

Januar 2020

# PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA Kit-håndbog

Version 2



50 (katalog nr. 762174)

R3 **MAT** 1120409DK

**REF** 762174



PreAnalytiX GmbH  
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon  
Fremstillet af QIAGEN GmbH for PreAnalytiX

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

PAXgene Blood RNA Kit kan ikke fås i alle lande; indhent venligst oplysninger.

#### Aftale om begrænset licens

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af PAXgene Blood RNA Kit accepterer følgende vilkår:

1. PAXgene Blood RNA Kit må kun bruges i overensstemmelse med *PAXgene Blood RNA Kit-håndbogen*, og kun med de komponenter, der er i kittet. PreAnalytiX giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkludere komponenterne i kittet med komponenter, der ikke er inkluderet i dette kit, undtagen som beskrevet i *PAXgene Blood RNA Kit-håndbogen* og yderligere protokoller, som fås på [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver PreAnalytiX ingen garanti om at dette kit, og/eller brugen af det, ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
3. Dette kit og dets komponenter er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, gendannes eller videresælges.
4. PreAnalytiX afviser specifikt alle andre licenser, udtrykte eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af kittet indvilliger i ikke at tage eller lade andre tage skridt, der kunne føre til eller fremme handlinger, der forbydes ovenfor.
6. PreAnalytiX kan håndhæve forbuddene i denne begrænsede licensaftale i enhver ret, og vil inddrive alle undersøgelses- og retsomkostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med kittet og/eller komponenterne deri.

Opdaterede licensvilkår findes på [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

#### Betinget salg

Nærværende produkt leveres med en licens i henhold til visse krav i US-7,270,953 og US-7,682,790 samt EP-1820793 B1 og udenlandske tilsvarende patentkrav på brugen af produktet til behandling af nukleinsyrekomplekser, der dannes under prøveopsamling i en PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-006 BD-8945 1120409 © 2005-2020 PreAnalytiX GmbH, alle rettigheder forbeholdes.

PreAnalytiX Company

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Schweiz

[www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)

#### PreAnalytiX distributører

PreAnalytiX produkterne fremstilles for PreAnalytiX af QIAGEN eller BD og distribueres for PreAnalytiX af QIAGEN eller BD. Produkterne kan ikke bestilles hos PreAnalytiX GmbH.

Adressen på den lokale PreAnalytiX distributør findes på sidste side.

# Indhold

Kit-indhold .....	5
Symboler .....	7
Opbevaringsforhold .....	8
Tilsigtet anvendelse .....	9
Begrænsninger ved produktanvendelsen .....	9
Kvalitetskontrol .....	10
Teknisk service .....	10
Sikkerhedsinformation .....	10
Indledning .....	13
Princip og procedure .....	13
Prøvetagning og stabilisering .....	14
RNA-koncentration og oprensning .....	19
Manuel RNA-oprensning .....	19
Automatisk RNA-oprensning .....	29
Udstyr og reagenser, der skal leveres af brugeren .....	35
Vigtige bemærkninger .....	37
Brug af QIAcube .....	37
Start af QIAcube .....	37
Installation af protokoller på QIAcube .....	37
Opfyldning af QIAcube .....	39
Protokol: Manuel oprensning af total RNA fra humant fuldblod indsamlet i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) .....	48

Protokol: Automatisk oprensning af total RNA fra humant fuldblod indsamlet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT).....	55
Fejlfindingsvejledning.....	62
Bilag A: Generelle bemærkninger om håndtering af RNA.....	64
Bilag B: Kvantificering og kvalitetsbestemmelse for total RNA.....	65
Appendiks C: Håndtering af PAXgene Blood RNA Tube (BRT).....	66
Bestillingsinformation.....	68
Revisionshistorik for håndbogen .....	70


# Kit-indhold

<b>PAXgene Blood RNA Kit</b>			<b>(50)</b>
<b>Katalognr.</b>			<b>762174</b>
<b>Antal præparater</b>			<b>50</b>
BR1	Resuspension Buffer (resuspensionsbuffer)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (bindingsbuffer) *	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer (vaskebuffer) 1 *	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (vaskebuffer) (concentrat) †	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (elueringsbuffer)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-free Water (bottle) (RNase-frit vand) (flaske)	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid) (Proteinase K) (grønt låg)	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (PAXgene RNA-spinsøjler) (røde)	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (forarbejdningsrør) (2 ml)	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BDHemogard™ Closures (Sekundære BD Hemogard™ lukninger)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (mikrocentrifugerør) (1,5 ml)	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-frit (DNase I, RNase-frit) (lyofiliseret)	DNA REM	1500 Kunitz-enheder ‡
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (DNA-digestionsbuffer) (hvidt låg)	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (DNase-resuspensionsbuffer) (rør, lilla låg)	DNase RES BUF	2 ml

\*Må ikke bringes i kontakt med desinfektionsmidler, som indeholder blegemiddel. Indeholder et guanidinsalt. Se sikkerhedsinformation på side 10.

† Wash Buffer (vaskebuffer) 2 (BR4) leveres som koncentrat. For at fremstille en brugsklar opløsning skal der inden første brug tilsættes fire dele ethanol (96–100 %, renhedsgrad p.a.), som angivet på flaskeetiketten.

‡ Kunitz-enheden er den almindeligt anvendte enhed til opmåling af DNase I, defineret som den mængde DNase I som forårsager en stigning i A<sub>260</sub> på 0,001 pr. minut pr. milliliter ved 25 °C, pH 5,0, hvor der anvendes høj-polymeriseret DNA som substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 og 363).

<b>PAXgene Blood RNA Kit</b>		<b>(50)</b>	
<b>Katalognr.</b>		<b>762174</b>	
<b>Antal præparater</b>		<b>50</b>	
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (PAXgene Shredder-spinsøjler) (lilla)	<b>PAXgene</b> <b>SHRED</b> <b>COL</b>	5 × 10
Håndbog	PAXgene Blood RNA Kit-håndbog (version 2)		1

# Symboler



Indeholder tilstrækkelige reagenser til <N> test



Læs brugsanvisningen



Holdbarhedsdato



Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik



Katalognummer



Lotnummer



Materialenummer



Komponenter



Antal



Sterilisering gennem UV-stråling



Kunitz-enheder



Tilsætter



Indeholder














Rekonstitueret



Doxryribonuclease I



Ethanol

	Guanidin-isothiocyanat
	RNase-Free DNase Set
	Globalt handelsvarenummer
	Må ikke genbruges
	Temperaturbegrænsning
	Øvre temperaturgrænse
	Producent
	Vigtig bemærkning
	Skriv den aktuelle dato ned efter tilsætning af ethanol til flasken
	Ved levering
	Fører til

## Opbevaringsforhold

PAXgene RNA-spinsøjler (PRC), PAXgene Shredder-spinsøjler (PSC), proteinase K (PK) og alle bufferne (BR1, BR2, BR3, BR4 og BR5) kan opbevares et tørt sted ved den temperatur, der er angivet på kit-etiketten.

RNase-Free DNase Set, som indeholder DNase I (RNFD), DNA digestionsbuffer (RDD) og DNase resuspensionsbuffer (DRB), forsendes ved omgivelsestemperatur. Alle komponenter i det RNase-Free DNase Set skal umiddelbart efter levering opbevares ved den temperatur,



som er angivet på etiketten. Ved korrekt opbevaring er kittet stabilt indtil den udløbsdato, der er angivet på kit-æsksen.

## Tilsigtet anvendelse

PAXgene Blood RNA Kit bruges til oprensning af intracellulært RNA fra fuldblod, som blev opsamlet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Når kittet anvendes sammen med PAXgene Blood RNA Tube (BRT), leverer systemet oprenset intracellulært RNA fra fuldblod til RT-PCR anvendt i molekylærdiagnostisk testning. Anvisninger vedrørende anvendelsen af PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) findes i *PAXgene Blood RNA Tube Handbook (PAXgene Blood RNA Tube-håndbogen)*.

**Præstationskarakteristika for PAXgene Blood RNA System er kun etableret med FOS- og IL1B-gentranskriptioner. Brugeren er ansvarlig for at etablere egnede præstationskarakteristika for PAXgene Blood RNA-systemet for andre mål-transkriptioner.**

## Begrænsninger ved produktanvendelsen

PAXgene Blood RNA Kit er beregnet til oprensning af intracellulært RNA fra humant fuldblod ( $4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$  leukocyter/ml) til in vitro-diagnostisk anvendelse. Det er ikke beregnet til oprensning af genomisk DNA eller virale nukleinsyrer fra humant fuldblod. Grundet det begrænsede antal transkriptioner, der er valideret til stabiliseringsspecifikationer (FOS- og IL1B-gentranskriptioner), kan der ikke angives præstationskarakteristika for alle transkriptioner. Laboratoriepersonalet skal gennemgå både deres egne og producentens data for at afgøre, om det er nødvendigt at validere andre transkriptioner.

Produktet er beregnet til brug af professionelle brugere, f. eks. laboratorieteknikere og læger, der er uddannet i in vitro-diagnostiske procedurer.

# Kvalitetskontrol

I overensstemmelse med QIAGENs ISO-certificerede kvalitetsstyringssystem testes hvert lot af PAXgene Blood RNA- Kit efter fastlagte specifikationer for at sikre en ensartet produktkvalitet.

# Teknisk service

QIAGENs tekniske service leverer høj kvalitet og er altid til rådighed. De tekniske serviceafdelinger er bemandede med erfarne videnskabelige medarbejdere med vidtrækkende praktisk og teoretisk erfaring i molekylærbiologi og brugen af PreAnalytiX-produkterne. Kontakt os, hvis der er spørgsmål vedrørende PAXgene Blood RNA Kit.

Ring til QIAGENs tekniske service for at få teknisk assistance og yderligere oplysninger.

# Sikkerhedsinformation

Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer.

Ved arbejde med biologiske og kemiske midler skal der altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller for at reducere risikoen for infektion (f.eks. med HIV eller hepatitis B-virus) og skader. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er). De findes online i bekvemt og kompakt PDF-format på [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com), hvor sikkerhedsdatabladene for dette kit kan læses eller udskrives.

## **FORSIGTIG**



Der må IKKE tilsættes blegemiddel eller syreholdige opløsninger direkte i affaldet fra prøveklargøringen.

