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) naleznete v příručce *PAXgene Blood RNA Tube Handbook*.

Pufr BR2



Obsahuje guanidin isothiokyanát. Nebezpečí! Zdraví škodlivý při požití. Může být škodlivý při kontaktu s kůží nebo při vdechnutí. Způsobuje vážné poškození očí. Škodlivý pro život ve vodním prostředí s dlouhodobými nepříznivými účinky. Při kontaktu s kyselinami uvolňuje velmi toxický plyn. Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Opatrně oplachujte vodou po dobu několika minut. Pokud zasažená osoba používá kontaktní čočky, vyjměte je (pokud je to možné). Pokračujte v oplachování. Ihned kontaktujte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře.

Pufr BR3



Obsahuje: ethanol, guanidin isothiokyanát. Nebezpečí! Hořlavá kapalina a výpary. Způsobuje vážné poškození očí. Při kontaktu s kyselinami uvolňuje velmi toxický plyn. Chraňte před teplem / jiskrami / otevřeným plamenem / horkými povrchy. Zákaz kouření. Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Opatrně oplachujte vodou po dobu několika minut. Pokud zasažená osoba používá kontaktní čočky, vyjměte je (pokud je to možné). Pokračujte v oplachování. Ihned kontaktujte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře.

DNáza I



Obsahuje: DNázu. Nebezpečí! Může vyvolat alergickou kožní reakci. Při vdechnutí může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu, případně dechové obtíže. Vyvarujte se vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/výparů/aerosolů. Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít. Používejte ochranný respirátor. POKUD dojde k zasažení nebo důvodné obavě, že došlo k zasažení: Kontaktujte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře. Přeneste postiženého na čerstvý vzduch a ponechte ho v klidu v poloze usnadňující dýchání.

Proteináza K



Obsahuje: proteinázu K. Nebezpečí! Způsobuje mírné podráždění kůže. Při vdechnutí může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu, případně dechové obtíže. Vyvarujte se vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/výparů/aerosolů. Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít. Používejte ochranný respirátor. POKUD dojde k zasažení nebo důvodné obavě, že došlo k zasažení: Kontaktujte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře. Přeneste postiženého na čerstvý vzduch a ponechte ho v klidu v poloze usnadňující dýchání.

Úvod

Odběr vzorku plné krve je u mnoha molekulárně biologických analýzy celulární RNA prvním krokem. Hlavním problémem v těchto testech je však nestabilita profilu celulární RNA in vitro. Výzkumy prováděné ve společnosti PreAnalytiX ukázaly, že se počet kopií jednotlivých druhů mRNA v plné krvi může během přepravy nebo skladování při pokojové teplotě změnit více než 1000násobně.* Příčinou je rychlá degradace RNA a indukovaná exprese určitých genů po odběru krve. Takové změny profilu RNA znemožňují spolehlivé studie genové exprese. Metoda zachování profilu exprese RNA během odběru krve a po něm je tedy pro přesné analýzy genové exprese v plné lidské krvi nezbytná.

Princip a popis postupu

Společnost PreAnalytiX vyvinula nový systém, který umožňuje odběr, stabilizaci, skladování a přepravu vzorků plné lidské krve, společně s rychlým a efektivním protokolem pro izolaci intracelulární RNA. Systém vyžaduje použití zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; patenty USA 6,602,718 a 6,617,170) k odběru krve a současně stabilizaci RNA, po které následuje manuální nebo automatizovaná purifikace RNA pomocí sady PAXgene Blood RNA Kit. Manuální i automatizovaný protokol poskytují v podstatě rovnocennou účinnost vzhledem ke kvalitě a výtěžku RNA. Údaje o účinnosti pro manuální (str. 23–30) a automatizovaný (str. 33–35) protokol jsou obsaženy v této příručce.

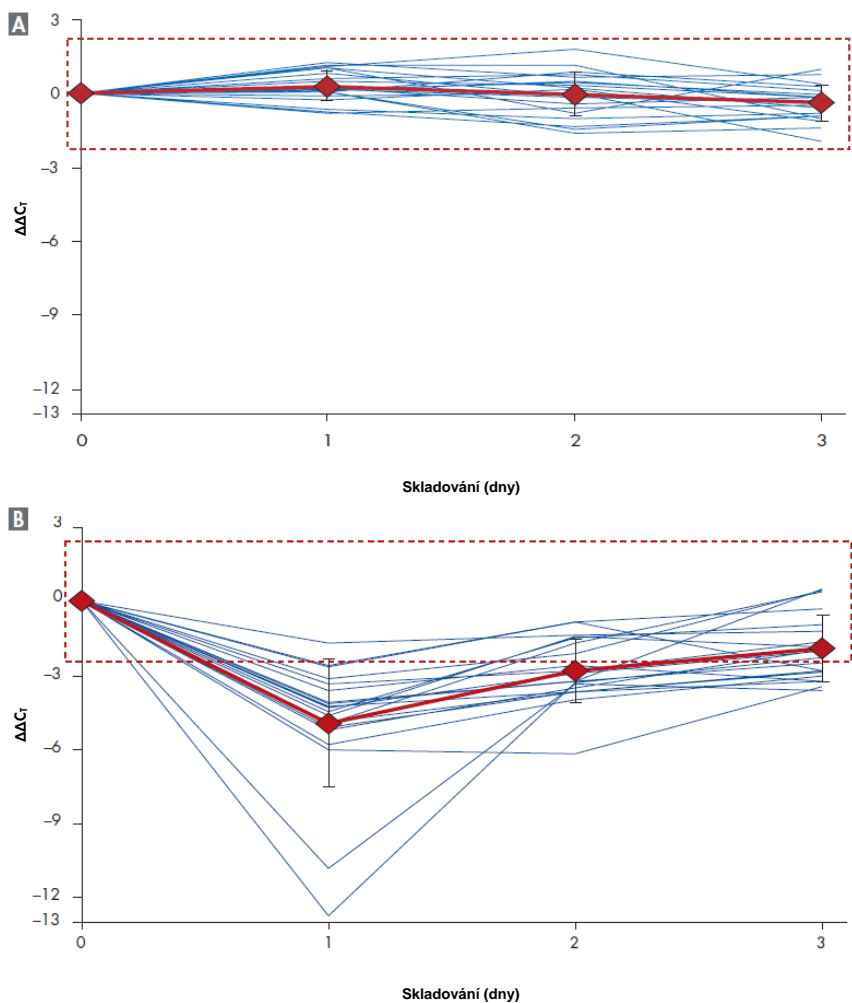
* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

Odběr a stabilizace vzorku

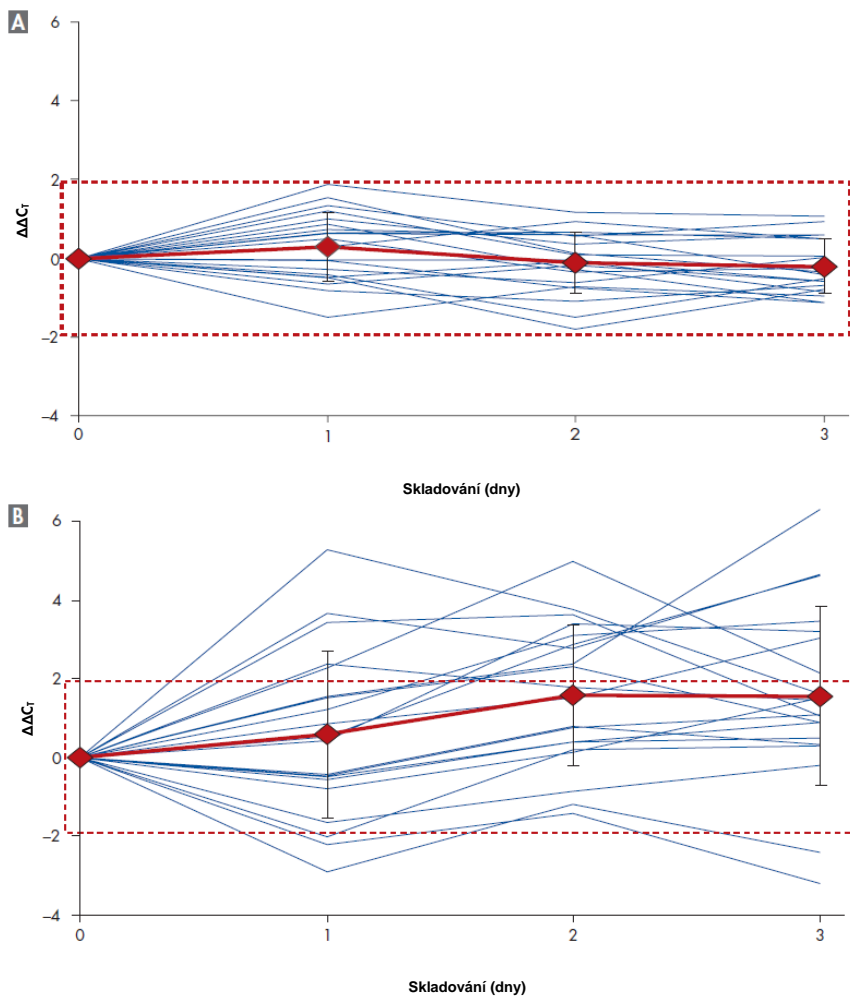
Zkumavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) obsahují originální složení reagensů, které se zakládá na patentované metodě stabilizace RNA. Toto složení reagensů chrání molekuly RNA před degradací RNázou a redukuje změny genové exprese *ex vivo* na minimum. Zkumavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) pro odběr plné lidské krve zaručují stabilizaci celulórní RNA až 3 dny při teplotě 18–25 °C (obrázek 1 a 2, strana 16 a 17) nebo až 5 dnů při teplotě 2–8 °C (obrázek 3 a 4, strana 18 a 19). Aktuálně dostupné údaje prokazují stabilitu celulórní RNA minimálně 11 let při teplotě -20 °C, případně -70 °C*. Další informace o právě probíhajících studiích, které posuzují stabilitu po ještě delší dobu, získáte u technických služeb společnosti QIAGEN.

Skutečná doba stabilizace RNA se může měnit podle druhu celulórní RNA a použité následné aplikace. Vzhledem k tomu, že byl pro stabilizační podmínky validován jen omezený počet transkriptů RNA (transkripty genů FOS a IL1B), charakteristika účinnosti nebyla stanovena pro všechny transkripty. Uživatel sady by měl zhodnotit vlastní data a údaje výrobce, aby určil, zda je validace nezbytná i pro jiné transkripty.

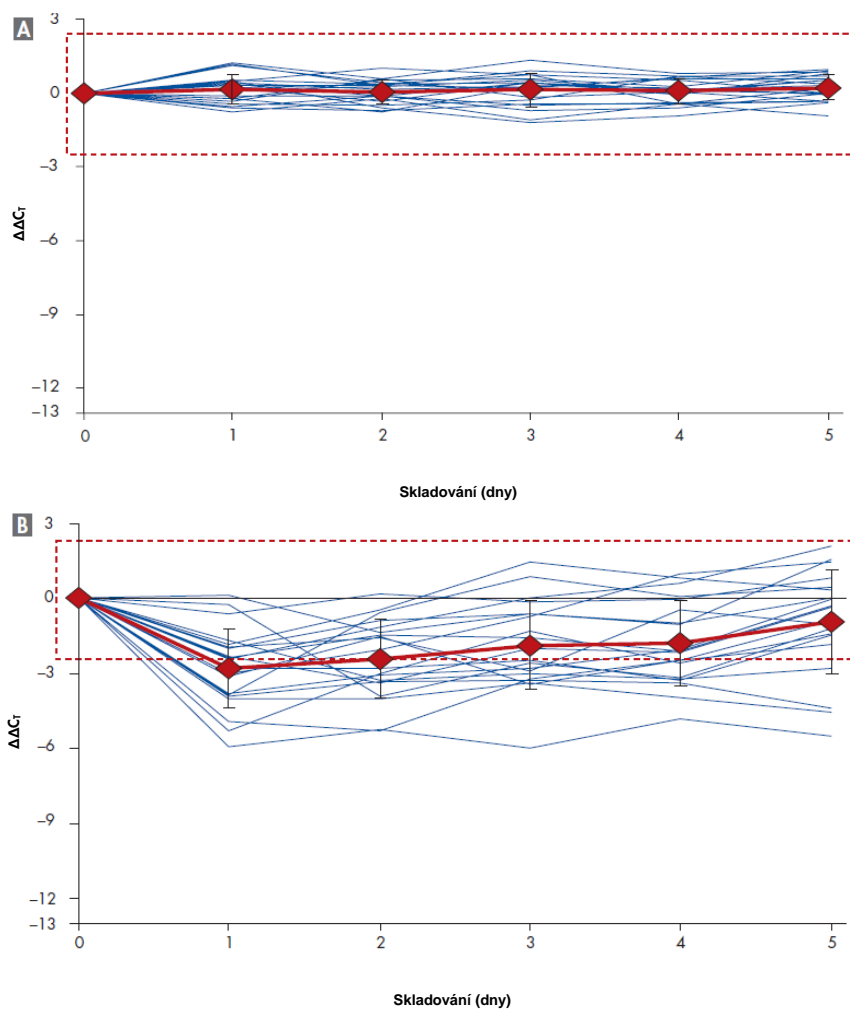
* Právě probíhá dlouhodobá studie uchovávání krve ve zkumavkách PAXgene Blood RNA Tubes.



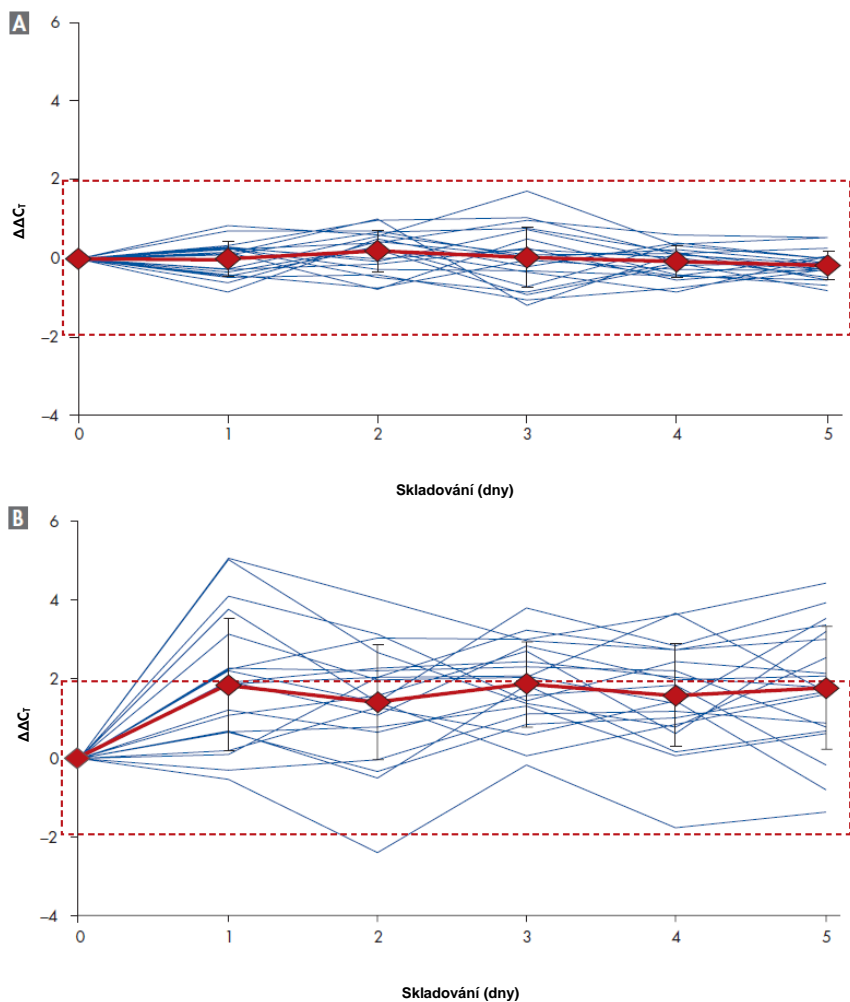
Obrázek 1. Stabilita RNA v krevních vzorcích při teplotě 18–25 °C: FOS. Krev byla odebrána 10 dárčům a před purifikací celkové RNA uskladněna při teplotě 18–25 °C po uvedený počet dnů. Všechny vzorky byly odebrány v duplikátech. **[A]** Odběr a skladování krve ve zkumavkách PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) a purifikace celkové RNA pomocí sady PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Odběr a skladování krve ve standardních odběrových zkumavkách (EDTA jako antikoagulant), purifikace celkové RNA standardní extrakční metodou (s organickými rozpouštědly) a čištění RNA pomocí silikátové membrány. Relativní koncentrace transkriptů FOS byly určeny pomocí duplexní RT-PCR v reálném čase za použití 18S-rRNA jako interního standardu. Zaneseny jsou hodnoty všech analyzovaných vzorků s průměrem a standardní odchylkou. Čárkované linie znázorňují ± 3 násobnou celkovou přesnost analýzy ($2,34 C_T$).