Bindingsbuffer (BR2) og vaskebuffer 1 (BR3) indeholder guanidin-thiocyanat, som kan reagere stærkt ved kontakt med klorblegemiddel. Hvis der spildes bindingsbuffer (BR2) eller vaskebuffer 1 (BR3), skal der gøres rent med et egnet laboratoriedesinfektionsmiddel og vand. Hvis den spildte væske indeholder potentielt smittefarlige reagenser, renses fladen først med desinfektionsmiddel og vand og derefter med 1 % (v/v) natriumhypoklorit.

RNA-stabiliseringsopløsningen og blodvæsken fra PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kan desinficeres med 1 del klorblegemiddelopløsning (5 % natriumhypoklorit) til 9 dele RNA-stabiliseringsopløsning og blodvæske.

Affaldet fra prøveklargøring, såsom supernatanter fra centrifugeringstrinnene i RNA-oprensningsproceduren, skal altid betragtes som potentielt smittefarligt. Affald skal derfor autoklaveres eller forbrændes før bortskaffelse for at ødelægge eventuelt smittefarligt materiale. De officielle regler for bortskaffelse skal overholdes.

Følgende fare- og sikkerhedssætninger gælder komponenter i PAXgene Blood RNA Kit. Se *sikkerhedsoplysningerne om PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) i PAXgene Blood RNA Tube-håndbog*.

### Buffer BR2



Indeholder: guanidin-thiocyanat. Fare! Farlig ved indtagelse. Kan være farlig ved hudkontakt eller ved indånding. Forårsager alvorlig øjenskade. Skadelig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger. Udvikler meget giftig gas ved kontakt med syre. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenskyttelse/ansigtsbeskyttelse. VED KONTAKT MED ØJNE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis det kan gøres let. Fortsæt med at skylle. Ring omgående til en GIFTINFORMATION eller en læge.

### Buffer BR3



Indeholder: ethanol; guanidin-thiocyanat. Fare! Brandfarlig væske og damp. Forårsager alvorlig øjenskade. Udvikler meget giftig gas ved kontakt med syre. Holdes væk fra varme/gnister/åben ild/varme overflader. Rygning forbudt. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjebeskyttelse/ansigtsbeskyttelse. VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis det kan gøres let. Fortsæt med at skylle. Ring omgående til en GIFTINFORMATION eller en læge.

### DNase I



Indeholder: DNase. Fare! Kan forårsage allergisk hudreaktion. Kan forårsage allergi- eller astmasymptomer eller åndedrætsbesvær ved indånding. Undgå indånding af pulver/røg/gas/tåge/damp/spray. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjebeskyttelse/ansigtsbeskyttelse. Anvend åndedrætsværn. Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Ring til en GIFTINFORMATION eller en læge. Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vedkommende hviler i en stilling, som letter vejtrækningen.

### Proteinase K



Indeholder: proteinase K. Fare! Forårsager let hudirritation. Kan forårsage allergi- eller astmasymptomer eller åndedrætsbesvær ved indånding. Undgå indånding af pulver/røg/gas/tåge/damp/spray. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjebeskyttelse/ansigtsbeskyttelse. Anvend åndedrætsværn. Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Ring til en GIFTINFORMATION eller en læge. Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vedkommende hviler i en stilling, som letter vejtrækningen.

# Indledning

Det første skridt ved mange molekylærbiologiske undersøgelser af cellulært RNA er indsamling af fuldblod. Ustabiliteten af den cellulære RNA-profil in vitro udgør imidlertid et væsentligt problem. Undersøgelser hos PreAnalytiX har vist, at antallet af kopier for enkelte mRNA-species i fuldblod kan forandre sig mere end tusind gange under transport eller opbevaring ved stuetemperatur.\* Årsagerne til dette er den hurtige nedbrydning af RNA og den inducerede ekspression af bestemte gener efter blodtapningen. Sådanne forandringer af RNA-ekspressionens profil forhindrer pålidelige resultater i genekspressionsundersøgelser. Det er derfor afgørende at finde en metode, som bevarer RNA-ekspressionsprofilen under og efter flebotomi, for at opnå en nøjagtig analyse af genekspression i humant fuldblod.

## Princip og procedure

PreAnalytiX har udviklet et nyt system, som gør det muligt at tappe, stabilisere, opbevare og transportere humane fuldblodprøver og som leverer en hurtig og effektiv protokol for oprensning af intracellulært RNA. Systemet kræver, at der bruges PAXgene Blood RNA Tube (BRT; US patenter 6,602,718 og 6,617,170) til blodindsamling og RNA-stabilisering, efterfulgt af manuel eller automatisk RNA-oprensning med PAXgene Blood RNA Kit. Den manuelle og automatisk protokol giver i alt væsentligt den samme præstation med hensyn til RNA-kvalitet og -udbytte. Der er inkluderet præstationsdata for den manuelle protokol (side 22 – 29) og den automatiske protokol (side 32 – 34) i denne håndbog.

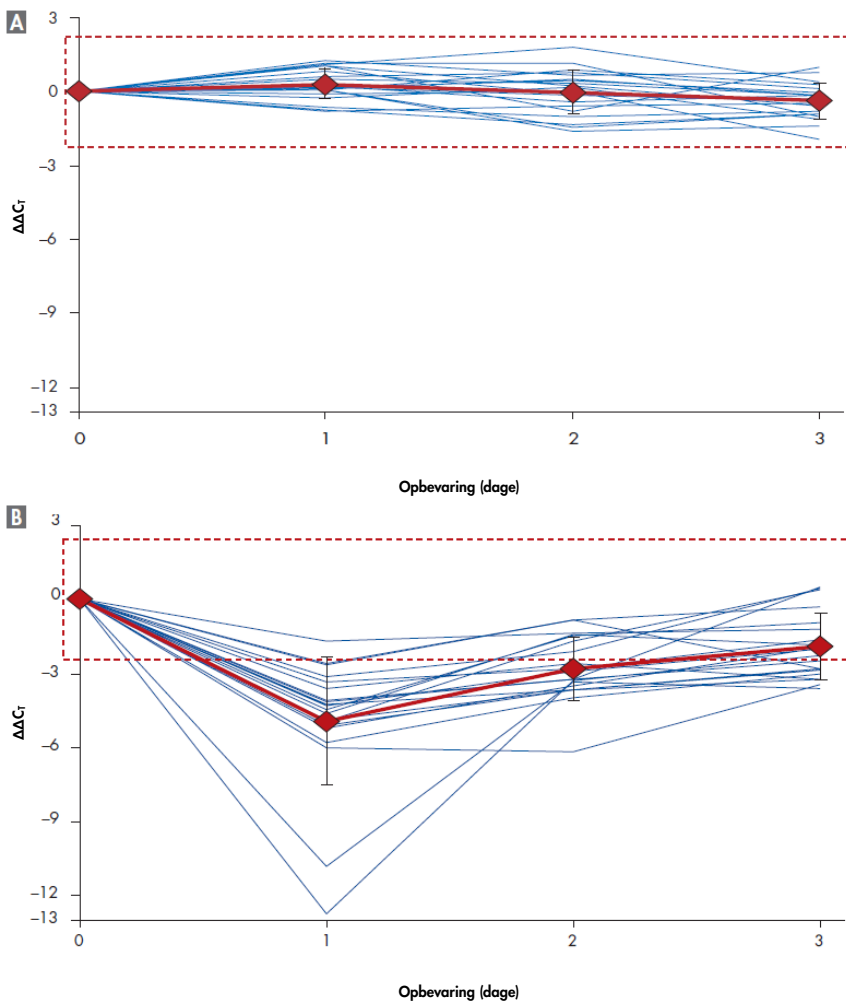
\* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

## Prøvetagning og stabilisering

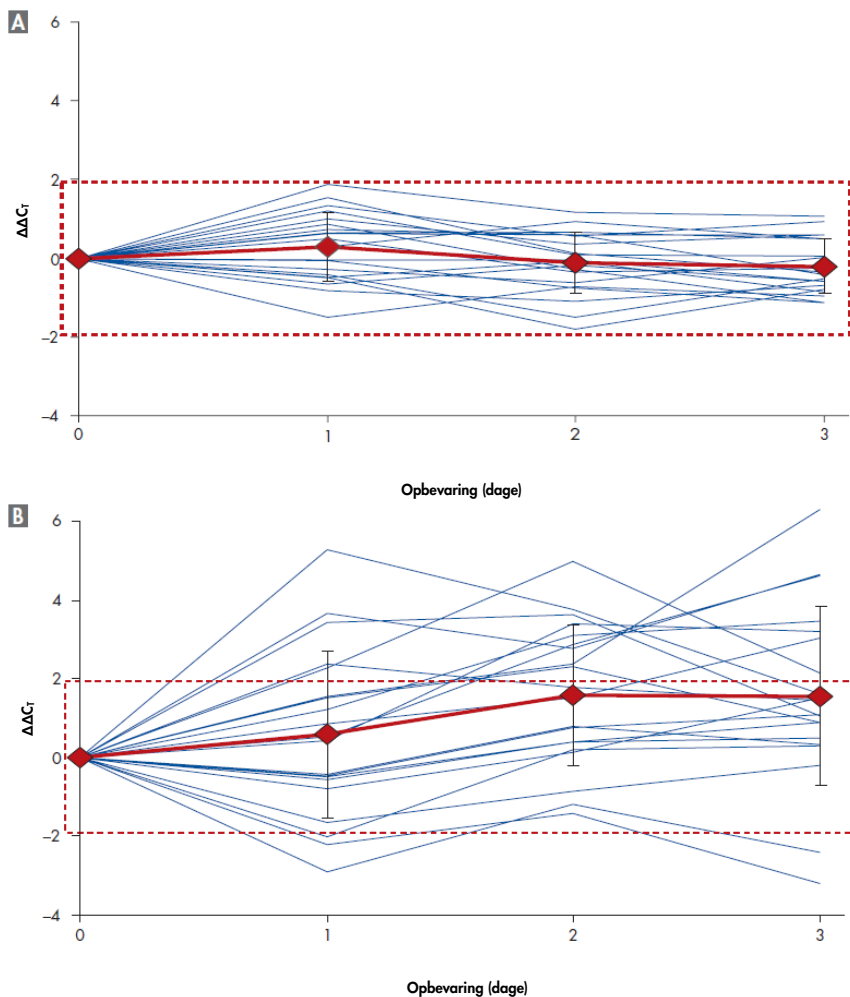
PAXgene Blood RNA-rør (BRT) indeholder et reagens, som er baseret på en patenteret RNA-stabiliseringsmetode. Dette reagens beskytter RNA-molekyler mod nedbrydning gennem RNaser og minimerer ex vivo-forandringer af genekspressionen. PAXgene Blood RNA-rør (BRT) er beregnet til indsamling af humant fuldblod og stabilisering af cellulært RNA i op til 3 dage ved 18-25 °C (se fig. 1 og 2, side 15 og 16) eller i op til 5 dage ved 2-8 °C (fig. 3 og 4, side 17 og 18). Aktuelt disponible data viser, at den cellulære RNA er stabil i mindst 11 måneder ved -20 °C eller -70 °C\*. Kontakt QIAGENs tekniske service for at få flere oplysninger om igangværende undersøgelser af endnu længere stabiliseringstider.

Den faktiske varighed af RNA-stabiliseringen kan variere alt efter RNA-specien og den anvendte downstream-applikation. Grundet det begrænsede antal transkriptioner, der er valideret til stabiliseringsspecifikationer (FOS- og IL1B-gentranskriptioner), kan der ikke angives præstationskarakteristika for alle transkriptioner. Laboratoriepersonalet skal gennemgå både deres egne og producentens data for at afgøre, om det er nødvendigt at validere andre transkriptioner.

\* En langtidsundersøgelse af opbevaring af blod i PAXgene Blood RNA Tubes er under udførelse.

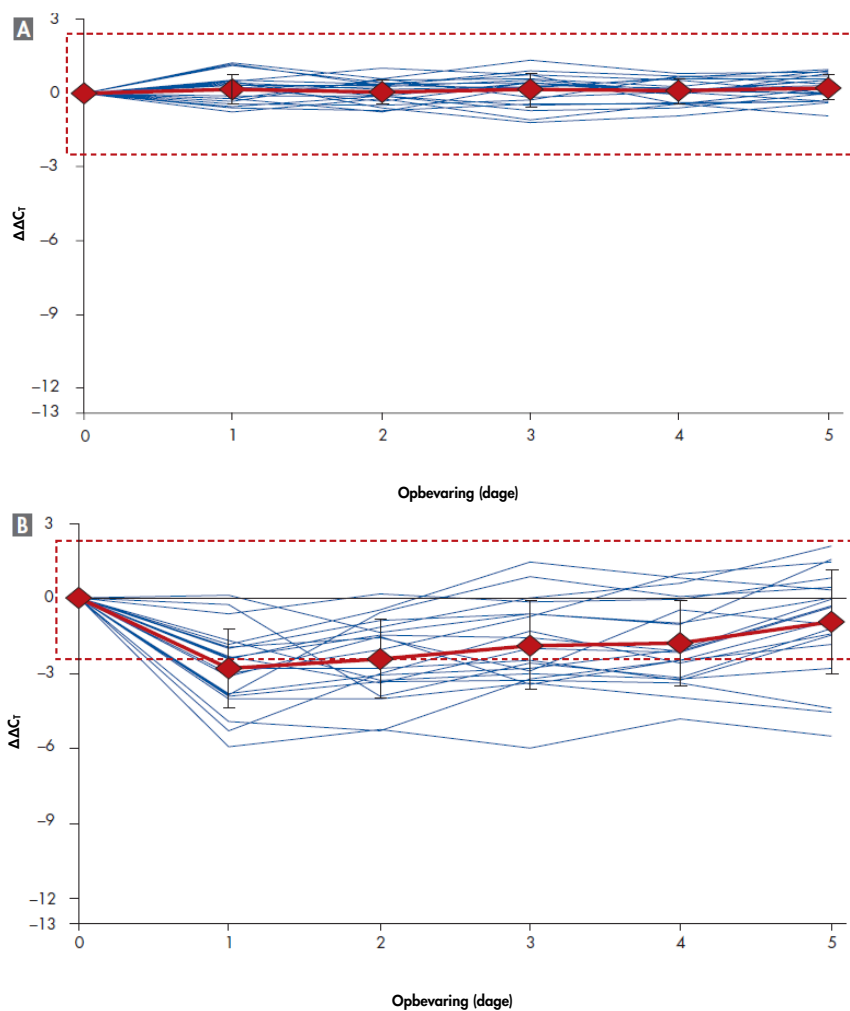


**Figur 1. RNA-stabilitet i blodprøver ved 18-25°C: FOS.** Der blev taget blodprøver i duplikat fra 10 donorer, og prøverne blev opbevaret ved 18-25°C i det angivne antal dage, efterfulgt af total RNA-oprensning. **[A]** Blodet blev indsamlet og opbevaret i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), og total RNA blev oprenset med PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Blodet blev indsamlet og opbevaret i standard-blodprøvetagningsrør med EDTA som antikoagulan, og total RNA blev oprenset med en standard ekstraktionsmetode med organiske opløsningsmidler og silicamembran-baseret RNA-rensning. De relative FOS-transkriptionskoncentrationer blev bestemt med realtids Duplex-RT-PCR under anvendelse af 18S-rRNA som intern standard. Værdierne for alle prøver er opført med middelværdi og standardafvigelse for alle viste prøver. De stiplede linjer gengiver den samlede nøjagtighed  $\pm 3 \times$  analysen ( $2,34 C_t$ ).

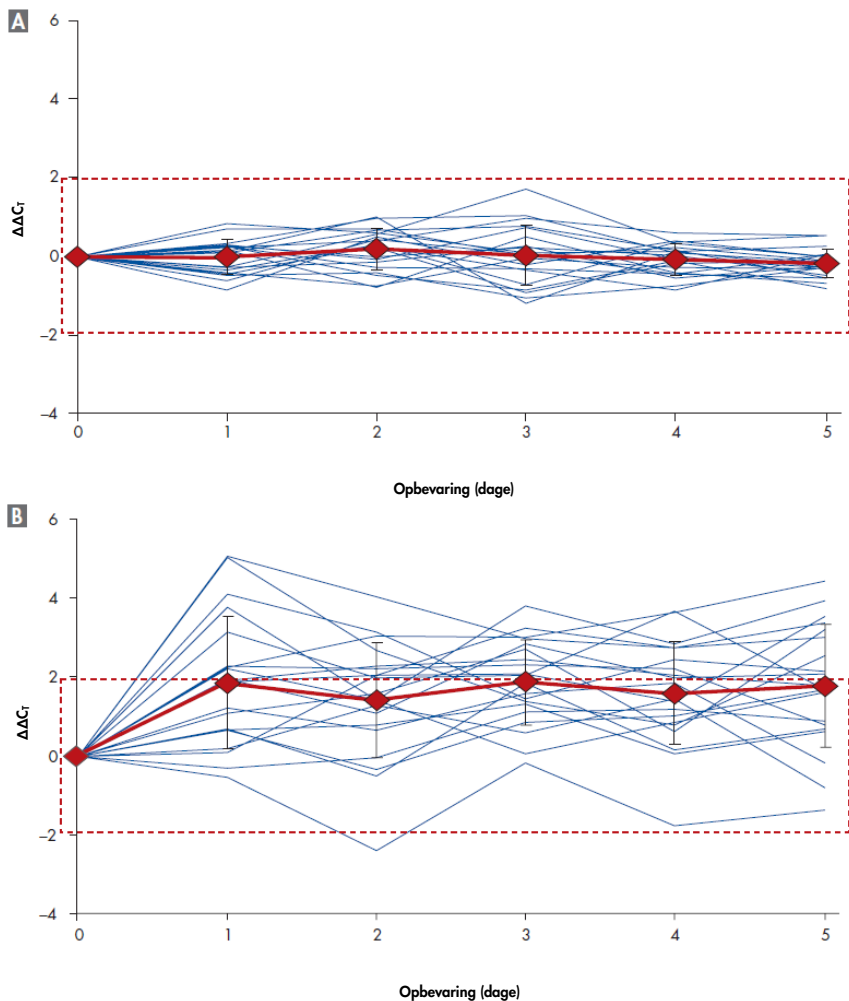


**Figur 2. RNA-stabilitet i blodprøver ved 18-25°C: IL1B.** Der blev udtaget blod, og samlet RNA blev oprenset efter opbevaring ved 18-25 °C som beskrevet i figur 1. De relative IL1B-transkriptionskoncentrationer blev bestemt med realtids duplex-RT-PCR under anvendelse af 18S-rRNA som intern standard. Værdierne for alle prøver er opført med middelværdi og standardafvigelser for alle viste prøver. De stiplede linjer gengiver den samlede nøjagtighed  $\pm 3 \times$  analysen ( $1,93 C_t$ ).





**Figur 3. RNA-stabilitet i blodprøver ved 2-8 °C: FOS.** Der blev taget blodprøver i duplikat fra 10 donorer, og prøverne blev opbevaret ved 2-8°C i det angivne antal dage, efterfulgt af total RNA-oprensning. **[A]** Blodet blev indsamlet og opbevaret i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), og total RNA blev oprenset med PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Blodet blev indsamlet og opbevaret i standard-blodprøvetagningsrør med EDTA som antikoagulans, og total RNA blev oprenset med en standard ekstraktionsmetode med organiske opløsningsmidler og silicamembran-baseret RNA-rensning. De relative FOS-transkriptionskoncentrationer blev bestemt med realtids Duplex-RT-PCR under anvendelse af 18S-rRNA som intern standard. Værdierne for alle prøver er opført med middelværdi og standardafvigelse for alle viste prøver. De stiplede linjer gengiver den samlede nøjagtighed  $\pm 3 \times$  analysen ( $2,34 C_t$ ).



**Figur 4. RNA-stabilitet i blodprøver ved 2-8 °C: IL1B.** Der blev udtaget blod, og samlet RNA blev oprenset efter opbevaring ved 2-8°C som beskrevet i figur 3. De relative IL1B-transkriptionskoncentrationer blev bestemt med duplex-RT-PCR i realtid under anvendelse af 18S-rRNA som intern standard. Værdierne for alle prøver er opført med middelværdi og standardafvigelser for alle viste prøver. De stiplede linjer gengiver den samlede nøjagtighed  $\pm 3 \times$  analysen ( $1,93 C_t$ ).