Obrázek 2. Stabilita RNA v krevních vzorcích při teplotě 18–25 °C: IL1B. Odběr krevních vzorků a purifikace celkové RNA po uskladnění při teplotě 18–25 °C proběhly tak, jak je popsáno na obrázku 1. Relativní koncentrace transkriptů IL1B byly určeny pomocí duplexní RT-PCR v reálném čase za použití 18S-rRNA jako interního standardu. Zaneseny jsou hodnoty všech analyzovaných vzorků s průměrem a standardní odchylkou. Čárkované linie znázorňují ± 3 násobnou celkovou přesnost analýzy ($1,93 C_T$).



Obrazek 3. Stabilita RNA v krevních vzorcích při teplotě 2-8°C: FOS. Krev byla odebrána 10 dárčům a před purifikací celkové RNA uskladněna při teplotě 2-8°C po uvedený počet dnů. Všechny vzorky byly odebrány v duplikátech. **[A]** Odběr a skladování krve ve zkumavkách PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) a purifikace celkové RNA pomocí sady PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Odběr a skladování krve ve standardních odběrových zkumavkách (EDTA jako antikoagulant), purifikace celkové RNA standardní extrakční metodou (s organickými rozpouštědly) a čištění RNA pomocí silikátové membrány. Relativní koncentrace transkriptů FOS byly určeny pomocí duplexní RT-PCR v reálném čase za použití 18S-rRNA jako interního standardu. Zaneseny jsou hodnoty všech analyzovaných vzorků s průměrem a standardní odchylkou. Čárkované linie znázorňují ± 3 násobnou celkovou přesnost analýzy (2,34 Ct).



Obrázek 4. Stabilita RNA v krevních vzorcích při teplotě 2-8°C: IL1B. Odběr krevních vzorků a purifikace celkové RNA po uskladnění při teplotě 2–8°C proběhly tak, jak je popsáno na obrázku 3. Relativní koncentrace transkriptů IL1B byly určeny pomocí duplexní RT-PCR v reálném čase za použití 18S-rRNA jako interního standardu. Zaneseny jsou hodnoty všech analyzovaných vzorků s průměrem a standardní odchylkou. Čárkované linie znázorňují ± 3 násobnou celkovou přesnost analýzy ($1,93 C_T$).

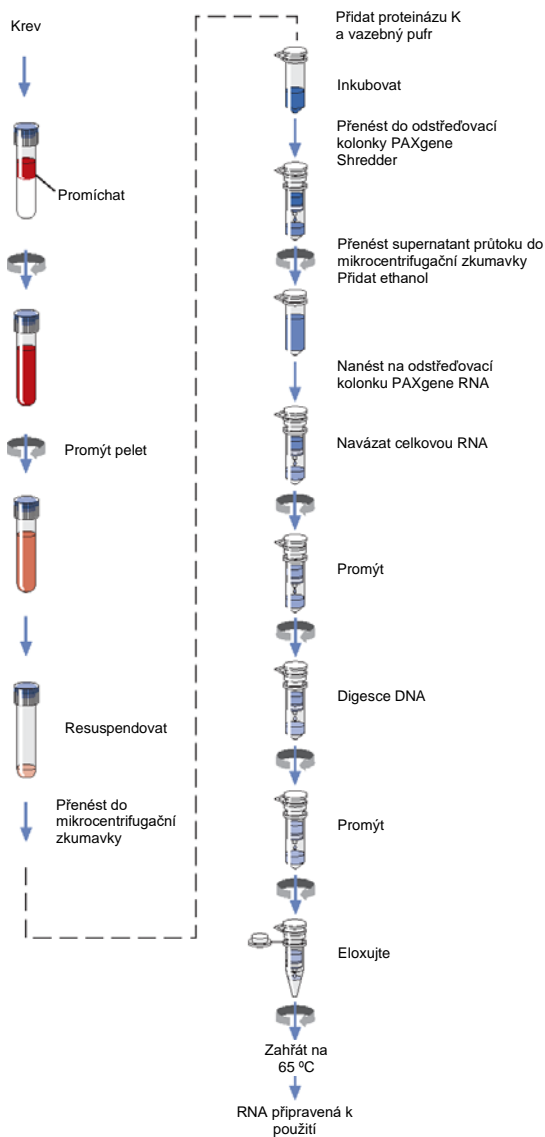
Koncentrace a purifikace RNA

Sada PAXgene Blood RNA Kit je určena k purifikaci celkové RNA z 2,5 ml plné lidské krve, která byla odebrána do zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Metoda je jednoduchá a může být provedena za užití manuálního i automatizovaného postupu (viz obrázky 5 a 10, strany 21 a 31). Purifikace RNA začíná v obou protokolech centrifugací, při které nukleové kyseliny ve zkumavce PAXgene Blood RNA Tube (BRT) sedimentují. Pelet se promyje a resuspenduje a následuje manuální nebo automatizovaná purifikace RNA. Oba protokoly v podstatě postupují podle stejných kroků a pracují se stejnými komponenty sady.

Manuální purifikace RNA

Resuspendovaný pelet se inkubuje v optimalizovaných pufrech spolu s proteinázou K (PK), aby se navodila proteinová digesce. Dodatečná centrifugace pomocí odstředovací kolonky PAXgene Shredder (PSC) slouží k homogenizaci buněčného lyzátu a k odstranění zbylého buněčného odpadu. Supernatant průtoku se přenesse do nové mikrocentrifugační zkumavky. Přidáním ethanolu se nastaví optimální vazební podmínky a lyzátní se přenesse do odstředovací kolonky PAXgene RNA (PRC). Při následné krátké centrifugaci se RNA selektivně naváže na silikagelovou membránu PAXgene, kdežto kontaminanty jí projdou. Zbylé kontaminanty se odstraní několika účinnými promývacími kroky. Mezi prvním a druhým promývacím krokem se membrána inkubuje DNázou I (RNFD), aby se odstranily případné navázané zbytky DNA. Po promývacích krocích se RNA eluuje v elučním pufru (BR5) a denaturuje teplem.

Celková RNA purifikovaná pomocí systému PAXgene Blood RNA System je čistá. Při použití manuálního protokolu leží hodnoty A_{260}/A_{280} mezi 1,8 a 2,2; podíl genomické DNA tvoří u $\geq 95\%$ všech vzorků $\leq 1,0\%$ (w/w), jak bylo změřeno pomocí kvantitativní PCR v reálném čase u jedné sekvence genu beta aktinu. Přinejmenším 95 % vzorků nevýkazovalo za užití 30 % eluátu žádnou inhibici RT-PCR.

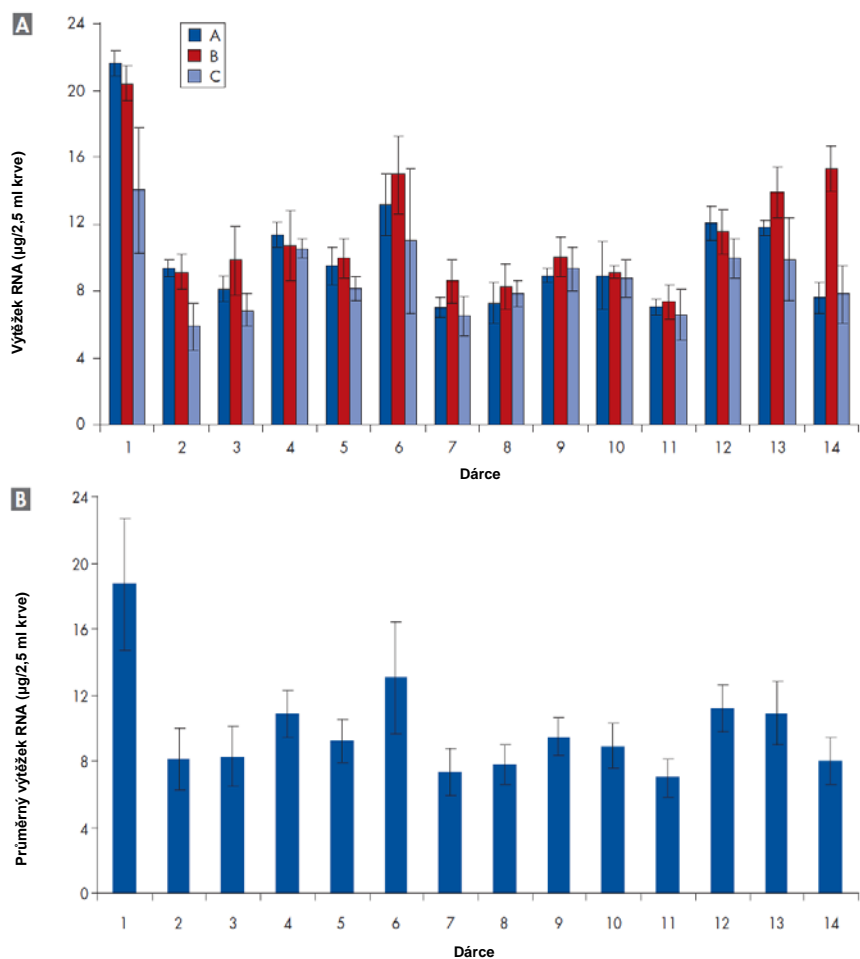


Obrázek 5. Manuální postup PAXgene Blood RNA

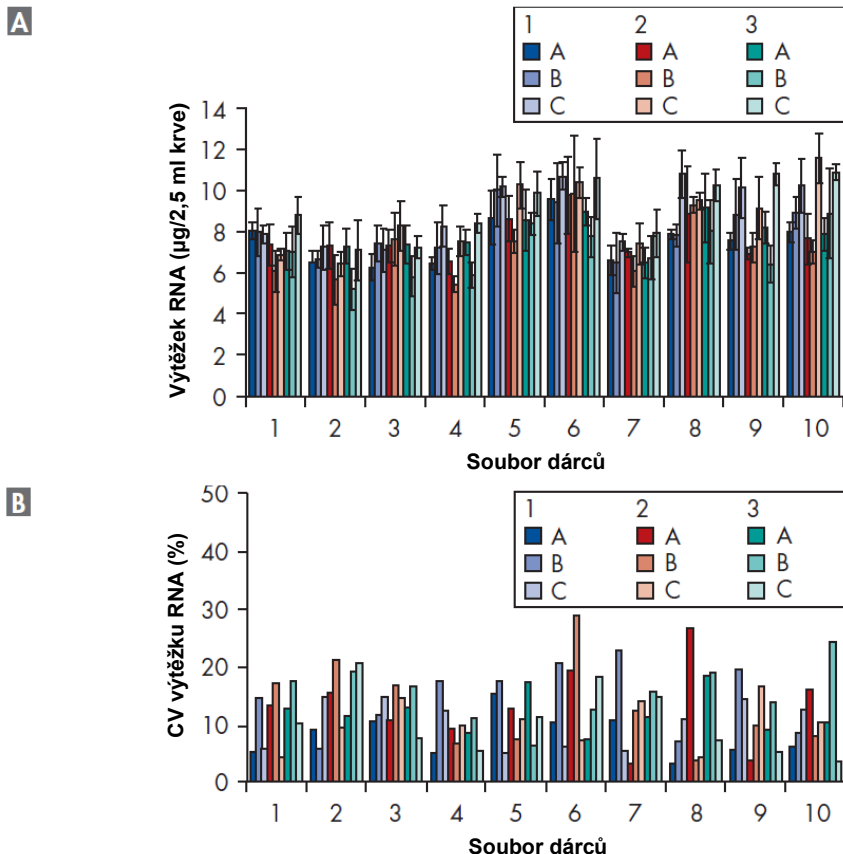
Při použití manuálního protokolu je průměrná doba přípravy vzorku (určeno na základě 12 provedených příprav RNA) přibližně 90 minut*, přičemž doba manipulace činí pouze 40 minut. U minimálně 95 % zpracovaných vzorků byl dosažen výtěžek RNA $\geq 3 \mu\text{g}$ z 2,5 ml plné krve zdravých dárců. Protože výtěžky silně závisí na dárcích, mohou se jednotlivé výtěžky RNA lišit. Systém PAXgene Blood RNA System poskytuje při testování jednotlivých osob reprodukovatelné a opakovatelné výtěžky (viz obrázek 6 a 7 na straně 23 a 24), stejně jako reprodukovatelné a opakovatelné výsledky RT-PCR (viz obrázek 8 a 9 na straně 28 a 29), takže v klinicko-diagnostických testech vykazuje vysokou robustnost.

Obrázek 6 (strana 23) zobrazuje celkovou reprodukovatelnost a opakovatelnost systému PAXgene Blood RNA System. V dalších studiích byl zkoumán jednak vliv různých šarží sady PAXgene Blood RNA Kit, jednak vliv laborantů provádějících testy na reprodukovatelnost výtěžku RNA a výsledků RT-PCR v reálném čase. Protože byly pro tyto testy použity sdružené krevní vzorky, nikoli individuální vzorky odebrané do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), výsledky těchto pokusů neodráží opakovatelnost celého systému, která zohledňuje také rozdíly při odběru krve, nýbrž pouze opakovatelnost přípravy RNA (viz obrázek 7 na straně 24).

* Celkové trvání běhu včetně přímé manipulace se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugace, promývání pelet a resuspendování pelet).



Obrázek 6. Reprodukovatelná a opakovatelná purifikace RNA. 4násobná stanovení krevních vzorků 14 dárců byla manuálně provedena 3 různými laboranty (A, B, C). Byly použity tři různé soupravy laboratorních přístrojů a jiných pomocných prostředků, přičemž každý laborant používal pro zpracování vzorků vždy jednu a tu samou soupravu přístrojů. **[A]** Zobrazeny jsou průměrné hodnoty a standardní odchylky ytěstku RNA pro každý replikát vzorku stejného dárcce zpracovaného různými laboranty. **[B]** Dvanáct replikátů krevních vzorků každého ze 14 dárců byly zpracovány 3 různými laboranty. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty a standardní odchylky ytěstku RNA pro každý vzorek stejného dárcce zpracovaný všemi laboranty. U všech vzorků RNA ležel poměr absorbancí A_{260}/A_{280} v oblasti od 1,8 do 2,2.



Obrázek 7. Opakovatelnost a reprodukovatelnost výtěžku RNA u různých laborantů a různých šarží sady PAXgene Blood RNA Kit za užití sdružených krevních vzorků. Krevní vzorky 30 různých dárců byly odebrány do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 zkumavek na dárce, celkově 360 zkumavek). Obsah všech zkumavek od 3 dárců byl sdružen a následně znovu rozpípetován na 36 vzorků. Těchto 36 vzorků na jeden soubor 3 dárců bylo manuálně zpracováno 3 různými laboranty. Každý laborant použil pro izolaci RNA 3 různé šarže sady PAXgene Blood RNA Kit a zpracoval čtyři replikáty z každého z 10 souborů dárců. **[A]** Výtěžek RNA a standardní odchylka pro každou kombinaci laborant-šarže. Čtyřikrát opakované zpracování krevních vzorků z 10 souborů dárců bylo provedeno 3 různými laboranty (A, B, C) pomocí každé ze tří šarží sady (1, 2, 3). Zobrazeny jsou průměrné výtěžky (sloupce) a standardní odchylky (chybové úsečky) na jedno čtyřnásobné stanovení ze stejného souboru dárců pro různé laboranty a šarže sady. **[B]** Variační koeficient (CV) výtěžku RNA na jeden soubor dárců pro všechny kombinace laborant-šarže (A, B, C; 1, 2, 3); vypočítáno z průměrných výtěžků a standardních odchylek výtěžků zobrazených na obrázku 7A.