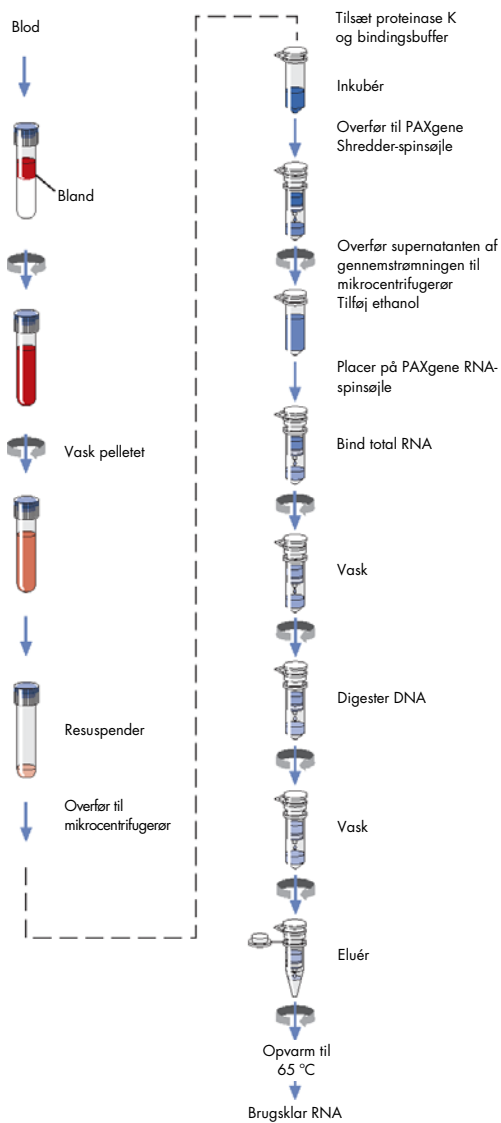
## RNA-koncentration og oprensning

PAXgene Blood RNA-kittet bruges til oprensning af total RNA fra 2,5 ml humant fuldblod, som blev indsamlet i et PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Proceduren er enkel og kan udføres manuelt eller automatisk (se figur 5 og 10, side 20 og 30). I begge protokoller begynder oprensningen med et centrifugeringstrin for at samle nukleinsyrer i pellets i PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Pelletet vaskes og resuspenderes, efterfulgt af manuel eller automatisk RNA-oprensning. Begge protokoller følger i princippet de samme protokoltrin, med de samme kit-komponenter.

### Manuel RNA-oprensning

Det resuspenderede pellet inkuberes i optimeringsbuffer og proteinase K (PK) for at digestere proteiner. En yderligere centrifugering med en PAXgene Shredder-spinsøjle (PSC) udføres for at homogenisere cellelysatet og fjerne tiloversblevne cellerester. Supernatanten af gennemstrømningen overføres til et frisk mikrocentrifugerør. Derefter tilsættes ethanol for at justere bindingsbetingelserne, og lysatet overføres på PAXgene RNA-spinsøjlen (PRC). Ved den efterfølgende korte centrifugering binder RNA selektivt til PAXgene silicagel-membranen, mens kontaminanter passerer igennem den. Tiloversblevne kontaminanter fjernes ved hjælp af flere effektive vasketrin. Mellem det første og det andet vasketrin bliver membranen behandlet med DNase I (RNFD) for at fjerne eventuelle bundne rester af DNA. Efter vasketrinnene bliver RNA elueret i elueringsbuffer (BR5) og varmedenatureret.

Totalt RNA oprenset ved hjælp af PAXgene Blood RNA-systemet er rent. Anvendes den manuelle protokol, er værdierne  $A_{260}/A_{280}$  mellem 1,8 og 2,2 og  $\leq 1\%$  (w/w) genomisk DNA til stede i  $\geq 95\%$  af alle prøver, som målt af kvantitativ realtids-PCR af en sekvens af beta-actin genet. Mindst 95 % af prøverne viser ingen hindring i RT-PCR, ved brug af op til 30 % af eluatet.

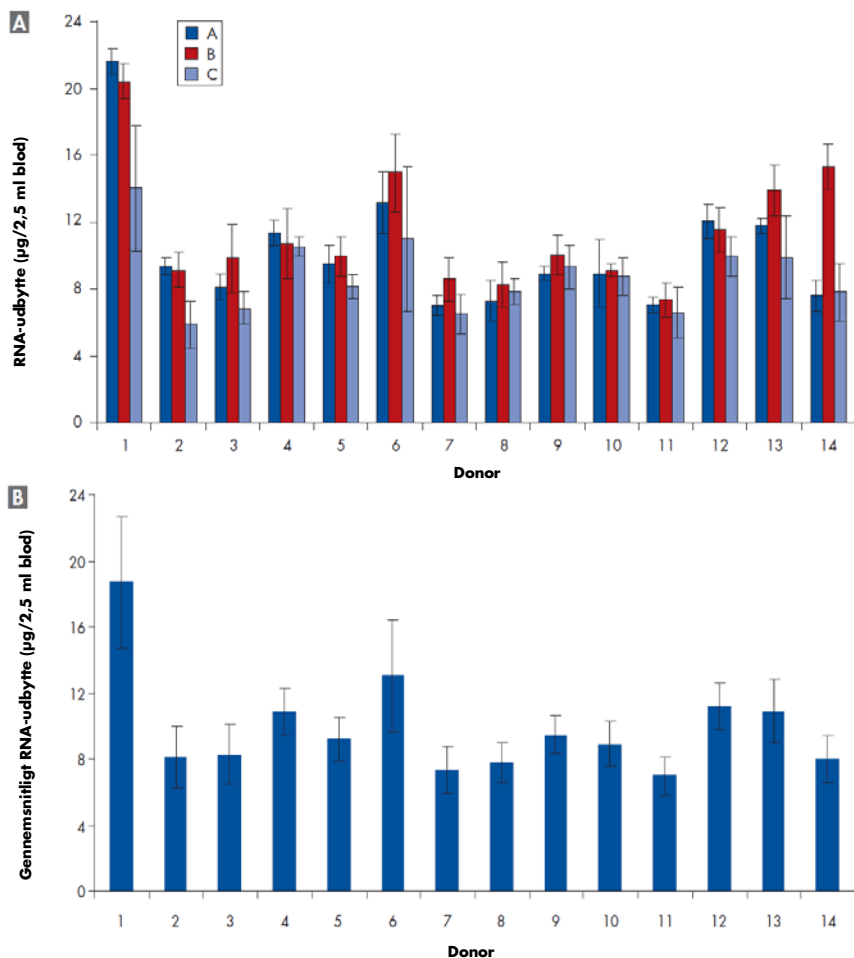


**Figur 5. Den manuelle PAXgene Blood RNA-procedure.**

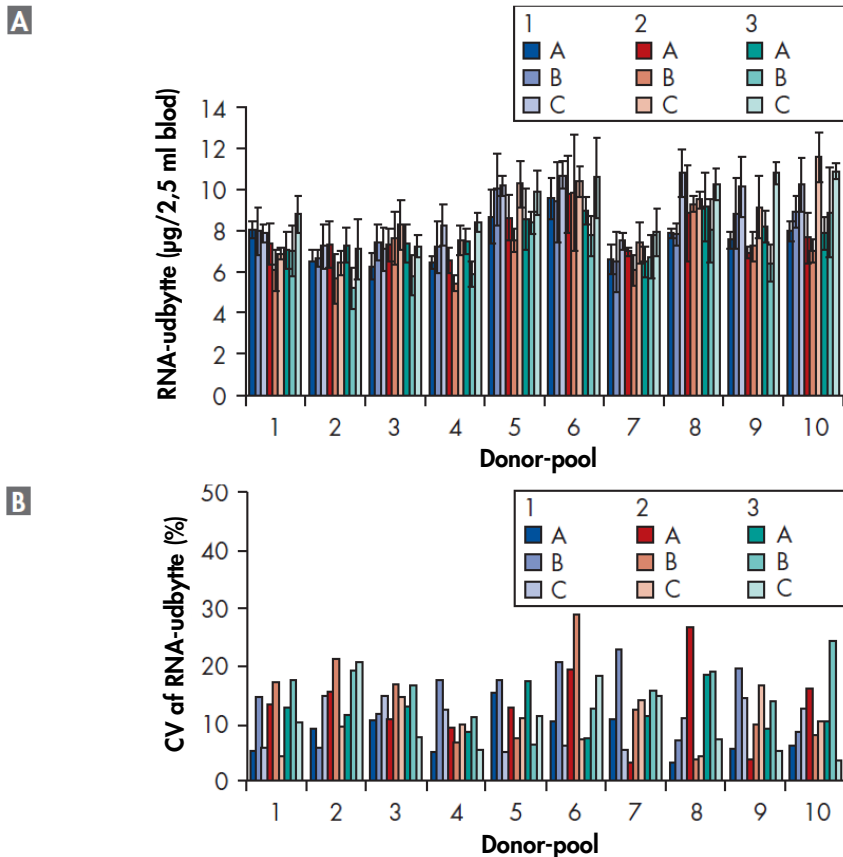
Når den manuelle protokol følges, er gennemsnitstiden for prøveklargøring (baseret på data fra 12 prøveklargøringer) ca. 90 minutter\*, hvoraf den rene håndteringstid udgør ca. 40 minutter. RNA-udbyttet fra 2,5 ml sundt humant fuldblod er  $\geq 3 \mu\text{g}$  for  $\geq 95 \%$  af de forarbejdede prøver. Da udbyttet afhænger stærkt af donorerne, kan de enkelte udbytter variere. For individuelle donorer leverer PAXgene Blood RNA-systemet yderst reproducerbare og gentagelige udbytter (se figur 6 og 7 på side 22 og 23), såvel som reproducerbare og gentagelige RT-PCR-resultater (se figur 8 og 9 på side 27 og 28), hvilket gør det velegnet til klinisk-diagnostiske undersøgelser.

Figur 6 (side 22) viser den generelle reproducerbarhed og gentagelighed for PAXgene Blood RNA-systemet. Der blev foretaget yderligere undersøgelser for at påvise, hvilken indflydelse forskellige lots af PAXgene Blood RNA Kit og forskellige laboranter havde på reproducerbarheden af RNA-udbyttet og realtids-RT-PCR-resultaterne. Eftersom der blev anvendt poolede blodprøver i stedet for individuelle PAXgene Blood RNA-rør (BRT), gengiver forsøgsresultaterne ikke systemets gentagelsespræcision, herunder fluktuationer mellem de enkelte blodindsamlinger, men kun gentagelsespræcisionen for prøvepræparationen (se figur 7, side 23).

\* Den samlede kørselstid for protokollen, inklusive den første håndtering af PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugeringer, vask og resuspension af pelletet).