Tabulka 1A. Reprodukovatelnost v rámci každé šarže a každého uživatele pro zvolené soubory dárců (1, 6, 9, 10)

Kombinace dat	Soubor dárců 1 5,1 x 10 ⁶ buněk/ml			Soubor dárců 6 6,5 x 10 ⁶ buněk/ml		
	Průměrný výtěžek (μg)	SD (μg)	CV (%)	Průměrný výtěžek (μg)	SD (μg)	CV (%)
Šarže 1, uživatel A	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
Šarže 1, uživatel B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
Šarže 1, uživatel C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
Šarže 2, uživatel A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
Šarže 2, uživatel B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
Šarže 2, uživatel C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
Šarže 3, uživatel A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
Šarže 3, uživatel B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
Šarže 3, uživatel C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
Kombinace dat	Soubor dárců 9 8,4 x 10 ⁶ buněk/ml			Soubor dárců 10 10,2 x 10 ⁶ buněk/ml		
	Průměrný výtěžek (μg)	SD (μg)	CV (%)	Průměrný výtěžek (μg)	SD (μg)	CV (%)
Šarže 1, uživatel A	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
Šarže 1, uživatel B	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Šarže 1, uživatel C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Šarže 2, uživatel A	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Šarže 2, uživatel B	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Šarže 2, uživatel C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Šarže 3, uživatel A	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Šarže 3, uživatel B	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Šarže 3, uživatel C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3

Tabulka 1B. Reprodukovatelnost v rámci každého uživatele a mezi všemi šaržemi pro zvolené soubory dárců (1, 6, 9, 10)

Kombinace dat	Soubor dárců 1 5,1 x 10 ⁶ buněk/ml			Soubor dárců 6 6,5 x 10 ⁶ buněk/ml		
	Průměrný výtěžek (µg)	SD (µg)	CV (%)	Průměrný výtěžek (µg)	SD (µg)	CV (%)
Uživatel A, všechny šarže	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Uživatel B, všechny šarže	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Uživatel C, všechny šarže	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Kombinace dat	Soubor dárců 9 8,4 x 10 ⁶ buněk/ml			Soubor dárců 10 10,2 x 10 ⁶ buněk/ml		
	Průměrný výtěžek (µg)	SD (µg)	CV (%)	Průměrný výtěžek (µg)	SD (µg)	CV (%)
Uživatel A, všechny šarže	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Uživatel B, všechny šarže	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Uživatel C, všechny šarže	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

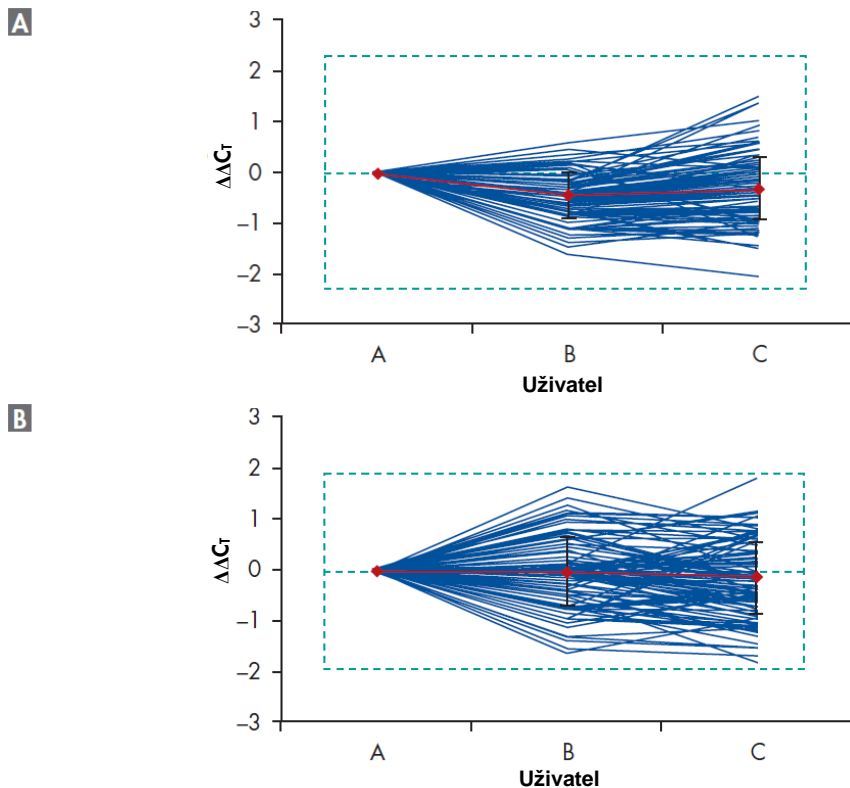
Tabulka 1C. Reprodukovatelnost v rámci každé šarže a mezi všemi uživateli pro zvolené soubory dárců (1, 6, 9, 10)

Kombinace dat	Soubor dárců 1 5,1 x 10 ⁶ buněk/ml			Soubor dárců 6 6,5 x 10 ⁶ buněk/ml		
	Průměrný výtěžek (µg)	SD (µg)	CV (%)	Průměrný výtěžek (µg)	SD (µg)	CV (%)
Šarže 1, všichni uživatelé	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Šarže 2, všichni uživatelé	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Šarže 3, všichni uživatelé	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Kombinace dat	Soubor dárců 9 8,4 x 10 ⁶ buněk/ml			Soubor dárců 10 10,2 x 10 ⁶ buněk/ml		
	Průměrný výtěžek (µg)	SD (µg)	CV (%)	Průměrný výtěžek (µg)	SD (µg)	CV (%)
Šarže 1, všichni uživatelé	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Šarže 2, všichni uživatelé	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Šarže 3, všichni uživatelé	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

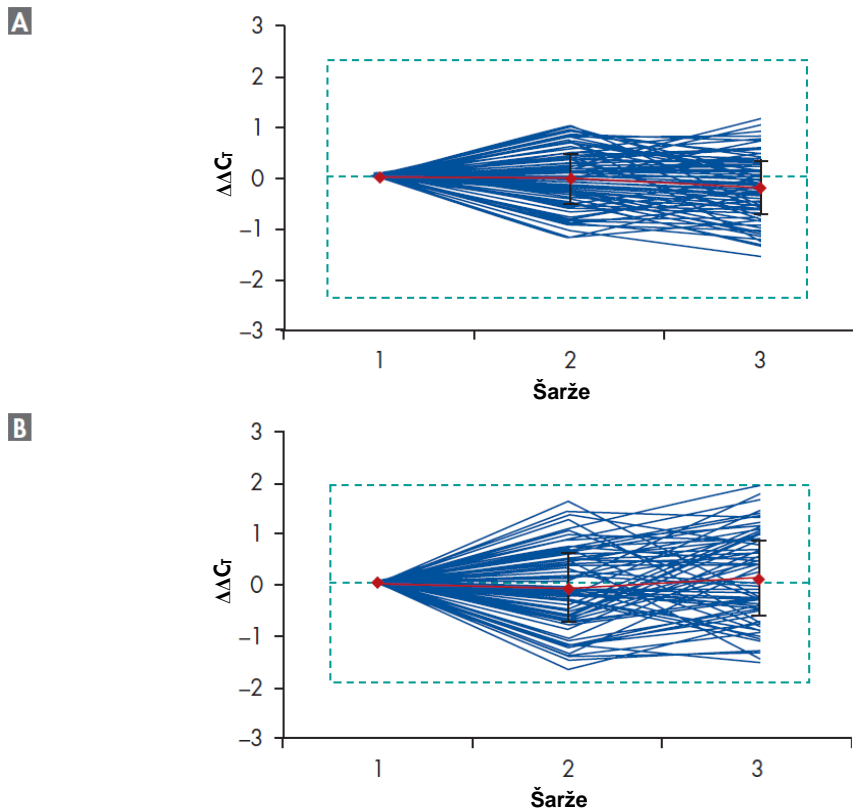
Tabulka 1D. Reprodukovatelnost mezi všemi šaržemi a všemi uživateli pro zvolené soubory dárců (1, 6, 9, 10)

Kombinace dat	Soubor dárců 1 5,1 x 10⁶ buněk/ml			Soubor dárců 6 6,5 x 10⁶ buněk/ml		
	Průměrný výtěžek (μg)	SD (μg)	CV (%)	Průměrný výtěžek (μg)	SD (μg)	CV (%)
Šarže 1, všichni uživatelé	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
Kombinace dat	Soubor dárců 9 8,4 x 10⁶ buněk/ml			Soubor dárců 10 10,2 x 10⁶ buněk/ml		
	Průměrný výtěžek (μg)	SD (μg)	CV (%)	Průměrný výtěžek (μg)	SD (μg)	CV (%)
Šarže 1, všichni uživatelé	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Detailní analýza 4 reprezentativních souborů dárců. Soubory byly vybrány podle počtu leukocytů a odrážejí nejvyšší, střední a nejnižší hodnotu normálního rozsahu počtu leukocytů ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocytů/ml). Počet leukocytů představuje průměrnou hodnotu 3 testů počtu leukocytů od 3 dárců na jeden soubor dárců.



Obrázek 8. Reprodukovatelnost RT-PCR – mezi uživateli. Vzorky RNA izolované v experimentu popsaném na obr. 7 byly použity pro RT-PCR v reálném čase. Relativní koncentrace transkriptu **[A]** FOS a **[B]** IL1B byly určeny pomocí duplexní RT-PCR v reálném čase za užití 18S-rRNA jako interního standardu. Zobrazeny jsou hodnoty všech vzorků, a sice v poměru k hodnotám pro uživatele 1 (10 souborů dárců x 3 šarže sady x 4 replikáty = 120 souborů dat pro každý gen) s průměrem (červená čára) a standardní odchylkou (černá úsečka). Čárkované linie znázorňují ± 3 násobnou celkovou přesnost analýz (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).



Obrázek 9. Reprodukovatelnost RT-PCR – mezi šaržemi sady. Vzorky RNA izolované v experimentu popsaném na obr. 7 byly použity pro RT-PCR v reálném čase. Relativní koncentrace transkriptu **[A]** FOS a **[B]** IL1B byly určeny pomocí duplexní RT-PCR v reálném čase za užití 18S-rRNA jako interního standardu. Zobrazeny jsou hodnoty všech vzorků, a sice v poměru k hodnotám pro šarži sady 1 (10 souborů dárců x 3 šarže sady x 4 replikáty = 120 souborů dat pro každý gen) s průměrem (červená čára) a standardní odchylkou (černá úsečka). Čárkované linie znázorňují ± 3 násobnou celkovou přesností analýz (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).

Tabulka 2. Souhrn dat RT-PCR z obrázků 8 a 9

Testovací systém	Rozbor FOS/18S-rRNA		Rozbor IL1B/18S-rRNA	
	Průměr ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Průměr ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Reprodukovatelnost v rámci každého uživatele a mezi všemi šaržemi				
Všichni uživatelé, šarže 1 – šarže 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Všichni uživatelé, šarže 1 – šarže 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Všichni uživatelé, šarže 1 – šarže 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Reprodukovatelnost v rámci každého uživatele a mezi všemi šaržemi				
Všechny šarže, uživatel A – uživatel A	0,00	0,00	0,00	0,00
Všechny šarže, uživatel A – uživatel B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Všechny šarže, uživatel A – uživatel C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Uživatel: Laboratorní technik, který prováděl experimenty.

Šarže: Číslo šarže použité sady v této studii.

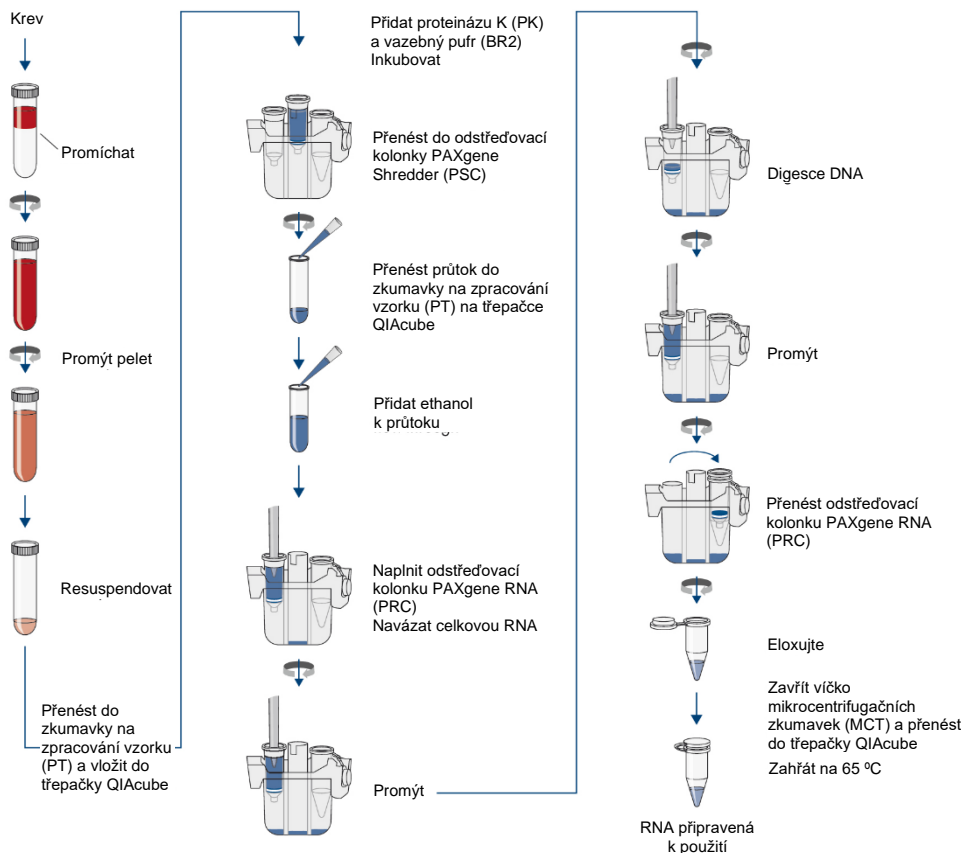
SD: Standardní odchylka.

Zobrazeny jsou průměry hodnot $\Delta\Delta C_T$ (N = 120) a standardní odchylky dat znázorněných na obrázcích 8 a 9.

Automatizovaná purifikace RNA

Příprava vzorku je automatizována pomocí standardního přístroje QIAcube® (kat. č. 9001882 [110 V], kat. č. 9001293 [230 V]; nezahrnuje však QIAcube Connect) a provádí se stejným postupem jako manuální příprava, takže vám umožňuje dále používat pro přípravu vysoce kvalitní RNA sadu PAXgene Blood RNA Kit. Více informací o přístroji QIAcube najdete v *uživatelské příručce QIAcube* (QIAcube User Manual) nebo na stránkách www.qiagen.com/MyQIAcube.

Protokol automatizované purifikace RNA obsahuje 2 části (resp. protokoly) „PAXgene Blood RNA Part A“ a „PAXgene Blood RNA Part B“, mezi nimiž je krátký krok vyžadující manuální zásah (viz obrázek 10, strana 31).



Obrázek 10. Automatizovaný postup PAXgene Blood RNA.

Centrifugovaný, promytý a resuspendovaný pelet nukleové kyseliny (viz „Koncentrace a purifikace RNA“, strana 20) se přenesou ze zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) do zkumavek na zpracování vzorku (PT), které jsou umístěny v termotřepačce na pracovní desce přístroje QIAcube. Laborant z nabídky vybere a spustí protokol „PAXgene Blood RNA Part A“. Přístroj QIAcube provede kroky protokolu až po eluci RNA v elučním pufru (BR5). Laborant přenesou mikrocentrifugační zkumavky (MCT) obsahující purifikovanou

RNA do termotřepačky přístroje QIAcube. Z nabídky vybere a spustí protokol „PAXgene Blood RNA Part B“, přičemž tepelná denaturace proběhne v přístroji QIAcube.

Průměrná doba přípravy vzorku (stanovená na základě příprav 12 vzorků) je 151 minut*, přičemž ve srovnání s manuálním protokolem zahrnuje podstatně méně času přímé práce se systémem.

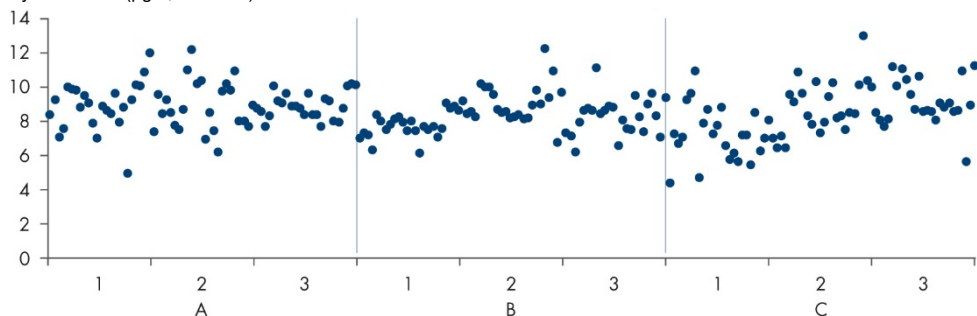
U minimálně 95 % zpracovaných vzorků byl dosažen výtěžek RNA $\geq 3 \mu\text{g}$ z 2,5 ml plné krve zdravých dárců. Obrázek 11 (strana 33) uvádí výtěžky RNA ze všech 216 vzorků, které byly za užití automatizovaného protokolu zpracovány 3 laboranty se 3 šaržemi sady. Protože byly pro tyto testy použity sdružené krevní vzorky, nikoli individuální vzorky odebrané do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), výsledky neodráží výtěžky RNA očekávané u individuálních vzorků z jednotlivých odběrů krve. Protože výtěžky silně závisí na dárcích, mohou se jednotlivé výtěžky RNA lišit (obrázek 11, strana 33).

Přinejmenším 95 % vzorků nevykazovalo za užití 30 % eluátu žádnou inhibici RT-PCR. U automatizovaného protokolu nebyly detekovány žádné křížové kontaminace mezi vzorky, jak prokázala kvantitativní RT-PCR v reálném čase u sekvencí transkriptů ABL1 a FOS v RNA negativních vzorcích (voda) spárovaných s RNA pozitivními vzorky (plná lidská krev) ve stejném běhu.

RNA purifikovaná pomocí systému PAXgene Blood RNA System a automatizovaného protokolu je čistá, jak ukazuje nepřítomnost inhibice RT-PCR (viz obrázek 11, strana 33) a hodnoty A_{260}/A_{280} mezi 1,8 a 2,2. Podíl genomické DNA tvoří u $\geq 95 \%$ všech vzorků $\leq 1,0 \%$ (w/w), jak bylo změřeno pomocí kvantitativní PCR v reálném čase u jedné sekvence genu beta aktinu. Obrázky 12 a 13 (strany 33 a 34) znázorňují hodnoty A_{260}/A_{280} a relativní genomickou DNA všech 216 vzorků připravených pomocí automatizovaného protokolu 3 laboranty se 3 šaržemi.

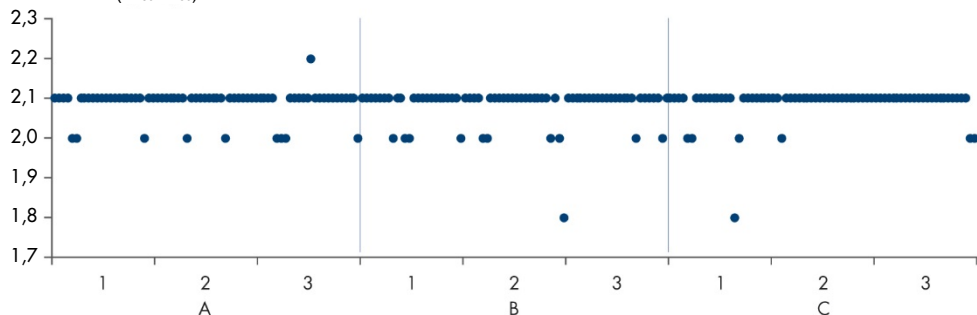
* Celkové trvání běhu včetně přímé manipulace se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugace, promývání pelet a resuspendování pelet).

Výtěžek RNA ($\mu\text{g}/2,5 \text{ ml}$ krve)



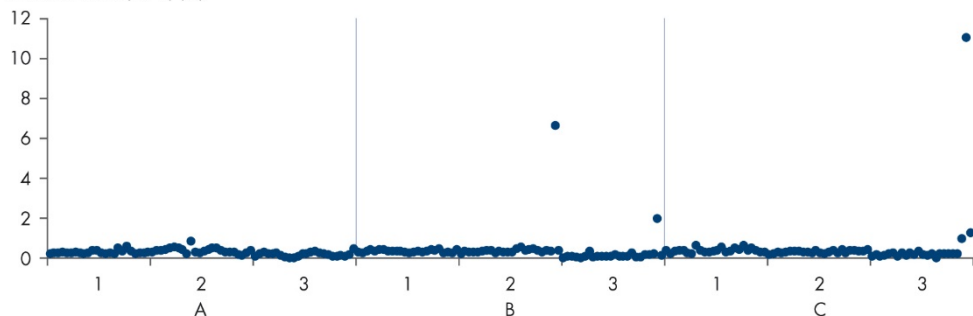
Obrázek 11. Výtěžek RNA – automatizované zpracování. Krevní vzorky 36 různých dárců byly odebrány do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 6 zkumavek na dárce, celkově 216 zkumavek). Obsah všech zkumavek od 6 dárců byl sdružen a následně znovu rozpípetován na 36 vzorků. Těchto 36 vzorků na jeden soubor 6 dárců bylo zpracováno 3 různými laboranty (A, B, C). Každý laborant použil pro automatizovanou izolaci RNA tři různé šarže (1, 2, 3) sady PAXgene Blood RNA Kit a zpracoval čtyři replikáty z každého z 6 souborů dárců. Zobrazeny jsou výtěžky RNA všech jednotlivých vzorků na každou kombinaci laborant-šarže.

Čistota RNA (A_{260}/A_{280})



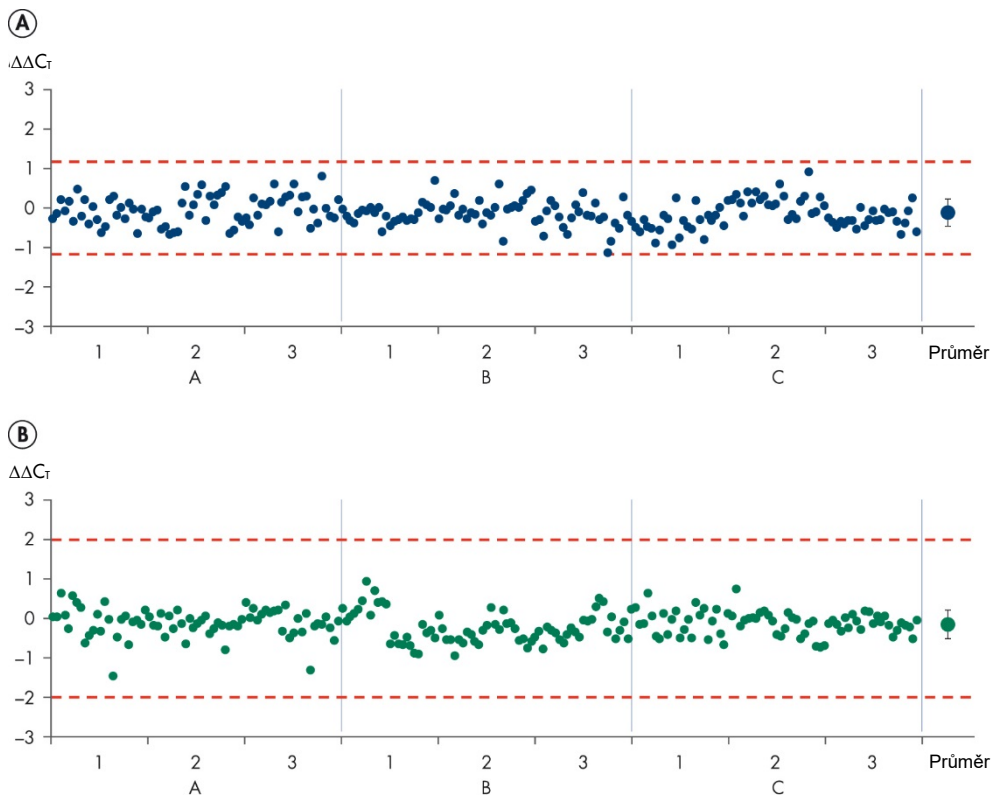
Obrázek 12. Čistota RNA (hodnoty A_{260}/A_{280}) – automatizované zpracování. RNA byla v rámci experimentu popsaném na obrázku 11 purifikována 3 různými laboranty (A, B, C) za užití 3 různých šarží (1, 2, 3) sady PAXgene Blood RNA Kit. Zobrazeny jsou hodnoty A_{260}/A_{280} všech jednotlivých vzorků na každou kombinaci laborant-šarže.

Genomická DNA (hm/hm; %)



Obrázek 13. Čistota RNA (% kontaminace genomickou DNA) – automatizované zpracování. RNA byla v rámci experimentu popsaném na obrázku 11 purifikována 3 různými laboranty (A, B, C) za užití 3 různých šarží (1, 2, 3) sady PAXgene Blood RNA Kit. Zobrazeno je množství genomické DNA (w/w) ve všech jednotlivých vzorcích pro každou kombinaci laborant-šarže.

Automatizovaný protokol purifikace RNA za užití systému PAXgene Blood RNA System poskytuje vysoce reprodukovatelné a opakovatelné výsledky RT-PCR, jak je znázorněno na obrázku 14 (strana 35), takže v klinicko-diagnostických testech vykazuje vysokou robustnost.



Obrázek 14. Reprodukovanost RT-PCR – mezi automatizovaným a manuálním protokolem. RNA byla v rámci experimentu popsaném na obrázku 11 purifikována 3 různými laboranty (A, B, C) za užití 3 různých šarží (1, 2, 3) sady PAXgene Blood RNA Kit na základě automatizovaného protokolu. Zároveň byla RNA purifikována z odpovídajících replikátů za užití manuálního protokolu. Relativní koncentrace transkriptu **[A]** FOS a **[B]** IL1B byly určeny pomocí duplexní RT-PCR v reálném čase za užití 18S-rRNA jako interního standardu. Možné rozdíly v koncentraci transkriptů mezi RNA připravenou ze spárovaných krevních vzorků za užití obou extrakčních protokolů (manuální a automatizovaný protokol) byly vypočítány na základě metody $\Delta\Delta C_T$. Jednotlivé hodnoty $\Delta\Delta C_T$ všech párů vzorků (4 replikáty x 6 souborů dárců x 3 šarže sady x 3 laboranti = 216 párů každého genu) jsou znázorněny jako jednotlivé body s průměrem (větší body) a standardní odchylkou (černé úsečky). Čárkované linie znázorňují ± 3 násobnou celkovou přesnost analýz (FOS: 1,16 Ct; IL1B: 1,98 Ct; jiné přesnosti testů ve srovnání s obrázky 1–4, 8 a 9 z důvodu jiných verzí testů).

Vybavení a reagenty, které má zajistit uživatel

Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (safety data sheets, SDS), které obdržíte od dodavatele výrobku.

Pro všechny protokoly

- PAXgene Blood RNA Tubes (zkumavky BRT pro odběr RNA z krve; kat. čís. 762165)
- Ethanol (96–100 %, stupeň čistoty p.a.)
- Pipety* (10 µl – 4 ml)
- Sterilní pipetovací špičky bez obsahu RNázy, s aerosolovou bariérou jako ochranou před kontaminací†
- Odměrný válec‡
- Centrifuga* s výkyvným rotorem a vhodnými adaptéry pro zkumavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) a s rychlostí od 3000–5000 x g
- Vířivý mixér (Vortex)*
- Drcený led
- Permanentní fixa pro popisování

Pro manuální protokol

- Mikrocentrifuga* s rotorem pro 2ml mikrocentrifugační zkumavky a s variabilní rychlostí od 1000–8000 x g, ačkoli se používají nižší a vyšší síly g (podrobnosti najdete v krocích protokolu)

* Ujistěte se, že jsou přístroje kontrolovány, udržovány a pravidelně kalibrovány podle doporučení výrobce.

† Zajistěte, abyste byli obeznámeni s pokyny pro manipulaci s RNA (příloha A, strana 64).

‡ K odměření množství ethanolu, které se přidává ke koncentráту pufru BR4.

- Třepací inkubátor* pro inkubaci při 55 °C a 65 °C s variabilní rychlostí mezi 400 a 1400 ot./min. (např. Eppendorf® Thermomixer Compact nebo ekvivalent)

Pro automatizovaný protokol

- QIAcube* (QIAGEN, kat. čís. 9001882 [110 V], kat. čís. 9001293 [230 V])
- Nůžky

Spotřební materiál QIAcube

- Filter-Tips, 1000 µl (1024) (QIAGEN, kat. čís. 990352 (špičky s filtrem))[†]
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, kat. čís. 990393 (reagenční lahvičky))[†]
- Rotor Adapters (10 x 24) (QIAGEN, kat. čís. 990394 (adaptéry do rotoru))[†]

Doplňky QIAcube

- Reagent Bottle Rack (QIAGEN, kat. čís. 990390 (stojan na reagenční lahvičky))[†]
- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, kat. čís. 990392 (držák pro adaptéry do rotoru))[†]

* Ujistěte se, že jsou přístroje kontrolovány, udržovány a pravidelně kalibrovány podle doporučení výrobce.

[†] Obsaženo také v úvodním balíčku Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, kat. čís. 990395)

Důležité poznámky

Používání přístroje QIAcube

Ujistěte se, že jste obeznámeni s manipulací s přístrojem QIAcube. Prostudujte si uživatelskou příručku k přístroji *QIAcube User Manual* a veškeré dodatečné informace dodávané s přístrojem QIAcube. Před zahájením automatizovaného protokolu PAXgene Blood RNA věnujte zvláštní pozornost bezpečnostním informacím.

Spuštění přístroje QIAcube

Zavřete dvířka přístroje QIAcube a pomocí síťového vypínače přístroj QIAcube zapněte (viz obrázek 15, strana 39).

Ozve se pípnutí a zobrazí se startovací obrazovka. Přístroj automaticky provede zahajovací testy.

Instalace protokolů na přístroji QIAcube

Před prvním během přípravy RNA na přístroji QIAcube je nutné provést úvodní instalaci protokolů. Nainstalujte oba protokoly „PAXgene Blood RNA Part A“ a „PAXgene Blood RNA Part B“.

Protokoly jsou k dispozici na stránkách **www.qiagen.com/MyQIAcube**. Je nutné je stáhnout na flash disk USB dodávaný spolu s přístrojem QIAcube a přenést do přístroje QIAcube přes port USB.

Port USB, který se nachází za ochranným panelem (viz obrázek 15, strana 39), umožňuje spojení mezi přístrojem QIAcube a flash diskem USB (dodávaným s přístrojem QIAcube). Soubory dat, jako například soubory typu log či report, mohou být také přeneseny přes port USB z přístroje QIAcube na flash disk USB.



Port USB se smí používat pouze pro flash disk USB dodávaný společností QIAGEN. Do tohoto portu nepřipojujte jiná zařízení.



Nevyjímejte flash disk USB během stahování protokolů, přenosu souborů dat nebo při běhu protokolu.



Obrázek 15. Přední strana přístroje QIAcube

1

Dotyková obrazovka

2

Dvířka

3

Sériový port RS232 za ochranným panelem (pro použití pouze servisními technikami společnosti QIAGEN)

4

Port USB za ochranným panelem

5

Síťový vypínač

6

Odpadní zásuvka

Naplnění přístroje QIAcube

Abyste ušetřili čas, můžete přístroj QIAcube naplnit během jednoho nebo obou 10minutových centrifugačních kroků (krok 3 a 5), jak uvádí kapitola „Protokol: Automatizovaná purifikace celkové RNA z plné lidské krve odebrané do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)“, strana 57.