**Figur 6. Reproducerbar og gentagelig RNA-oprensning.** Firedobbelte blodprøver fra 14 donorer blev alle manuelt behandlet af tre forskellige laboranter (A, B og C). Der blev benyttet tre forskellige sæt udstyr, og alle prøver, der var blevet klargjort af en enkelt laborant, blev behandlet med det samme udstyr. **[A]** Middelværdi og standardafvigelse for RNA-udbyttet pr. gentaget prøve fra samme donor og forskellige laboranter vises. **[B]** Tolv gentagne blodprøver fra hver af de 14 donorer blev forarbejdet af de 3 forskellige laboranter. Middelværdier og standardafvigelser for RNA-udbyttet pr. prøve fra samme donor og alle laboranter vises. Ved alle RNA-prøver var  $A_{260}/A_{280}$ -forholdet i området fra 1,8 til 2,2.



**Figur 7. Gentagelighed og reproducerbarhed af RNA-udbyttet for forskellige laboranter og forskellige lots af PAXgene Blood RNA Kits ved anvendelse af poolede blodprøver.** Der blev indsamlet blodprøver fra 30 donorer i PAXgene Blood RNA Tube (BRT; 12 rør pr. donor, dvs. i alt 360 rør). Indholdet af rørene fra 3 donorer blev poollet og derefter delt i alikvoter på 36 prøver. Disse 36 prøver pr. 3-donor-pool blev behandlet manuelt af tre forskellige laboranter. Hver laborant anvendte 3 forskellige lots af PAXgene Blood RNA Kit til ekstraktionen og forarbejdede firdobbelte prøver fra hver af de ti donor-pools. **[A]** RNA-udbytte og standardafvigelse for hver kombination af laborant og lot. Firdobbelte blodprøver fra 10 donor-pools blev forarbejdet af 3 forskellige laboranter (A, B og C) med hver af tre kit-lots (1, 2 og 3). Der vises middelværdier af udbyttet (søjler) og standardafviser (fejlbjælker) pr. firdobbelte prøver fra den samme donor-pool for forskellige laboranter og kit-lots. **[B]** Variationskoefficienten (CV) af RNA-udbytte pr. donor-pool for alle kombinationer af laborant og lot (A, B, C; 1, 2, 3), udregnet fra middelværdi og standardafvigelse for udbyttet, som er vist i figur 7A.

**Tabel 1A. Reproducerbarhed inden for hvert lot og hver bruger til valgte donor-pools (1, 6, 9, 10)**

Kombination af data	Donor-pool 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> celler/ml			Donor-pool 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> celler/ml		
	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Lot 1, bruger A	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
Lot 1, bruger B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
Lot 1, bruger C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
Lot 2, bruger A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
Lot 2, bruger B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
Lot 2, bruger C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
Lot 3, bruger A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
Lot 3, bruger B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
Lot 3, bruger C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
Kombination af data	Donor-pool 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> celler/ml			Donor-pool 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> celler/ml		
	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Lot 1, bruger A	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
Lot 1, bruger B	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Lot 1, bruger C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Lot 2, bruger A	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Lot 2, bruger B	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Lot 2, bruger C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Lot 3, bruger A	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Lot 3, bruger B	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Lot 3, bruger C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3



Tabel 1B. Reproducerbarhed inden for hver bruger og mellem alle lots til valgte donor-pools (1, 6, 9, 10)

Kombination af data	Donor-pool 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> celler/ml			Donor-pool 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> celler/ml		
	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Bruger A, alle lots	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Bruger B, alle lots	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Bruger C, alle lots	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Kombination af data	Donor-pool 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> celler/ml			Donor-pool 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> celler/ml		
	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Bruger A, alle lots	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Bruger B, alle lots	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Bruger C, alle lots	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

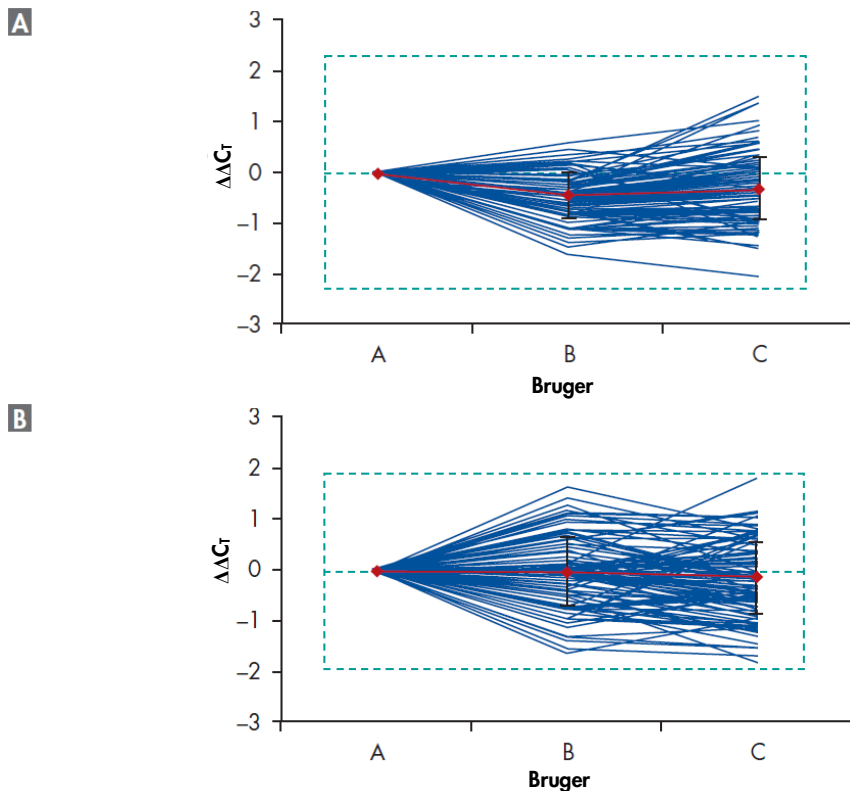
Tabel 1C. Reproducerbarhed inden for hver bruger og mellem alle brugere til valgte donor-pools (1, 6, 9, 10)

Kombination af data	Donor-pool 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> celler/ml			Donor-pool 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> celler/ml		
	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Lot 1, alle brugere	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Lot 2, alle brugere	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Lot 3, alle brugere	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Kombination af data	Donor-pool 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> celler/ml			Donor-pool 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> celler/ml		
	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Lot 1, alle brugere	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Lot 2, alle brugere	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Lot 3, alle brugere	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

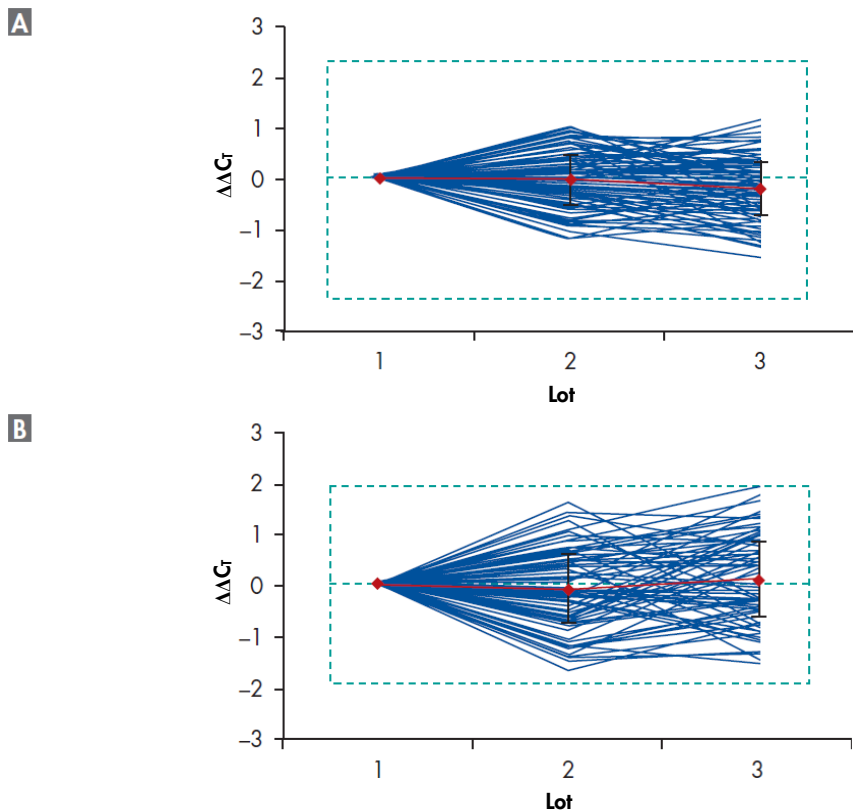
**Tabel 1D. Reproducerbarhed mellem alle lots og alle brugere til valgte donor-pools (1, 6, 9, 10)**

Kombination af data	Donor-pool 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> celler/ml			Donor-pool 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> celler/ml		
	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Lot 1, alle brugere	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
Kombination af data	Donor-pool 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> celler/ml			Donor-pool 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> celler/ml		
	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gennemsnitligt udbytte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Lot 1, alle brugere	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Detaljeret analyse af 4 repræsentative donor-pools. Pools blev valgt i henhold til antallet af hvide blodlegemer og viser høje, mellem og lave værdier i det normale område for antallet af hvide blodlegemer ( $4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$  leukocytter/ml). Antallet af hvide blodlegemer repræsenterer gennemsnitsværdien af de 3 tællinger af hvide blodlegemer fra de 3 donorer pr. donor-pool.



**Figur 8. Reproducerbarhed for RT-PCR – mellem brugere.** RNA, som blev oprenset i det eksperiment, der er beskrevet i figur 7, blev benyttet til realtids RT-PCR. De relative [A] FOS og [B] IL1B transkriptionskoncentrationer blev bestemt med duplex-RT-PCR i realtid under anvendelse af 18S-rRNA som intern standard. Værdier for alle prøver vises relativt til værdierne af bruger 1 (10 donor-pools x 3 kit-lots x 4 gentagelser = 120 data-sæt for hvert gen) med middelværdi (rød linje) og standardafvigelse (sort, lodret bjælke) for alle viste prøver. De stiplede linjer gengiver den samlede nøjagtighed  $\pm 3 \times$  analysen (FOS: 2,34  $C_T$ ; IL1B: 1,93  $C_T$ ).