Reagenční lahvičky

Před každým během na přístroji QIAcube opatrně naplňte 4 reagenční lahvičky uvedené v tabulce 3 reagensiemi až po vyznačenou rysku pro maximum, pokud to není možné, do úrovně dané objemy pufrů dodávaných v sadě PAXgene Blood RNA Kit. Na naplněné lahvičky a víčka jasně napište názvy pufrů a umístěte je do náležitých pozic na stojanu na reagenční lahvičky. Stojan umístěte na pracovní desku přístroje QIAcube, jak je znázorněno (obr. 16 a 17, strany 41 a 42).



Dodávaný objem pufru BR2 nenaplní reagenční lahvičku po vyznačenou rysku. Pufrы BR3 a BR4 nemusí naplnit lahvičku po vyznačenou rysku, pokud byly použity ke zpracování většího počtu vzorků v předchozích bězích.



Před umístěním lahviček na pracovní desku se ujistěte, že jste z nich odstranili víčka.

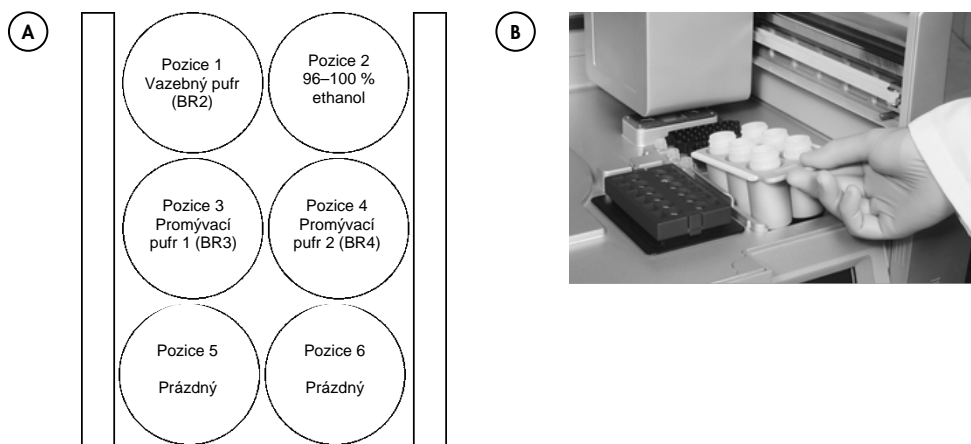


Objem pufrů dodávaných se sadou PAXgene Blood RNA Kit (50) vystačí maximálně na 7 běhů přípravy RNA v přístroji QIAcube, přičemž čísla vzorků v každém běhu jsou označena 2 až 12. Obecně by se běhy s nižšími čísly vzorků neměly používat, aby se v každé sadě zpracovalo celkem 50 vzorků s maximálně 7 běhy přípravy RNA. Více než 7 běhů přípravy RNA může mít za následek nedostatečný objem pufru pro zpracování posledních vzorků.

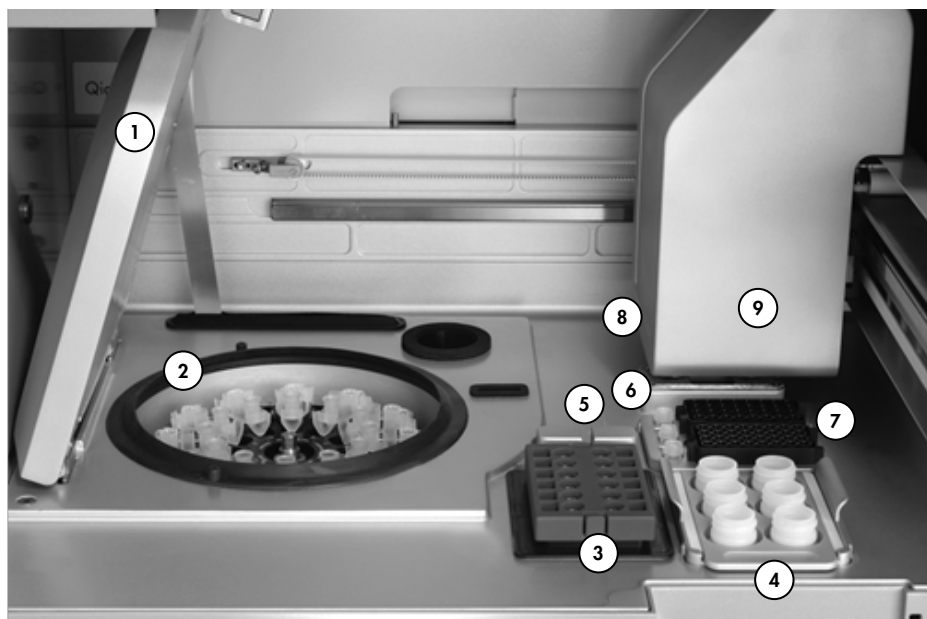
Tabulka 3. Pozice na stojanu na reagenční lahvičky

Pozice	Reagencie
1	Vazebný pufr (BR2)
2	96–100 % ethanol
3	Promývací pufr 1 (BR3)
4	Promývací pufr 2 (BR4)*
5	– (ponechte prázdnou)
6	– (ponechte prázdnou)

* Promývací pufr 2 (BR4) je dodáván jako koncentrát. Před prvním použitím přidejte do lahvičky 4násobný objem ethanolu (96–100 %, stupeň čistoty p.a.), jak je popsáno na štítku, abyste vytvořili pracovní roztok.



Obrázek 16. Vložení stojanu na reagenční lahvičky. [A] Schéma pozic a obsahu lahviček na stojanu pro reagenční lahvičky. [B] Vložení stojanu do přístroje QIAcube.



Obrázek 17. Náhled do vnitřního prostoru přístroje QIAcube

- | | |
|--------------------------------|--|
| ① Víko centrifugy | ⑥ Drážky pro mikrocentrifugační zkušavky |
| ② Centrifuga | ⑦ Stojany na špičky |
| ③ Třepačka | ⑧ Otvory pro likvidaci špiček a kolonek |
| ④ Stojan na reagenční lahvičky | ⑨ Robotická ruka |
| ⑤ Senzor pro kontrolu špiček | |

Kolonky (PRC, PSC), mikrocentrifugační zkušavky (MCT) a umělohmotné části přístroje QIAcube

Umístěte 2 stojany na špičky naplněné špičkami s filtry o objemu 1000 µl do přístroje QIAcube (viz obrázek 17, strana 42). Je-li potřeba, stojany doplňte.



Používejte pouze špičky s filtrem o objemu 1000 µl určené pro použití s přístrojem QIAcube.

Popište permanentní fixou adaptéry do rotoru a mikrocentrifugační zkušavky (MCT) pro každý vzorek. Otevřete odstředovací kolonky PAXgene Shredder (PSC) určené k použití a nůžkami zcela odstříhnete víčka (viz obrázek 18, strana 44).



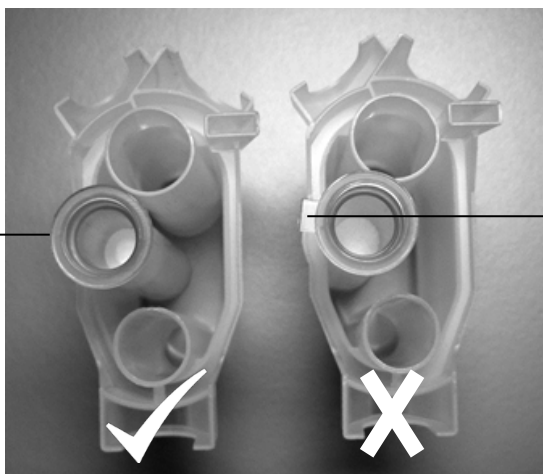
Aby mohla robotická ruka přístroje QIAcube správně pracovat, zcela odstraňte (odstříhnete) víčka a umělohmotné části spojující víčko a kolonku PAXgene Shredder (PSC; viz obrázek 16). Jinak nemůže robotická ruka kolonky (PSC, PRC) správně uchopit.

Vložte odstředovací kolonku PAXgene RNA (PRC), kolonku PAXgene Shredder (PSC, bez víček) a popsanou mikrocentrifugační zkušavku (MCT) do náležitých pozic do každého popsaného adaptéru, jak je uvedeno v tabulce 4 a na obrázku 19 (strana 44).



Ujistěte se, že jsou víčka kolonek (PRC) a mikrocentrifugačních zkušavek (MCT) stlačena až na konec drážek na okraji adaptéru do rotoru, jinak se mohou víčka během centrifugace odlomit.

Správně
odstraně
é víčko
kolonky



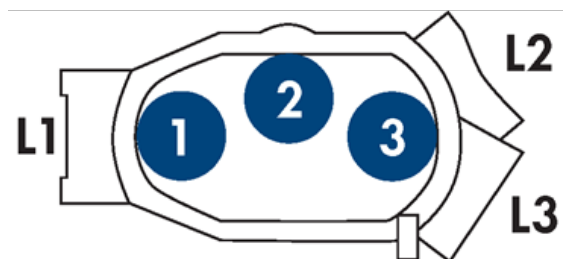
Nesprávně
odstraněné
víčko
kolonky;
část víčka je
stále
přichycena

Obrázek 18. Vložení odstředovací kolonky PAXgene Shredder (PSC). Odstředovací kolonka PAXgene Shredder (PSC) je vložena do střední pozice adaptéru rotoru. Před vložením kolonky (PSC) odstříhněte víčko.

Tabulka 4. Laboratorní materiál v adaptéru do rotoru

Pozice	Reagencie	Pozice víčka
1	Odstředovací kolonka PAXgene RNA (červená, PRC)	L1
2	Odstředovací kolonka PAXgene Shredder (fialová, PSC) (před vložením do adaptéru rotoru odstříhněte víčko)	–
3	Mikrocentrifugační zkušavka (MCT)*	L3

* Používejte mikrocentrifugační zkušavky (1,5 ml) dodávané se sadou PAXgene Blood RNA Kit.



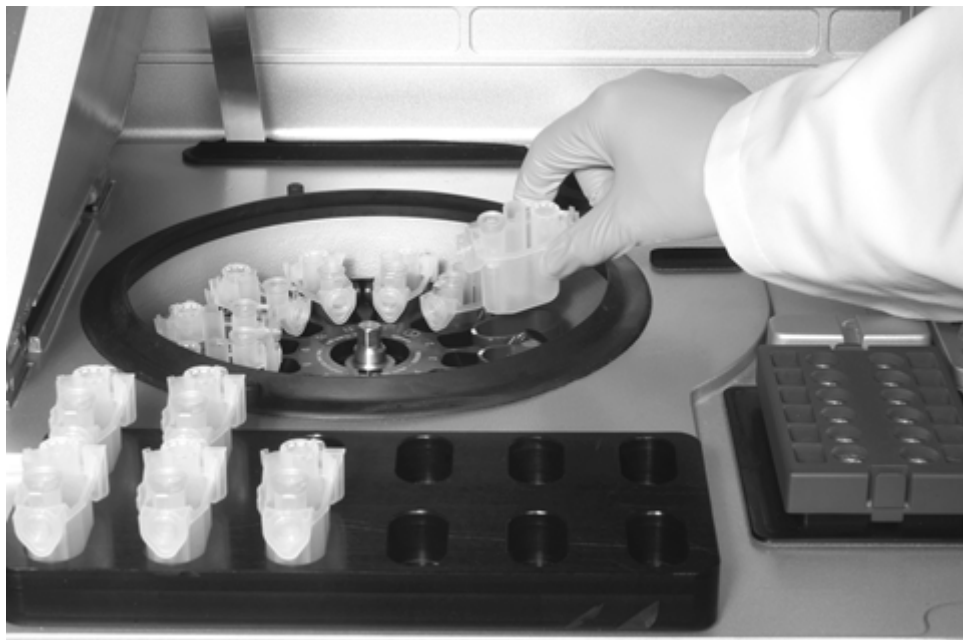
Obrázek 19. Pozice v adaptéru do rotoru. Adaptér do rotoru má tři pozice pro zkušavky (1–3) a tři pozice pro víčka (L1–L3).

Plnění centrifugy

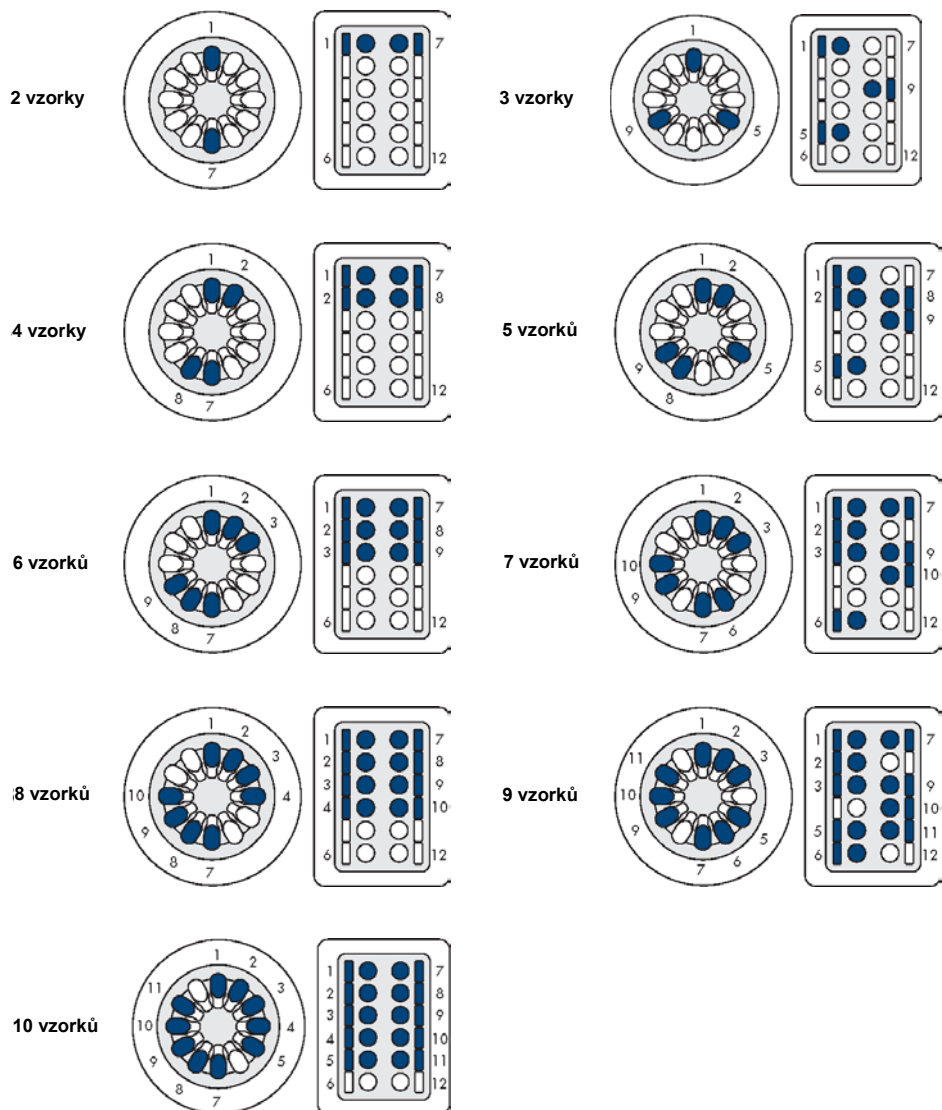
Vložte sestavené adaptéry do rotoru do jamek centrifugy, jak je ukázáno na obrázku 20 níže.



Při zpracování méně než 12 vzorků musí být rotor centrifugy naplněn paprskovitě (viz obrázek 21, strana 46), aby zůstal vyvážen. Před začátkem běhu protokolu musí být nasazeny všechny jamky centrifugy, a to i v případě, že je zpracováváno méně než 12 vzorků. Jediný vzorek nebo 11 vzorků nelze zpracovat.



Obrázek 20. Plnění centrifugy. Vložte sestavené adaptéry do rotoru do jamek centrifugy.



Obrázek 21. Plnění centrifugy a třepačky. Pozice centrifugy a třepačky jsou zobrazeny pro zpracování dvou (2 vzorky) až deseti vzorků (10 vzorků). Jeden nebo 11 vzorků nelze zpracovat.

Zkumavky na zpracování vzorku (PT)

Vyjměte z drážek pro mikrocentrifugační zkumavky všechny zkumavky (PT), které zbyly z předchozích běhů (viz obrázek 17, strana 42). Naplňte 3 zkumavky (PT) množstvím reagensií uvedeným v tabulce 5 podle počtu vzorků v daném běhu.

Příprava inkubační směsi z DNázy I: přeneste pipetou uvedený objem pufru k digesci DNA (RDD) do zkumavky (PT) a přidejte uvedený objem základního koncentrovaného roztoku DNázy I (RNFD). Směs jemně promíchejte náběrem a následným vypuštěním pipety (opakujte třikrát za užití pipetovací špičky o objemu 1000 µl).

Používejte 2ml zkumavky na zpracování vzorku (PT) dodávané se sadou PAXgene Blood RNA Kit. Jasně popište zkumavky (PT) názvy reagensií a umístěte je do odpovídajících pozic v drážkách pro mikrocentrifugační zkumavky, jak je uvedeno v tabulce 6 (strana 48).



DNáza I (RNFD) je velmi náchylná k fyzikální denaturaci. Míchejte pouze pomocí pipety a používejte pipetovací špičky se širokým průměrem, abyste omezili smykové tření. Nevortexujte.



Ujistěte se, že pipetujete správný objem uvedený v tabulce 5.

Tabulka 5. Požadovaný objem reagentů ve zkumavkách PT umístěných v drážkách pro mikrocentrifugační zkumavky

Počet vzorků	Objem reagentů pro uvedený počet vzorků (μl)		
	Proteináza K (PK)	Inkubační směs DNázy I	Eluční pufr (BR5)
2	126	187 (23 DNázy I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNázy I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNázy I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNázy I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNázy I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNázy I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNázy I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNázy I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNázy I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNázy I + 806 Buffer RDD)	1177

Tabulka 6. Drážky pro mikrocentrifugační zkumavky

	Pozice		
	A	B	C
Obsah	Proteináza K (PK)	Inkubační směs DNázy I	Eluční pufr (BR5)
Nádobka	Zkumavky na zpracování vzorku (PT)*	Zkumavky na zpracování vzorku (PT)*	Zkumavky na zpracování vzorku (PT)*

* Používejte 2ml zkumavky na zpracování vzorku (PT) dodávané se sadou PAXgene Blood RNA Kit.

Protokol: Manuální purifikace celkové RNA z plné lidské krve odebrané do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Důležité body, než začnete

- Ujistěte se, že je sada neporušená a nepoškozená a že nedošlo k úniku pufrů. Nepoužívejte sadu, která je poškozena.
- Při užívání pipet zkontrolujte, zda je správně nastaven objem a zda opatrně nasáváte a vypouštíte veškerou tekutinu.
- Abyste zabránili přenesení vzorku do špatné zkumavky či kolonky, měly by být všechny zkumavky a kolonky pečlivě označeny permanentní fixou. Označte víčko a tělo každé zkumavky (PT, MCT). U kolonek nadepište také tělo příslušné zkumavky (PT), ve které se eluuje. Po přidání tekutiny každou zkumavku a kolonku vždy uzavřete.
- Rozlití vzorku nebo pufru během přípravy může snížit výtěžek a čistotu RNA.
- Pokud není uvedeno jinak, měly by být všechny kroky protokolu (včetně centrifugace) provedeny při pokojové teplotě (15–25 °C).

Vzhledem k vysoké senzitivitě metod amplifikace nukleových kyselin by měla být k zamezení křížových kontaminací při manipulaci se vzorky dodržována následující preventivní opatření:

- Vzorek pipetujte do odstředivací kolonky (PRC, PSC) opatrně, abyste nepotřísili její horní okraj.
- Před každým přenosem kapalných materiálů vždy vyměňte pipetovací špičky. Používejte špičky s aerosolovou bariérou.
- Dbejte, abyste se pipetovací špičkou nedotkli membrány v kolonce (PRC, PSC).

- Mikrocentrifugační zkumavky (MCT) po vortexování nebo ohřívání krátce centrifugujte, abyste odstranily kapky z vnitřní strany víčka.
- Během celého procesu používejte rukavice. Pokud se dotknete rukavicemi vzorku, rukavice okamžitě vyměňte.
- Kolonky (PRC, PSC) před vložením do mikrocentrifugy vždy uzavřete. Centrifugujte podle údajů v protokolu.
- Otevírejte najednou vždy jen jednu kolonku (PRC, PSC) a zabraňte tvorbě aerosolu.
- Pro efektivní paralelní zpracování více vzorků se doporučuje připravit stojan se zkumavkami na zpracování vzorku (PT), do kterých se po centrifugaci mohou vložit kolonky (PRC, PSC). Použité zkumavky (PT) i s průtokem zlikvidujte a vložte nové zkumavky (PT) s kolonkami (PRC, PSC) přímo do mikrocentrifugy.

Co je třeba udělat, než začnete

- Krev je nutné odebrat do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) podle pokynů v příslušné příručce *PAXgene Blood RNA Tube Handbook*. Bude-li třeba, v příloze C (strana 70) naleznete doporučení pro manipulaci se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Po odběru krve zkumavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkubujte minimálně 2 hodiny při pokojové teplotě, aby byla zajištěna úplná lýza krevních buněk. Inkubace zkumavek PAXgene Blood RNA Tube (BRT) přes noc může vést k vyšším výtěžkům. Byla-li zkumavka PAXgene Blood RNA Tube (BRT) po odběru krve skladována při teplotě 2–8 °C, -20 °C nebo -70 °C, před začátkem protokolu ji nejdříve zahřejte na pokojovou teplotu a potom ji nechte při pokojové teplotě 2 hodiny inkubovat.
- Přečtěte si bezpečnostní informace na straně 11.
- Přečtěte si pokyny pro manipulaci s RNA (příloha A na straně 67).
- Ujistěte se, že jsou přístroje, např. pipety a třepací inkubátory, pravidelně kontrolovány a kalibrovány podle údajů výrobce.
- Třepací inkubátor je zapotřebí u kroků 5 a 20. Nastavte teplotu třepacího inkubátoru na 55 °C.

- Ve vazebném pufru (BR2) se může po delším skladování vytvořit sraženina. V takovém případě ji rozpustíte ohřátím na 37 °C.
- Promývací pufr 2 (BR4) je dodáván jako koncentrát. Před prvním použitím přidejte do lahvičky 4násobný objem ethanolu (96–100 %, stupeň čistoty p.a.), jak je popsáno na štítku, abyste vytvořili pracovní roztok.
- Před prvním použitím sady RNase-Free DNase Set připravte základní koncentrovaný roztok DNázy I. Pevnou DNázu I (RNFD; 1500 jednotek Kunitz)* rozpustíte v 550 µl pufru k resuspenzi DNázy (DRB), který je dodáván se sadou. Dbejte na to, aby při otevření nádoby žádná DNáza I (RNFD) neunikla. Rekonstituovaná DNáza I (RNFD) nesmí být vortexována. DNáza I je velmi náchylná k fyzikální denaturaci. Roztok DNázy I promíchejte pouze jemným převrácením zkumavky.
- Současné údaje ukazují, že rekonstituovanou DNázu I (RNFD) lze skladovat při teplotě 2–8 °C až 6 týdnů. Pro dlouhodobé skladování DNázy I (RNFD) se doporučuje vyjmout základní koncentrovaný roztok ze skleněné nádoby, rozdělit ho na menší alikvoty pro jedno použití (použijte k tomu 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky [MCT] dodávané se sadou, které postačí pro 5 alikvotů) a skladovat při teplotě -20 °C až 9 měsíců. Rozmrazené alikvoty se mohou skladovat při teplotě 2–8 °C až 6 týdnů. Rozmrazené alikvoty znovu nezmrazujte.
- Při rekonstituci a alikvotaci roztoku DNázy I (RNFD) neopomeňte zachovávat pokyny pro manipulaci s RNA (příloha A na straně 67).

* Jednotka Kunitz je běžně užívaná jednotka pro měření DNázy I; je definovaná jako množství DNázy I způsobující nárůst absorpance A při 260 nm o 0,001 za minutu na mililitr při 25 °C a pH 5,0, přičemž je jako substrát použita vysoce polymerní DNA (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 a 363).

Postup

1. Centrifugujte zkumavku PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 10 minut ve výkyvném rotoru při 3000–5000 x g.



Ujistěte se, že byl krevní vzorek inkubován ve zkumavce PAXgene Blood RNA Tube (BRT) při pokojové teplotě (15–25 °C) minimálně 2 hodiny, aby se dosáhlo úplné lýzy krevních buněk.



Rotor musí být vybaven adaptéry pro zkumavky s kulatým dnem. Při používání jiných typů adaptérů se mohou zkumavky během centrifugace poškodit.

2. Následně odstraňte supernatant dekantací nebo pipetováním. K peletu přidejte 4 ml vody bez obsahu RNázy (RNFW) a uzavřete zkumavku novým bezpečnostním uzávěrem BD Hemogard (dodávaný se sadou).

Během dekantace supernatantu dbejte na to, aby se pelet nerozvířil, a osušte okraj zkumavky čistým papírovým ubrouskem.

3. Pelet vortexujte, dokud není viditelně resuspendován, a pak jej centrifugujte 10 minut ve výkyvném rotoru při 3000–5000 x g. Odeberte a zlikvidujte celý supernatant.

Drobné buněčné zbytky obsažené v supernatantu po vortexování, ale před centrifugací nenarušují další průběh protokolu.



Neúplné odstranění supernatantu inhibuje lýzu a ředí lyzát, a tím narušuje podmínky pro navázání RNA na membránu PAXgene.

4. Přidejte 350 µl pufru k resuspenzi (BR1) a směs vortexujte, dokud se pelet viditelně neresuspenduje.

5. Přeneste vzorek pipetou do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky (MCT). Dále přidejte 300 µl vazebného pufru (BR2) a 40 µl proteinázy K (PK). Promíchejte vortexem po dobu 5 sekund a inkubujte 10 minut při 55 °C v třepacím inkubátoru při rychlosti 400–1400 ot/min. Po inkubaci zvýšte teplotu třepacího inkubátoru na 65 °C (pro krok 20).



Vazebný pufr (BR2) a proteinázu K (PK) nemíchejte před přidáním do vzorku dohromady.

6. Lyzát pipetujte přímo do odstředovací kolonky PAXgene Shredder (PSC, fialová), která je vložena do 2ml zkumavky na zpracování vzorku (PT), a centrifugujte 3 minuty při maximálních otáčkách (max. 20 000 x g).



Lyzát opatrně přeneste pipetou do odstředovací kolonky (PSC) a opticky se přesvědčte, že jste do kolonky přenesli skutečně celý obsah lyzátu.

Abyste předešli poškození kolonek (PSC) a zkumavek (PT), nepřekračujte rychlost 20 000 x g.



Některé vzorky mohou projít kolonkou PAXgene Shredder (PSC) bez centrifugace. Tento jev je způsoben nízkou viskozitou některých vzorků a neměl by být považován za chybu produktu.

7. Opatrně přeneste celý supernatant průtoky do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky (MCT), aniž zvíříte pelet ve zkumavce na zpracování vzorku (PT).
8. Přidejte 350 µl ethanolu (96–100 %, stupeň čistoty p. a.). Promíchejte vortexem a krátce centrifugujte (1–2 sekundy při 500–1000 x g), abyste odstranili kapky z vnitřní strany víčka zkumavky.



Délka centrifugace nesmí překročit 1–2 sekundy, protože by jinak mohlo dojít k sedimentaci nukleových kyselin a tím k redukci celkového výtěžku RNA.

9. 700 µl vzorku přeneste pipetou do odstředovací kolonky PAXgene RNA (PRC, červená), která je vložena do 2ml zkumavky na zpracování vzorku (PT), a centrifugujte 1 minutu při otáčkách 8000–20 000 x g. Umístěte odstředovací kolonku (PRC) do nové 2ml zkumavky na zpracování vzorku (PT) a použitou zkumavku na zpracování vzorku (PT) s obsaženým průtokem zlikvidujte.
10. Zbývající vzorek přeneste pipetou do odstředovací kolonky PAXgene RNA (PRC) a centrifugujte 1 minutu při otáčkách 8000–20 000 x g. Umístěte odstředovací kolonku (PRC) do nové 2ml zkumavky (PT) a použitou zkumavku na zpracování vzorku (PT) s obsaženým průtokem zlikvidujte.



Vzorek přeneste pipetou do odstředovací kolonky (PRC) a opticky se přesvědčte, že jste do kolonky přenesli skutečně celý obsah vzorku.

11. Přeneste pipetou 350 µl promývacího pufru 1 (BR3) do odstředovací kolonky PAXgene RNA (PRC). Centrifugujte 1 minutu při otáčkách 8000–20 000 x g. Umístěte odstředovací kolonku (PRC) do nové 2ml zkumavky (PT) a použitou zkumavku na zpracování vzorku (PT) s obsaženým průtokem zlikvidujte.

12. Přidejte 10 µl základního koncentrovaného roztoku DNázy I (RNFD) k 70 µl pufru k digesci DNA (RDD) v 1,5ml mikrocentrifugační zkumavce (MCT). Promíchejte jemným poklepáváním do zkumavky a krátce centrifugujte, abyste sklepalí zbylou tekutinu z vnitřních stěn zkumavky.

Pro zpracování například 10 vzorků přidejte 100 µl základního koncentrovaného roztoku DNázy I (RNFD) k 700 µl pufru k digesci DNA (RDD). Používejte 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky (MCT) dodávané se sadou.



DNáza I je velmi náchylná k fyzikální denaturaci. Roztok promíchejte lehkým poklepáváním do zkumavky. Nevortexujte.

13. Inkubační směs DNázy I (RNFD, 80 µl) pipetujte přímo na membránu v kolonce PAXgene RNA (PRC) a ponechte na pracovní ploše 15 minut (při teplotě 20–30 °C).



Ujistěte se, že byla inkubační směs DNázy I (RNFD) umístěna přímo na membránu. Digesce pomocí DNázy by mohla proběhnout neúplně, pokud by část směsi zůstala na vnitřní stěně nebo na O-kroužku kolonky (PRC).

14. Přeneste pipetou 350 µl promývacího pufru 1 (BR3) do odstředovací kolonky PAXgene RNA (PRC) a centrifugujte 1 minutu při otáčkách 8000–20 000 x g. Umístěte odstředovací kolonku (PRC) do nové 2ml zkumavky (PT) a použitou zkumavku na zpracování vzorku (PT) s obsaženým průtokem zlikvidujte.

15. Přeneste pipetou 500 µl promývacího pufru 2 (BR4) do odstředovací kolonky PAXgene RNA (PRC) a centrifugujte 1 minutu při otáčkách 8000–20 000 x g. Umístěte odstředovací kolonku (PRC) do nové 2ml zkumavky (PT) a použitou zkumavku na zpracování vzorku (PT) s obsaženým průtokem zlikvidujte.



Promývací pufr 2 (BR4) je dodáván jako koncentrát. Ujistěte se, že byl před použitím k promývacímu pufru 2 (BR4) přidán ethanol (viz „Co je třeba udělat, než začnete“ na straně 50).

16. Přidejte dalších 500 µl promývacího pufru 2 (BR4) do odstředivací kolonky PAXgene RNA (PRC). Centrifugujte 3 minuty při 8000–20 000 x g.
17. Kolonku PAXgene RNA (PRC) vložte do nové 2ml zkumavky na zpracování vzorku (PT) a použitou zkumavku na zpracování vzorku (PT) s obsaženým průtokem zlikvidujte. Centrifugujte 1 minutu při 8000–20 000 x g.
18. Použitou zkumavku na zpracování vzorku (PT) s obsaženým průtokem zlikvidujte. Odstředivací kolonku PAXgene RNA (PRC) vložte do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky (MCT) a 40 µl elučního pufru (BR5) přeneste pipetou přímo na membránu v kolonce PAXgene RNA (PRC). Centrifugujte 1 minutu při otáčkách 8000–20 000 x g, abyste dosáhli eluce RNA.