**Figur 9. Reproducerbarhed af RT-PCR – mellem kit-lots.** RNA, som blev oprenset i det eksperiment, der er beskrevet i figur 7, blev benyttet til realtids RT-PCR. De relative **[A]** FOS og **[B]** IL1B transkriptionskoncentrationer blev bestemt med duplex-RT-PCR i realtid under anvendelse af 18S-rRNA som intern standard. Værdier for alle prøver vises relativt til værdierne for kit-Lot 1 (10 donor-pools x 3 brugere x 4 gentagelser = 120 datasæt for hvert gen) med middelværdi (rød linje) og standardafvigelse (sort, lodret bjælke) for alle viste prøver. De stiplede linjer gengiver den samlede nøjagtighed  $\pm 3 \times$  analysen (FOS: 2,34  $C_t$ ; IL1B: 1,93  $C_t$ ).

**Tabel 2. Sammenfatning af RT-PCR-data fra figur 8 og 9**

Testsystem	FOS/18S rRNA-analyse		IL1B/18S rRNA-analyse	
	Middel ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SD ( $\Delta\Delta C_T$ )	Middel ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SD ( $\Delta\Delta C_T$ )
<b>Reproducerbarhed inden for hver bruger og mellem alle lots</b>				
Alle brugere, lot 1 – lot 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Alle brugere, lot 1 – lot 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Alle brugere, lot 1 – lot 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
<b>Reproducerbarhed inden for hver bruger og mellem alle lots</b>				
Alle lots, bruger A – bruger A	0,00	0,00	0,00	0,00
Alle lots, bruger A – bruger B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Alle lots, bruger A – bruger C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Bruger: Laborant, udførte undersøgelsen.

Lot: Lotnummer for det anvendte kit.

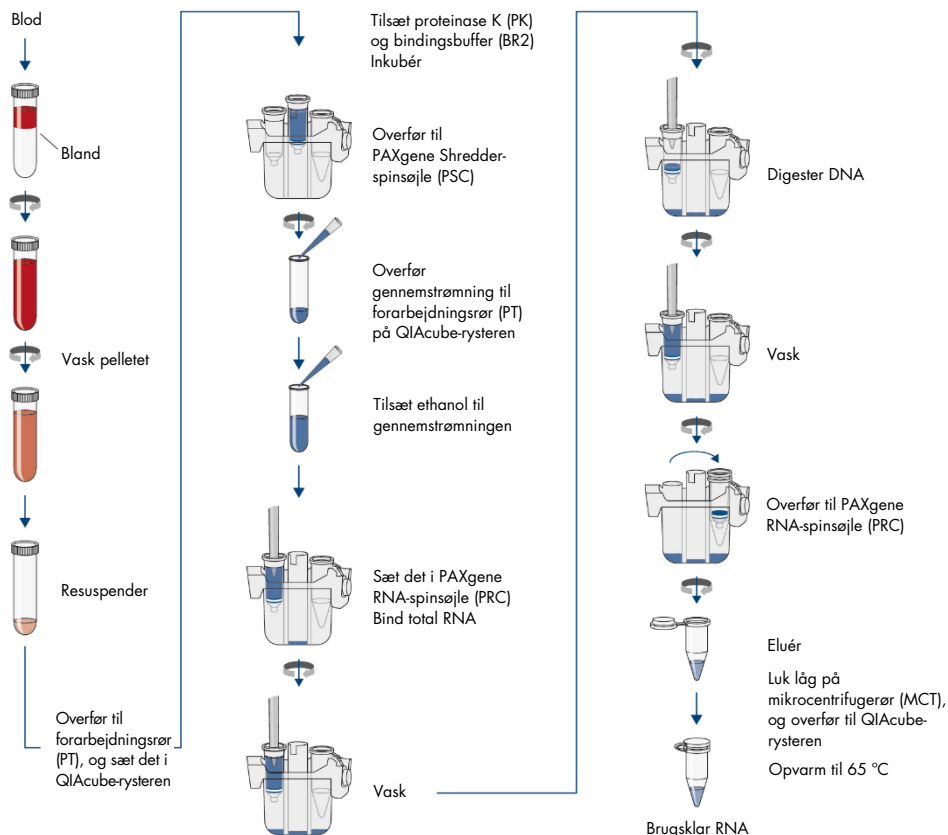
SD: Standardafvigelse.

Gennemsnitsværdi  $\Delta\Delta C_T$  (N = 120) og standardafvigelse er vist for de data, som præsenteres i figur 8 og 9.

## Automatisk RNA-oprensning

Prøveklargøring er automatiseret med standard-QIAcube®-instrumentet (kat. nr. 9001882 [110 V], kat.-nr. 9001293 [230 V]; uden QIAcube Connect) og følger de samme trin som den manuelle procedure, hvilket gør det muligt fortsat at bruge PAXgene Blood RNA Kit til oprensning af RNA af høj kvalitet. Se *QIAcube User Manual (QIAcube-brugervejledningen)* og [www.giagen.com/MyQIAcube](http://www.giagen.com/MyQIAcube) for at få mere information om QIAcube.

Den automatiske RNA-oprensningsprotokol består af 2 dele (eller protokoller), "PAXgene Blood RNA Part A" og "PAXgene Blood RNA Part B", med en kort manuel indgriben mellem de 2 dele (se figur 10, side 30).



**Figur 10. Den automatiske PAXgene Blood RNA-procedure.**

Den centrifugerede, vaskede og resuspenderede nukleinsyreplet (se "RNA-koncentration og -oprensning" på side 19) overføres fra PAXgene Blood RNA Tube (BRT) til forarbejdningsrørene (PT), som placeres i termoshakerenheten på QIAcube-arbejdsbordet. Operatøren vælger og starter protokollen "PAXgene Blood RNA Part A" fra menuen. QIAcube udfører trinene i protokollen frem til eluering af RNA i elueringsbuffer (BR5).

Operatøren overfører mikrocentrifugerørerne (MCT), som indeholder den oprensede RNA, til termoshakerenheden på QIAcube. Operatøren vælger og starter protokollen "PAXgene Blood RNA Part B" fra menuen, og varmedenaturering udføres af QIAcube.

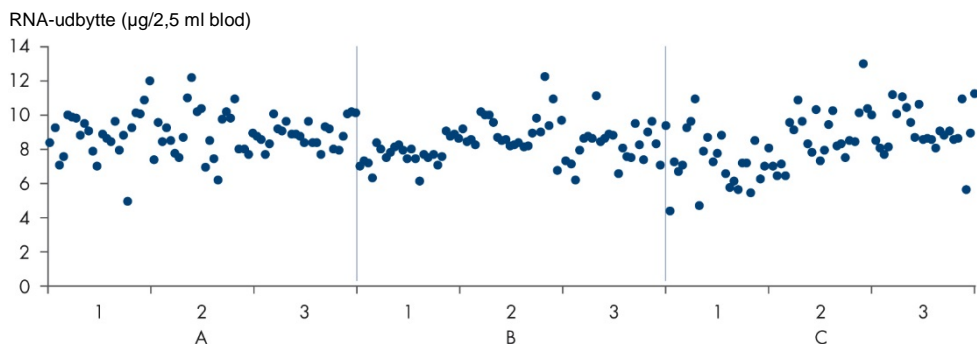
Gennemsnitstiden for prøveklargøring (baseret på data fra 12 kørsler af prøveklargøring) er 151 minutter\* med betydeligt mindre ren håndteringstid sammenlignet med den manuelle protokol.

RNA-udbyttet fra 2,5 ml sundt humant fuldblod er  $\geq 3$   $\mu\text{g}$  for  $\geq 95$  % af de forarbejdede prøver. Figur 11 (side 32) viser RNA-udbyttet fra 216 prøver der blev forberedt med den automatiske protokol, med 3 kit-lots af 3 operatører. Eftersom der blev brugt poolede blodprøver i stedet for individuelle PAXgene Blood RNA Tube (BRT) til disse undersøgelser, viser resultaterne ikke det forventede RNA-udbyttet fra enkelte prøver i individuelle blodindsamlinger. Da udbyttet afhænger stærkt af donorerne, kan de enkelte udbytter variere (figur 11, side 32).

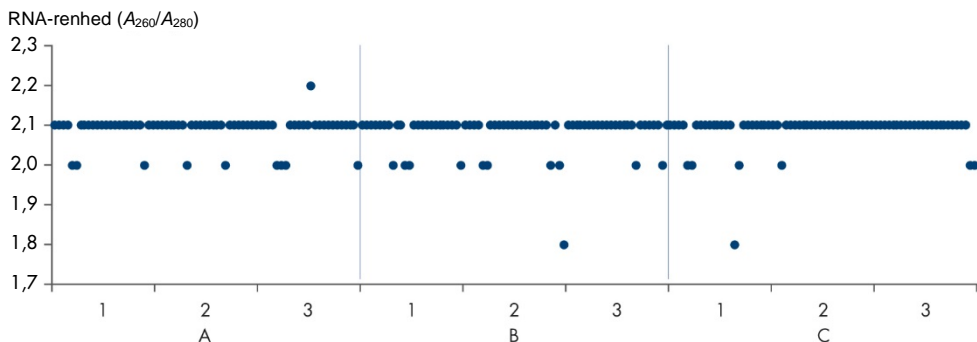
Mindst 95 % af prøverne viser ingen hindring i RT-PCR, ved brug af op til 30 % af eluatet. Hvis den automatiske protokol bruges, kan krydskontaminering mellem prøver ikke detekteres, som målt i kvantitativ, realtids RT-PCR af sekvenser af ABL1- og FOS-transkriptioner i RNA-negative prøver (vand) mod RNA-positive prøver (humant fuldblod) i samme kørsel.

RNA, der er oprenset med PAXgene Blood RNA-systemet og den automatiske protokol, er ren, som det fremgår af manglen på RT-PCR-hindring (se figur 11, side 32) og  $A_{260}/A_{280}$ -værdier mellem 1,8 og 2,2. Genomisk DNA er til stede ved  $\leq 1$  % (w/w) i  $\geq 95$  % af alle prøver, som målt i kvantitativ, realtids-PCR af en sekvens af beta-actin-genet. Figur 12 og 13 (side 32 og 33) viser  $A_{260}/A_{280}$ -værdierne og relativt genomisk DNA af de i alt 216 prøver, der er klargjort med den automatiske protokol med 3 kit-lots af 3 laboranter.

\* Den samlede kørselstid for protokollen, inklusive den første håndtering af PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugeringer, vask og resuspension af pelletet).