Abyste docílili maximální efektivity eluce, je důležité pokrýt celou plochu membrány elučním pufrem (BR5).
19. Zopakujte eluční krok (krok 18) opět se 40 µl elučního pufru (BR5) a stejnou mikrocentrifugační zkumavkou (MCT).
20. Eluát inkubujte 5 minut při 65 °C v třepacím inkubátoru (od kroku 5), ale bez třepání. Vzorky poté ihned zchlaďte na ledu.

Touto inkubací při 65 °C se RNA denaturuje pro následující aplikace. Nepřekročte přitom dobu ani teplotu inkubace.
21. Pokud vzorky RNA nebudou ihned použity, skladujte je při -20 °C nebo -70 °C.

 Jelikož RNA zůstává denaturovaná i po opakovaném zmrazení a rozmrazení, není nutné inkubaci při 65 °C opakovat. Pokud chcete vzorky RNA použít pro diagnostické rozbor, dbejte pokynů výrobce.

 Pro co nej přesnější kvantifikaci RNA měřením absorbance při 260 nm doporučujeme zředit vzorek 10 mM Tris-HCl (pH 7,5). * Naředění vzorku vodou bez obsahu RNázy by mohlo vést k nepřesným nízkým hodnotám.

* Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (safety data sheets, SDS), které obdržíte od dodavatele výrobku.

Pro vynulování spektrálního fotometru použijte slepý vzorek (blank), jehož poměr elučního pufru (BR5) a ředícího pufru Tris-HCl odpovídá měřeným vzorkům. Eluční pufr (BR5) má při 220 nm vysokou absorbanci, což může vést k vysokým hodnotám absorbance pozadí, pokud nebyl nulový bod spektrálního fotometru nastaven správně.

Poznámka: Pro kvantifikaci v pufru Tris-HCl, použijte vztah

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Viz Příloha B, strana 68.

Protokol: Automatizovaná purifikace celkové RNA z plné lidské krve odebrané do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Důležité body, než začnete

- Ujistěte se, že je sada neporušená a nepoškozená a že nedošlo k úniku pufrů. Nepoužívejte sadu, která je poškozena.
- Při užívání pipet zkontrolujte, zda je správně nastaven objem a zda opatrně nasáváte a vypouštíte veškerou tekutinu.
- Abyste zabránili přenesení vzorku do špatné zkumavky či umělohmotných prvků, ujistěte se, že jsou všechny zkumavky na zpracování vzorku (PT), mikrocentrifugační zkumavky (MCT) a adaptéry do rotoru správně označeny permanentní fixou. Označte víčka a tělo všech mikrocentrifugačních zkumavek (MCT), tělo všech zkumavek na zpracování vzorku (PT) a vnější stranu všech adaptérů do rotoru.
- Rozlití vzorku nebo pufru během přípravy může snížit výtěžek a čistotu RNA.
- Pokud není uvedeno jinak, měly by být všechny kroky protokolu (včetně centrifugace) provedeny při pokojové teplotě (15–25 °C).

Vzhledem k vysoké senzitivitě metod amplifikace nukleových kyselin by měla být k zamezení křížových kontaminací při manipulaci se vzorky dodržována následující preventivní opatření:

- Vzorek opatrně napipetujte na dno zkumavky na zpracování vzorku (PT) tak, abyste nepotřísnili její horní okraj.
- Před každým přenosem kapalných materiálů vždy vyměňte pipetovací špičky. Používejte špičky s aerosolovou bariérou.

- Dbejte, abyste se pipetovací špičkou nedotkli membrány v kolonce (PRC, PSC).
- Mikrocentrifugační zkumavky (MCT) po vortexování nebo ohřívání krátce centrifugujte, abyste odstranily kapky z vnitřní strany víčka.
- Během celého procesu používejte rukavice. Pokud se dotknete rukavicemi vzorku, rukavice okamžitě vyměňte.

Co je třeba udělat, než začnete

- Krev je nutné odebrat do zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) podle pokynů v příslušné příručce *PAXgene Blood RNA Tube Handbook*. Bude-li třeba, v příloze C (strana 70) naleznete doporučení pro manipulaci se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Po odběru krve zkumavky PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkubujte minimálně 2 hodiny při pokojové teplotě, aby byla zajištěna úplná lýza krevních buněk. Inkubace zkumavek PAXgene Blood RNA Tube (BRT) přes noc může vést k vyšším výtěžkům. Byla-li zkumavka PAXgene Blood RNA Tube (BRT) po odběru krve skladována při teplotě 2–8 °C, -20 °C nebo -70 °C, před začátkem protokolu ji nejdříve zahřejte na pokojovou teplotu a potom ji nechte při pokojové teplotě 2 hodiny inkubovat.
- Přečtěte si bezpečnostní informace na straně 11.
- Přečtěte si „Důležité poznámky“ na straně 38.
- Přečtěte si pokyny pro manipulaci s RNA (příloha A na straně 67).
- Přečtěte si uživatelskou příručku k přístroji *QIAcube User Manual* a veškeré další informace, které jsou s přístrojem QIAcube dodávány. Zvláštní pozornost věnujte především bezpečnostním informacím.
- Ujistěte se, že jsou přístroje, např. pipety a přístroj QIAcube, pravidelně kontrolovány a kalibrovány podle údajů výrobce.
- Ve vazebném pufru (BR2) se může po delším skladování vytvořit sraženina. V takovém případě ji rozpustíte ohřátím na 37 °C.

- Promývací pufr 2 (BR4) je dodáván jako koncentrát. Před prvním použitím přidejte do lahvičky 4násobný objem ethanolu (96–100 %, stupeň čistoty p.a.), jak je popsáno na štítku, abyste vytvořili pracovní roztok.
- Před prvním použitím sady RNase-Free DNase Set připravte základní koncentrovaný roztok DNázy I. Pevnou DNázu I (RNFD; 1500 jednotek Kunitz)* rozpustíte v 550 µl pufru k resuspenzi DNázy (DRB), který je dodáván se sadou. Dbejte na to, aby při otevření nádoby žádná DNáza I (RNFD) neunikla. Rekonstituovaná DNáza I (RNFD) nesmí být vortexována. DNáza I je velmi náchylná k fyzikální denaturaci. Roztok DNázy I promíchejte pouze jemným převrácením zkumavky.
- Současné údaje ukazují, že rekonstituovanou DNázu I (RNFD) lze skladovat při teplotě 2–8 °C až 6 týdnů. Pro dlouhodobé skladování DNázy I (RNFD) se doporučuje vyjmout základní koncentrovaný roztok ze skleněné nádoby, rozdělit ho na menší alikvoty pro jedno použití (použijte k tomu 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky [MCT] dodávané se sadou, které postačí pro 5 alikvotů) a skladovat při teplotě -20 °C až 9 měsíců. Rozmrazené alikvoty se mohou skladovat při teplotě 2–8 °C až 6 týdnů. Rozmrazené alikvoty znovu nezmrazujte.
- Při rekonstituci a alikvotaci roztoku DNázy I (RNFD) neopomeňte zachovávat pokyny pro manipulaci s RNA (příloha A na straně 67).
- Vložte správný adaptér třepačky (dodávaný s přístrojem QIAcube; používejte adaptéry pro 2ml zkumavky s bezpečnostním uzávěrem, označené „2“) a umístěte stojan třepačky na horní část adaptéru.
- Zkontrolujte zásuvku na odpad a v případě potřeby ji vyprázdněte.
- Nainstalujte protokoly, pokud již nejsou nainstalovány z předešlých běhů. Nainstalujte oba protokoly „PAXgene Blood RNA Part A“ a „PAXgene Blood RNA Part B“. Viz „Instalace protokolů na přístroji QIAcube“, strana 38.

* Jednotka Kunitz je běžně užívaná jednotka pro měření DNázy I; je definovaná jako množství DNázy I způsobující nárůst absorbance A při 260 nm o 0,001 za minutu na mililitr při 25 °C a pH 5,0, přičemž je jako substrát použita vysoce polymerní DNA (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 a 363).

Postup

1. Zavřete dvířka přístroje QIAcube a pomocí síťového vypínače přístroj QIAcube zapněte (viz obrázek 15, strana 39).

Ozve se pípnutí a zobrazí se startovací obrazovka. Přístroj automaticky provede zahajovací testy.

2. Otevřete dvířka přístroje QIAcube a vložte do něj potřebné reagenty a umělohmotné vybavení. Viz „Naplnění přístroje QIAcube“, strana 40.

Abyste ušetřili čas, můžete přístroj QIAcube naplnit během jednoho nebo obou následujících 10minutových centrifugačních kroků (krok 3 a 5).

3. Centrifugujte zkumavku PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 10 minut ve výkyvném rotoru při 3000–5000 x g.



Ujistěte se, že byl krevní vzorek inkubován ve zkumavce PAXgene Blood RNA Tube (BRT) při pokojové teplotě (15–25 °C) minimálně 2 hodiny, aby se dosáhlo úplné lýzy krevních buněk.



Rotor musí být vybaven adaptéry pro zkumavky s kulatým dnem. Při používání jiných typů adaptérů se mohou zkumavky během centrifugace poškodit.

4. Následně odstraňte supernatant dekantací nebo pipetováním. K peletu přidejte 4 ml vody bez obsahu RNázy (RNFW) a uzavřete zkumavku novým bezpečnostním uzávěrem BD Hemogard (dodávaný se sadou).

Během dekantace supernatantu dbejte na to, aby se pelet nerozvířil, a osušte okraj zkumavky čistým papírovým ubrouskem.

5. Pelet vortexujte, dokud není viditelně resuspendován, a pak jej centrifugujte 10 minut ve výkyvném rotoru při 3000–5000 x g. Odeberte a zlikvidujte celý supernatant.

Drobné buněčné zbytky obsažené v supernatantu po vortexování, ale před centrifugací nenarušují další průběh protokolu.



Neúplné odstranění supernatantu inhibuje lýzu a ředí lyzát, a tím narušuje podmínky pro navázání RNA na membránu PAXgene.

6. Přidejte 350 µl pufru k resuspenzi (BR1) a směs vortexujte, dokud se pelet viditelně neresuspenduje.

7. Pipetujte vzorek do 2ml zkumavky na zpracování vzorku (PT).



Používejte 2ml zkumavky na zpracování vzorku (PT) dodávané se sadou PAXgene Blood RNA Kit.

8. Otevřené zkumavky (PT) obsahující vzorek vložte do třepačky přístroje QIAcube (viz obrázek 17, strana 42). Pozice vzorků jsou pro snadnější vkládání do třepačky očíslované. Zasuňte zátky stojanu (dodávané s přístrojem QIAcube) do drážek na okraji stojanu třepačky vedle každé zkumavky na zpracování vzorku (PT). To umožní detekci vzorků během kontroly naplnění.



Ujistěte se, že byl vložen správný adaptér třepačky (Shaker Adapter, 2ml zkumavky s bezpečnostním uzávěrem, označené „2“, dodávané s přístrojem QIAcube).



Pokud zpracováváte méně než 12 vzorků, ujistěte se, že byl stojan třepačky naplněn, jak ukazuje obrázek 21, strana 46. Jeden nebo 11 vzorků nelze zpracovat.

9. Zavřete dvířka přístroje QIAcube (viz obrázek 15, strana 39).

10. Zvolte a spusťte protokol „PAXgene Blood RNA Part A“.

Postupujte podle pokynů uvedených na dotykové obrazovce přístroje QIAcube.



Ujistěte se, že jsou na přístroji QIAcube nainstalovány obě části programu (část A a B; viz „Instalace protokolů na přístroji QIAcube“, strana 38).



Přístroj QIAcube provede kontrolu naplnění u vzorků, špiček, adaptérů do rotoru a reagenčních lahvíček.

11. Po ukončení protokolu „PAXgene Blood RNA Part A“ otevřete dvířka přístroje QIAcube (viz obrázek 15, strana 39). Vyjměte a zlikvidujte odstředovací kolonky PAXgene RNA (PRC) z adaptérů do rotoru a prázdné zkumavky na zpracování vzorku (PT) z třepačky.



Během běhu přístroj převede kolonky z pozice 1 adaptéru do rotoru (pozice víčka L1) do pozice 3 adaptéru do rotoru (pozice víčka L2). Viz obrázek 19, strana 44.

12. Uzavřete víčka všech 1,5ml mikrocentrifugačních zkumavek (MCT) obsahujících purifikovanou RNA v adaptérech do rotoru (pozice 3, pozice víčka L3, viz obrázek 19, strana 44). Převed'te 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky (MCT) do adaptéru třepačky přístroje QIAcube (viz obrázek 17, strana 42).
13. Zavřete dvířka přístroje QIAcube (viz obrázek 15, strana 39).
14. Zvolte a spusťte protokol „PAXgene Blood RNA Part B“.

Postupujte podle pokynů uvedených na dotykové obrazovce přístroje QIAcube.



Tento program inkubuje vzorky při 65 °C a denaturuje RNA pro následující aplikace. Tento krok nevynechávejte ani v případě, že následující aplikace také obsahují tepelnou denaturaci. Dostatečná denaturace RNA je nezbytná pro maximální efektivitu následných aplikací.

15. Po ukončení programu „PAXgene Blood RNA Part B“ otevřete dvířka přístroje QIAcube (viz obrázek 15, strana 39). Mikrocentrifugační zkumavky (MCT) obsahující purifikovanou RNA ihned uložte na led.



VAROVÁNÍ: Horký povrch. Třepačka může dosáhnout teploty až 70 °C. Nedotýkejte se jej, dokud je horký.



Nenechávejte purifikovanou RNA v přístroji QIAcube. Jelikož nejsou vzorky chlazeny, může purifikovaná RNA degradovat. Nedoporučují se tedy běhy přes noc a bez dozoru.

16. Pokud vzorky RNA nebudou ihned použity, skladujte je při -20 °C nebo -70 °C.

Jelikož RNA zůstává denaturovaná i po opakovaném zmrazení a rozmrazení, není nutné tepelnou inkubaci (protokol „PAXgene Blood RNA Part B“) opakovat. Pokud chcete vzorky RNA použít pro diagnostické rozbor, dbejte pokynů výrobce.

Pro co nejpřesnější kvantifikaci RNA měřením absorpance při 260 nm doporučujeme zředit vzorek v 10 mM Tris-HCl (pH 7,5). * Naředění vzorku vodou bez obsahu RNázy by mohlo vést k nepřesným nízkým hodnotám.

Pro vynulování spektrálního fotometru použijte slepý vzorek (blank), jehož poměr elučního pufru (BR5) a ředícího pufru Tris-HCl odpovídá měřeným vzorkům. Eluční pufr (BR5) má při 220 nm vysokou absorpaci, což může vést k vysokým hodnotám absorpance pozadí, pokud nebyl nulový bod spektrálního fotometru nastaven správně.



Pro kvantifikaci v pufru Tris-HCl, použijte vztah

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Viz Příloha B, strana 68.

17. Odeberte stojan na reagenční lahvičky z pracovní desky přístroje QIAcube (viz obrázek 17, strana 42) a všechny lahvičky uzavřete správně označenými víčky. Pufr v lahvičkách mohou být skladovány při pokojové teplotě (15–25 °C) až po dobu 3 měsíců. Vyjměte a zlikvidujte zbývající reagenty ve zkumavkách na zpracování vzorku (PT) umístěné v drážkách pro mikrocetrifugační zkumavky přístroje QIAcube (viz obrázek 17, strana 42). Vyjměte adaptéry do rotoru z centrifugy a zlikvidujte je (viz obrázek 17, strana 42). Vyprázdněte odpadní zásuvku přístroje QIAcube (viz obrázek 15, strana 39). Zavřete dvířka přístroje QIAcube a pomocí síťového vypínače přístroj QIAcube vypněte (viz obrázek 15, strana 39).

* Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (safety data sheets, SDS), které obdržíte od dodavatele výrobku.

Řešení problémů

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Další informace můžete najít také mezi častými dotazy (FAQ) na stránkách našeho centra technické podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vědci z technické podpory společnosti QIAGEN vždy rádi zodpoví vaše otázky ohledně údajů a protokolů v této příručce i obecně k technologiím pro přípravu vzorků a jejich rozborům (možnosti navázání kontaktu viz poslední strana nebo navštivte www.qiagen.com).

Komentáře a návrhy

Degradace RNA

Kontaminace RNázou



Dbejte na to, aby nebyly do reagentů během přípravy RNA nebo následujících analýz vneseny žádné stopy RNázy (viz příloha A, strana 67).

Nízký výtěžek RNA

a) Odebráno méně než 2,5 ml krve do zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



Ujistěte se, že bylo při odběru odebráno do zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 2,5 ml krve (viz příručka *PAXgene Blood RNA Tube Handbook*).




b) Koncentrace RNA byla měřena ve vodě




Pro co nejpresnější kvantifikaci musí být RNA naředěna v 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* (viz příloha B, strana 68).

* Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (safety data sheets, SDS), které obdržíte od dodavatele výrobku.

Komentáře a návrhy

- | | |
|---|--|
| c) Do kolonky PAXgene RNA (PRC) byly během kroků 9 a 10 manuálního protokolu přeneseny buněčné zbytky |  Když pipetujete supernatant v kroku 7 manuálního protokolu, snažte se nepřenášet velké částice (přenos malých úlomků přípravu nenarušuje). |
| d) Supernatant nebyl v kroku 3 úplně odstraněn |  Ujistěte se, že byl odstraněn veškerý supernatant. Pokud jej dekantujete, odstraňte kapky ulpělé na okraji zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pomocí papírového ubrousku. Vykonejte náležitá bezpečnostní opatření, aby se zabránilo křížovým kontaminacím. |
| e) Po odběru do zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) byla krev inkubována méně než 2 hodiny |  Po odběru inkubujte krev ve zkumavce PAXgene Blood RNA Tube (BRT) nejméně 2 hodiny. |

Nízká hodnota A_{260}/A_{280}

- | | |
|---|--|
| a) Při měření A_{260}/A_{280} byla RNA naředěna vodou |  K ředění RNA před měřením čistoty používejte 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* (viz příloha B, strana 68). |
|---|--|

* 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.

Komentáře a návrhy

- b) Spektrofotometr nebyl správně vynulován



Pro vynulování spektrálního fotometru použijte slepý vzorek (blank), jehož poměr elučního pufru (BR5) a ředícího pufru 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, odpovídá měřeným vzorkům. Eluční pufr (BR5) má při 220 nm vysokou absorbanci, což může vést k vysokým hodnotám absorpance pozadí, pokud nebyl nulový bod spektrálního fotometru nastaven správně.

Porucha přístroje

Přístroj QIAcube nefunguje správně

Přečtěte si uživatelskou příručku k přístroji QIAcube (*QIAcube User Manual*). Věnujte pozornost části o řešení problémů. Ujistěte se, že je přístroj QIAcube správně udržován, jak je popsáno v *uživatelské příručce QIAcube*.

Příloha A: Obecné pokyny pro manipulaci s RNA

Manipulace s RNA



Ribonukleázy (RNázy) jsou velmi stabilní a aktivní enzymy, které obecně nevyžadují ke své funkci přítomnost kofaktorů. RNázy je těžké inaktivovat a k degradaci RNA stačí již velmi malé množství, proto byste neměli používat žádné laboratorní pomůcky ze skla nebo umělé hmoty, které nebyly předtím zbaveny kontaminací RNázou. Během purifikace nukleových kyselin a po ní dbejte důsledně na to, aby se nedopatřením do vzorků RNA nedostala žádná kontaminace RNázou. Abyste vytvořili a udrželi prostředí bez obsahu RNázy, musíte při přípravě a užívání roztoků a nádobek k jednomu či více použití dodržovat příslušná bezpečnostní opatření.

Obecné pokyny k manipulaci



Práce s RNA by měla vždy probíhat podle zásad řádné mikrobiologické a aseptické pracovní techniky. Ruce a prachové částice přenášejí bakterie a plísňe a jsou tedy nejčastější zdroj kontaminace RNázou. Při manipulaci s reagensy a vzorky RNA vždy noste latexové nebo vinylové rukavice, abyste zabránili kontaminaci RNázou z povrchu kůže nebo ze zaprášeného laboratorního vybavení. Jednorázové rukavice často vyměňujte a uzavírejte všechny zkumavky ihned po použití. Pokud chcete purifikovanou RNA pro následující aplikace rozpipetovat, ponechte ji na ledu.

Protokoly k odstranění kontaminací RNázou ze skleněných materiálů a roztoků naleznete ve všeobecných metodických publikacích molekulární biologie, jako např. Sambrook, J. a Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3. vydání, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Příloha B: Určení koncentrace, výtěžku a čistoty celkové RNA

Kvantifikace RNA

Koncentrace RNA by měla být určena měřením absorbance při 260 nm (A_{260}) ve spektrálním fotometru. Aby bylo dosaženo co nejpřesnějšího měření, měl by záznam ležet v lineární oblasti spektrálního fotometru. Absorbance 1 jednotky při 260 nm odpovídá koncentraci 44 µg RNA na ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$). Tento vztah platí jen pro měření v pufru 10 mM Tris-HCl, * pH 7,5. Proto by měl být vzorek RNA v případě potřeby naředěn 10 mM Tris-HCl. Jak je popsáno níže (viz odstavec „Čistota RNA“ na straně 69), poměr hodnot absorbancí při 260 nm a 280 nm je přibližným měřítkem čistoty RNA. Ujistěte se, že jsou kyvety použité pro měření vzorků RNA prosté RNázy. Pro vynulování spektrálního fotometru použijte slepý vzorek (blank), jehož poměr elučního pufru (BR5) a ředícího pufru Tris-HCl odpovídá měřeným vzorkům. Eluční pufr (BR5) má při 220 nm vysokou absorbanci, což může vést k vysokým hodnotám absorbance pozadí, pokud nebyl nulový bod spektrálního fotometru nastaven správně. Níže je uveden příklad výpočtu kvantifikace RNA.

Objem vzorku RNA = 80 µl

Ředění (1/15) = 10 µl vzorku RNA + 140 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5

Měření absorbance naředěného vzorku v kyvetách prostých RNázy.

A_{260} = 0,3

Koncentrace vzorku = $44 \times A_{260} \times \text{faktor ředění}$

= $44 \times 0,3 \times 15$

= 198 µg/ml

Celkový výtěžek = koncentrace x objem vzorku v mililitrech

= $198 \text{ µg/ml} \times 0,08 \text{ ml}$

= 15,8 µg RNA

* Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (safety data sheets, SDS), které obdržíte od dodavatele výrobku.

Čistota RNA

Poměr hodnot absorbancí při 260 nm a 280 nm (A_{260}/A_{280}) je přibližným měřítkem čistoty RNA s ohledem na kontaminanty, které se absorbují v UV, jako např. proteiny. Poměr A_{260}/A_{280} je značně závislý na hodnotě pH. Nižší hodnoty pH mají za následek nižší poměr A_{260}/A_{280} a redukovanou senzitivitu vůči kontaminacím proteiny.* Pro získání přesných dat doporučujeme určit absorbanci v 10 mM Tris-HCl (pH 7,5). Čistá RNA vykazuje v 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) poměr A_{260}/A_{280} mezi 1,8 a 2,2. Pro vynulování spektrálního fotometru použijte slepý vzorek (blank), jehož poměr elučního pufru (BR5) a ředícího pufru Tris-HCl odpovídá měřeným vzorkům. Eluční pufr (BR5) má při 220 nm vysokou absorbanci, což může vést k vysokým hodnotám absorpance pozadí, pokud nebyl nulový bod spektrálního fotometru nastaven správně.

* 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.

Příloha C: Manipulace se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Následující doporučení od společnosti BD pro vás mohou být užitečná při manipulaci se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Další informace k použití zkumavek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) naleznete v příručce *PAXgene Blood RNA Tube Handbook*.

Instrukce k odstranění bezpečnostního uzávěru BD Hemogard

1. Uchopte zkumavku PAXgene Blood RNA Tube (BRT) jednou rukou, palec přitom umístěte přímo pod bezpečnostní uzávěr BD Hemogard. (Větší stabilitu získáte, opřete-li ruku o pevnou plochu.) Druhou rukou otáčejte uzávěrem BD Hemogard a zároveň jej tlačte palcem nahoru, JEN DOKUD SE ZÁTKA ZKUMAVKY NEUVOLNÍ.
2. Palec před sejmutím uzávěru oddalte. Uzávěr od zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) NEODSUNUJTE palcem. Upozornění: Krev obsažená ve zkumavkách PAXgene Blood RNA Tube (BRT) představuje potenciální nebezpečí infekce. Abyste se vyvarovali zranění během sejmutí uzávěru, je důležité od zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) oddálit palec, kterým tlačíte uzávěr nahoru, ihned jak se uzávěr BD Hemogard uvolní.
3. Zdvihněte uzávěr ze zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Ve velmi nepravděpodobném případě, kdyby se umělohmotný kryt oddělil od gumové zátky, UZÁVĚR ZNOVU NESESTAVUJTE. Ze zkumavky PAXgene Blood RNA Tube (BRT) opatrně sejměte gumovou zátku.

Instrukce k opětovnému uzavření sekundárním bezpečnostním uzávěrem BD Hemogard

1. Na zkumavku PAXgene Blood RNA Tube (BRT) znovu nasadte uzávěr.
2. Gumovou zátkou otáčejte za současného tlaku na zkumavku. Zátka musí být úplně zasunuta, aby se uzávěr při manipulaci se zkumavkou PAXgene Blood RNA Tube (BRT) neuvolnil.

Informace pro objednání

Výrobek	Obsah	Kat. č.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 odstředovacích kolonek PAXgene, 50 odstředovacích kolonek PAXgene Shredder, zkumavky na zpracování vzorku PT, DNáza I bez obsahu RNázy, reagentie a pufrý bez obsahu RNázy. K použití ve spojení se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 zkumavek na odběr krve	762165
Související produkty, které lze objednat u společnosti QIAGEN		
Starter Pack, QIAcube	Balíček zahrnuje: stojany na reagenční lahvičky (3); proužky pro popis stojanu (8); 200µl špičky s filtrem (1024); 1000µl špičky s filtrem (1024); 1000µl špičky s filtrem a širokým otvorem (1024); 30ml reagenční lahvičky (18); adaptéry do rotoru (240); držák na adaptéry do rotoru	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Sterilní jednorázové špičky s filtrem, ve stojáncích	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Reagenční láhve (30 ml) s víčky; balíček po 6 kusech; pro použití se stojanem na reagenční láhve QIAcube	990393

Rotor Adapters (10 x 24)	Souprava pro přípravu 240 vzorků: 240 jednorázových adaptérů do rotoru; pro použití s přístrojem QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Stojan pro 6 x 30ml reagenční lahvička na pracovní ploše přístroje QIAcube	990390
Rotor Adapter Holder	Držák na 12 jednorázových adaptérů do rotoru; pro použití s přístrojem QIAcube	990392
Související produkty, které lze objednat u společnosti BD*		
Blood Collection Set	Sada pro odběr krve BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 21G, 0,75palcová (0,8 x 19 mm) kanyla, 12palcová (305 mm) hadička s adaptérem luer; 50 kusů v krabičce, 200 kusů v kartonu	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Jednorázový držák pouze na průměry 13 a 16 mm; 1000/karton	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm, 4,0ml odběrové zkumavky s červeným bezpečnostním BD Hemogard a papírovým štítkem; 100/krabice, 1000/karton	368975

* Zde uvedené produkty jsou typickými doplňky pro odběr krve, které mohou být použity se zkumavkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Další informace (včetně informací o objednání) k těmto doplňkům naleznete na stránkách www.preanalytix.com.

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příslušné příručce pro sadu PreAnalytiX či QIAGEN nebo v uživatelské příručce. Příručky k sadám PreAnalytiX a QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na stránkách www.preanalytix.com a www.qiagen.com nebo je lze vyžádat od technické podpory společnosti PreAnalytiX.

Historie revizí příručky

Dokument a revize	Změny	Datum
HB-0101-004, R2	Změny v celém dokumentu, aby splňoval požadavky nařízení GHS	Červen 2015
HB-0101-005, R3	Nová šablona; revize v údajích o automatizovaném protokolu a výkonnosti; aktualizace informací o bezpečnosti, aby splňovaly požadavky nařízení GHS; změny údajů o přístrojích a prohlášení o omezení pro použití produktu.	Únor 2019
HB-0101-006, R3	Oprava názvu sady v tabulce s obsahem sady, str. 5.	Leden 2020

PreAnalytiX Worldwide

Produkty PreAnalytiX distribuují společnosti QIAGEN a BD

Australia • Orders 03 9840 9800 • Fax 03 9840 9888 • Technical 1 800 243 066
Austria • Orders 0800 28 10 10 • Fax 0800 28 10 19 • Technical 0800 28 10 11
Belgium • Orders 0800 79612 • Fax 0800 79611 • Technical 0800 79556
Brazil • Orders 0800 557779 • Fax 55 11 5079 4001 • Technical 0800 557779
Canada • Orders 800 572 9613 • Fax 800 713 5951 • Technical 800 DNA-PREP (800 362 7737)
China • Orders 0086 21 3865 3865 • Fax 0086 21 3865 3965 • Technical 800 988 0325, 800 988 0327
Denmark • Orders 80 885945 • Fax 80 885944 • Technical 80 885942
Finland • Orders 0800 914416 • Fax 0800 914415 • Technical 0800 914413
France • Orders 01 60 920 926 • Fax 01 60 920 925 • Technical 01 60 920 930 • Offers 01 60 920 928
Germany • Orders 02103 29 12000 • Fax 02103 29 22000 • Technical 02103 29 12400
Hong Kong • Orders 800 933 965 • Fax 800 930 439 • Technical 800 930 425
Ireland • Orders 1800 555 049 • Fax 1800 555 048 • Technical 1800 555 061
Italy • Orders 02 33430411 • Fax 02 33430426 • Technical 800 787980
Japan • Telephone 03 5547 0811 • Fax 03 5547 0818 • Technical 03 5547 0811
Korea (South) • Orders 1544 7145 • Fax 1544 7146 • Technical 1544 7145
Luxembourg • Orders 8002 2076 • Fax 8002 2073 • Technical 8002 2067
Mexico • Orders 01 800 7742 639 • Fax 01 800 1122 330 • Technical 01 800 7742 639
The Netherlands • Orders 0800 0229592 • Fax 0800 0229593 • Technical 0800 0229602
Norway • Orders 800 18859 • Fax 800 18817 • Technical 800 18712
Singapore • Orders 65 67775366 • Fax 65 67785177 • Technical 65 67775366
Spain • Orders 91 630 7050 • Fax 91 630 5145 • Technical 91 630 7050
Sweden • Orders 020 790282 • Fax 020 790582 • Technical 020 798328
Switzerland • Orders 055 254 22 11 • Fax 055 254 22 13 • Technical 055 254 22 12
UK • Orders 01293 422 911 • Fax 01293 422 922 • Technical 01293 422 999
USA • Orders 800 426 8157 • Fax 800 718 2056 • Technical 800 DNA-PREP (800 362 7737)

www.qiagen.com

www.PreAnalytiX.com

Argentina, Uruguay and Paraguay • Orders 0800 444 5523
Australia • Orders 1 800 656 100 • Fax 1 800 656 110
Austria • Orders 43 1 7063660 • Fax 43 1 706366011
Belgium • Orders 32 53720556 • Fax 32 53720549
Brazil • Orders 0800 55 5654
Canada • Orders 800 268 5430 • Fax 800 565 0897
Denmark • Orders 45 43 43 45 66 • Fax 45 43 96 56 76
East Europe, Middle East & Africa (EMA) • Orders 971 4 3379525 • Fax: 971 4 03379551
Finland • Orders 358 9 88 70 780 • Fax 358 9 88 70 7816
France • Orders 33 4 76 68 36 36
Germany • Orders 49 6221 3050 • Fax 49 6221 305216
Italy • Orders 39 2 48240 500 • Fax 39 2 48240 344
The Netherlands • Orders 31 20 582 9420 • Fax 31 20 582 9421
New Zealand • Orders 0800 572 468 • Fax 0800 572 469
Spain • Orders 34 91 848 8104 • Fax 34 91 848 8115
Sweden • Orders 46 8 775 51 00 • Fax 46 8 645 08 08
Switzerland • Orders 41 61 4852224 • Fax 41 61 4852200
UK • Orders 0800 917 8776
USA • Orders 888 237 2762 • Fax 800 847 2220 • Technical 800 631 0174

www.bd.com

www.PreAnalytiX.com