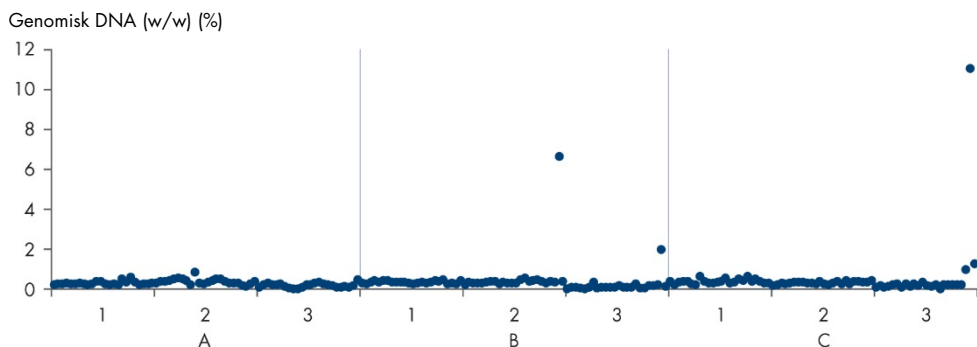


**Figur 11. RNA-udbytte – automatisk forarbejdning.** Der blev indsamlet blodprøver fra 36 donorer i PAXgene Blood RNA Tube (BRT; 6 rør pr. donor, dvs. i alt 216 rør). Indholdet af rørene fra 6 donorer blev poollet og derefter delt i alikvoter på 36 prøver. Disse 36 prøver pr. 6-donor-pool blev behandlet manuelt af 3 forskellige laboranter (A, B, C). Hver laborant anvendte PAXgene Blood RNA Kit fra tre forskellige lots (1, 2, 3) til automatisk udrækning, og forarbejdede firdobbelte prøver fra hver af de 6 donor-pools. RNA-udbytte for alle individuelle prøver er vist for hver operatør-/lot-kombination.



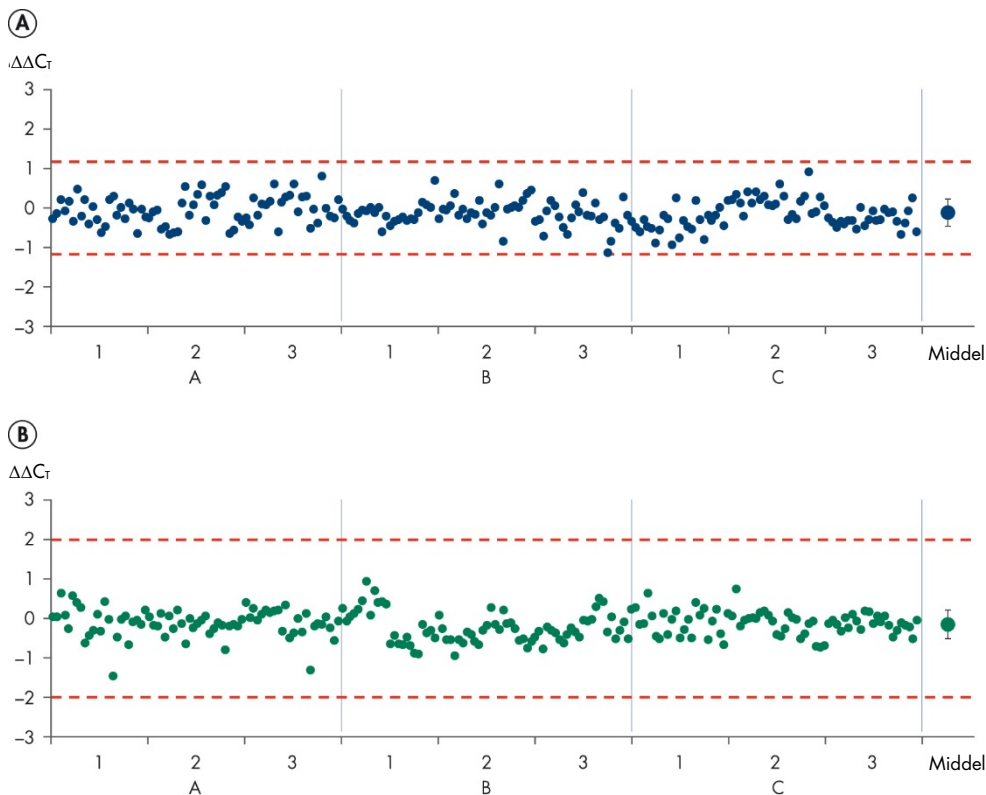
**Figur 12. RNA-renhed ( $A_{260}/A_{280}$ -værdier) – automatisk forarbejdning.** RNA blev oprenset af 3 forskellige laboranter (A, B, C) med 3 forskellige lots (1, 2, 3) fra PAXgene Blood RNA Kit i det eksperiment, der er beskrevet i figur 11.  $A_{260}/A_{280}$ -værdier for alle individuelle prøver er vist for hver operatør-/lot-kombination.





**Figur 13. RNA-renhed (% genomisk DNA-forurening) – automatisk forarbejdning.** RNA blev oprenset af 3 forskellige laboranter (A, B, C) med 3 forskellige lots (1, 2, 3) fra PAXgene Blood RNA Kit i det eksperiment, der er beskrevet i figur 11. Genomiske DNA-mængder (w/w) for alle individuelle prøver er vist for hver operatør/lot-kombination.

Den automatiske protokol for RNA-oprensning med PAXgene Blood RNA-systemet giver RT-PCR-resultater med høj reproducerbarhed og gentagelighed, som vist i figur 14 (side 34), hvilket gør den meget robust til klinisk-diagnostiske tests.



**Figur 14. Reproducerbarhed for RT-PCR – mellem automatiserede og manuelle protokoller.** RNA blev oprenset af 3 forskellige laboranter (A, B, C) med 3 forskellige lots (1, 2, 3) fra PAXgene Blood RNA Kit med den automatiserede protokol i det eksperiment, der er beskrevet i figur 11. Parallelt hermed blev RNA oprenset fra de tilsvarende replikatrør med den manuelle protokol. De relative **[A]** FOS og **[B]** IL1B transkriptionskoncentrationer blev bestemt med realtids Duplex-RT-PCR under anvendelse af 18S-rRNA som intern standard. Mulige forskelle i transkriptionsniveauer mellem RNA forberedt fra parrede blodprøver med begge udtrækningsprotokoller (automatisk og manuel protokol) blev udregnet med metoden  $\Delta\Delta C_T$ . Individuelle  $\Delta\Delta C_T$  værdier for alle prøvepar (4 replikater x 6 donor-pools x 3 kit-lots x 3 operatører = 216 par for hvert gen) vises som enkelte prikker med gennemsnit (større prikker) og standardafvigelser (sorte bjælker) for alle de viste prøver. De stiplede linjer gengiver den samlede nøjagtighed  $\pm 3 \times$  analysen (FOS: 1,16  $C_T$ ; IL1B: 1,98  $C_T$ ; forskellig analysepræcision sammenlignet med figur 1–4, 8 og 9 pga. forskellige analyseversioner).

# Udstyr og reagenser, der skal leveres af brugeren

Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

## For alle protokoller

- PAXgene Blood RNA Tube (BRT, kat.-nr. 762165)
- Ethanol (96–100 %, renhedsgrad p. a.)
- Pipettér\* (10 µl – 4 ml)
- Sterile RNase-fri pipettespidser†, med aerosol-barriere.
- Målecylinder‡
- Centrifuge\* med variable hastigheder fra 3.000–5.000 x g, udstyret med udsvingsrotor og centrifugebægre til PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Vortex-mixer\*
- Knust is
- Vandfast tusch til etiketter

## Til manuel protokol

- Mikrocentrifuge\* med variabel hastighed mellem 1.000–8.000 x g, lavere eller højere g-kraft kan dog anvendes (se yderligere oplysninger i protokoltrinnene). Centrifugen skal være udstyret med en rotor til 2 ml mikrocentrifugerør

\* Sørg for, at instrumenterne regelmæssigt kontrolleres, vedligeholdes og kalibreres efter producentens anvisninger.

† Brugeren skal gøre sig bekendt med retningslinjerne for håndtering af RNA (bilag A, side 64).

‡ Til tilsætning af ethanol til buffer BR4-koncentrat.

- Shaker-inkubator\* der kan inkubere ved 55 °C og 65 °C og ryste ved  $\geq 400$  omdr./min., ikke over 1.400 omdr./min. (f.eks. Eppendorf® Thermomixer Compact eller tilsvarende)

## Til den automatiserede protokol

- QIAcube\* (QIAGEN, kat. nr. 9001882 [110 V], kat. nr. 9001293 [230 V])
- Saks

### QIAcube forbrugsvarer

- Filter-Tips, 1.000  $\mu$ l (1024) (QIAGEN, kat. nr. 990352)<sup>†</sup>
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, kat. nr. 990393)<sup>†</sup>
- Rotor Adapters, (10 x 24) (QIAGEN, kat. nr. 990394)<sup>†</sup>

### QIAcube-tilbehør

- Reagent Bottle Rack (QIAGEN, kat. nr. 990390)<sup>†</sup>
- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, kat. nr. 990392)<sup>†</sup>

\* Sørg for, at instrumenterne regelmæssigt kontrolleres, vedligeholdes og kalibreres efter producentens anvisninger.

<sup>†</sup> Også inkluderet i Starter Pack, QIAcube (QIAGEN kat. nr. 990395)

# Vigtige bemærkninger

## Brug af QIAcube

Brugeren skal være bekendt med betjeningen af QIAcube. Læs venligst *QIAcube-brugervejledningen* og al yderligere information, der følger med QIAcube, og vær ekstra opmærksom på sikkerhedsinformationen, før de automatiske PAXgene Blood RNA-protokoller påbegyndes.

## Start af QIAcube

Luk døren på QIAcube, og tænd for QIAcube med strømkontakten (se figur 15, side 38).

Der lyder et bip, og opstartsskærmen vises. Instrumentet udfører automatisk opstartstest.

## Installation af protokoller på QIAcube

En indledende protokolinstallation er påkrævet, før den første RNA-klargøringskørsel kan udføres på QIAcube. Installer begge protokollerne "PAXgene Blood RNA Part A" og "PAXgene Blood RNA Part B".

Protokoller findes på **[www.giagen.com/MyQIAcube](http://www.giagen.com/MyQIAcube)** og skal downloades til den USB-nøgle, der følger med QIAcube, og overføres til QIAcube via USB-porten.

USB-porten, der er placeret bag beskyttelsespanelet (se figur 15, side 38), gør det muligt at koble QIAcube til en USB-nøgle (følger med QIAcube). Datafiler, såsom log- eller rapportfiler, kan også overføres via USB-porten fra QIAcube til USB-nøglen.



USB-porten må kun bruges til den USB-nøgle, der leveres af QIAGEN. Slut ikke andre enheder til denne port.



Fjern ikke USB-nøglen, mens protokoller downloades eller datafiler overføres, eller under en protokolkørsel.



Figur 15. QIAcube set forfra.

1

Berøringsskærm

2

Dør

3

RS232-serieport bag beskyttelsespanel (må kun benyttes af QIAGEN instrumentservicespecialister)

4

USB-port bag beskyttelsespanel

5

Strømafbryder

6

Affaldsskuffe

## Opfyldning af QIAcube

For at spare tid kan opfyldningen udføres under en eller begge de 10 minutters centrifugetrin (trin 3 og 5) i "Protokol: Automatisk oprensning af total RNA fra humant fuldblod indsamlet i PAXgene Blood RNA-rør (BRT)", side 55.

### Reagensflasker

Før hver kørsel på QIAcube fyldes de 4 reagensflasker forsigtigt med reagenserne fra tabel 3 op til det maksimale niveau eller, hvis dette ikke er muligt, til det niveau, som er muligt med de buffermængder, der leveres i PAXgene Blood RNA Kit. Mærk tydeligt flasker og låg med buffernavn, og placer de fyldte reagensflasker korrekt i reagensflaskeholderen. Sæt holderen ind på QIAcube-arbejdsbordet som vist (figur 16 og 17, side 40 og 41).



Den leverede mængde af buffer BR2 vil ikke fylde en reagensflaske op til det viste niveau. Buffer BR3 og BR4 vil muligvis ikke fylde flasken op til det viste niveau efter forarbejdning af flere prøver i tidligere kørsler.



Sørg for at fjerne lågene fra flaskerne, før de placeres på arbejdsbordet.

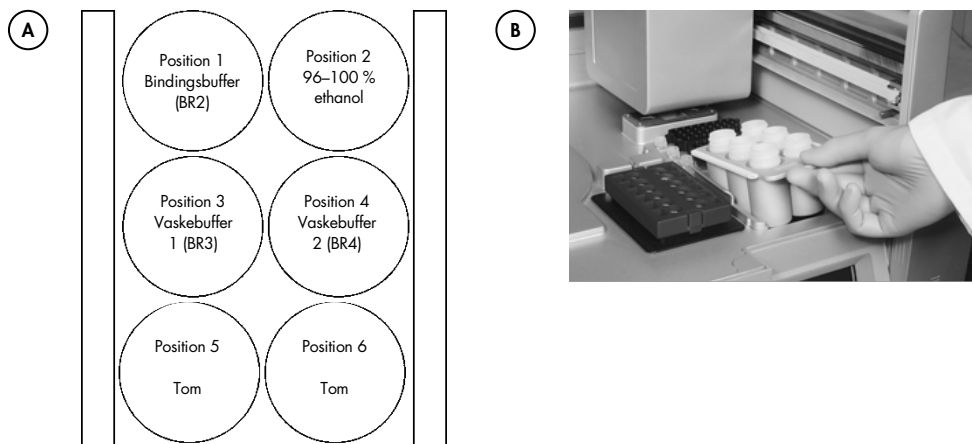


Der er tilstrækkelig buffer i PAXgene RNA Blood-kittet (50) til maksimalt 7 RNA klargøringskørsler på QIAcube, når antallet af prøver er 2 til 12 pr. kørsel. Generelt bør kørsler med et lavere antal prøver undgås, når der behandles i alt 50 prøver pr. kit med maksimalt 7 kørsler af RNA-klargøring. Mere end 7 kørsler af RNA-klargøring kan medføre, at der ikke er en tilstrækkelig buffervolumen til behandling af de sidste prøver.

**Tabel 3. Placeringer i reagensflaskeholderen**

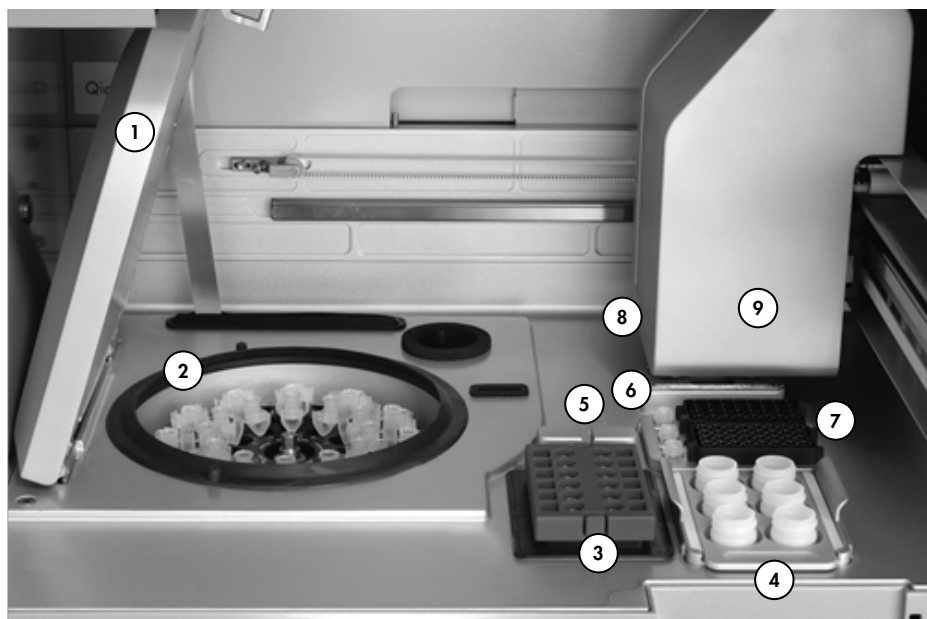
Position	Reagens
1	Bindingsbuffer (BR2)
2	96–100 % ethanol
3	Vaskebuffer 1 (BR3)
4	Vaskebuffer 2 (BR4)*
5	– (skal være tom)
6	– (skal være tom)

\* Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som koncentrat. For at fremstille en brugsklar opløsning skal der inden første brug tilsættes fire dele ethanol (96–100 %, renhedsgrad p.a.), som angivet på flaskeetiketten.



**Figur 16. Opfyldning af reagensflaskeholderen. [A]** Tegning over positioner og indhold af flaskerne i reagensflaskeholderen. **[B]** Placering af holder i QIAcube.





**Figur 17. QIAcube indeni.**

- |                       |                                                |
|-----------------------|------------------------------------------------|
| 1 Centrifugelåg       | 6 Mikrocentrifugens røråbninger                |
| 2 Centrifuge          | 7 Spidsstativ                                  |
| 3 Ryster              | 8 Bortskaffelsesåbninger til spidser og søjler |
| 4 Reagensflaskeholder | 9 Robotarm                                     |
| 5 Spidssensor         |                                                |

Spinsøjler (PRC, PSC), mikrocentrifugerør (MCT) og QIAcube-plastiktilbehør

Placer 2 spidsholdere med filterspidser på 1.000 µl på QIAcube (se figur 17, side 41).  
Genopfyld holderen med spidser, når det er nødvendigt.



Brug kun 1.000 µl-filterspidser, der er designet til brug med QIAcube.

Mærk rotoradaptere og mikrocentrifugerør (MCT) for hver prøve med en vandfast tusch.  
Åben de PAXgene Shredder-spinsøjler (PSC), der skal bruges, og klip lågene helt af med en saks (se figur 18, side 43).



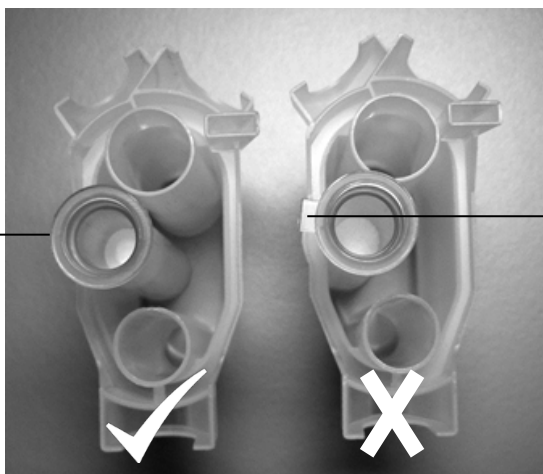
For at QIAcube robotgribearmen kan fungere korrekt, skal lågene og alle plastikdele, der forbinder låget til PAXgene Shredder-spinsøjlerne (PSC), fjernes helt (klippes af; se figur 16). Ellers kan robotgribearmen ikke få ordentligt fat i spinsøjlerne (PSC, PRC).

Placer PAXgene RNA-spinsøjlen (PRC), PAXgene Shredder-spinsøjlen (PSC, uden låg), og det markerede mikrocentrifugerør (MCT) i de korrekte positioner i hver mærket rotoradapter, som vist i tabel 4 og figur 19 (side 43).



Sørg for, at spinsøjlen (PRC) og mikrocentrifugerørets (MCT) låg er trykket helt ned til bunden af åbningerne ved kanten af rotoradapteren, ellers vil lågene gå af under centrifugering.

Søjlelåg  
fjernet  
korrekt



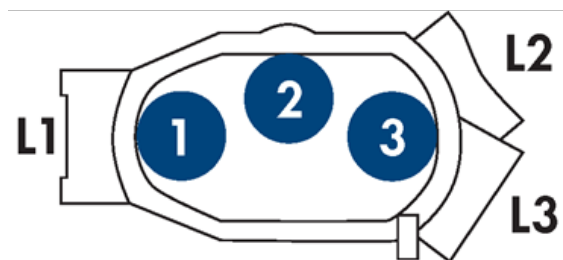
Søjlelåg  
fjernet  
ukorrekt; en  
del af låget  
er stadig  
påsat

**Figur 18. Opfyldning af PAXgene Shredder-spinsøjle (PSC).** PAXgene Shredder-spinsøjlen (PSC) er placeret i midterpositionen af rotoradapteren. Klip låget af, før søjlen (PSC) placeres.

**Tabel 4. Laboratorieartikler i rotoradapteren**

Position	Reagens	Placering af låg
1	PAXgene RNA-spinsøjle (rød, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder-spinsøjle (lilla, PSC) (klip låget af, før søjlen placeres i rotoradapteren)	–
3	Mikrocentrifugerør (MCT)*	L3

\* Brug de mikrocentrifugerør (1,5 ml, MCT), der følger med i PAXgene Blood RNA-kittet.



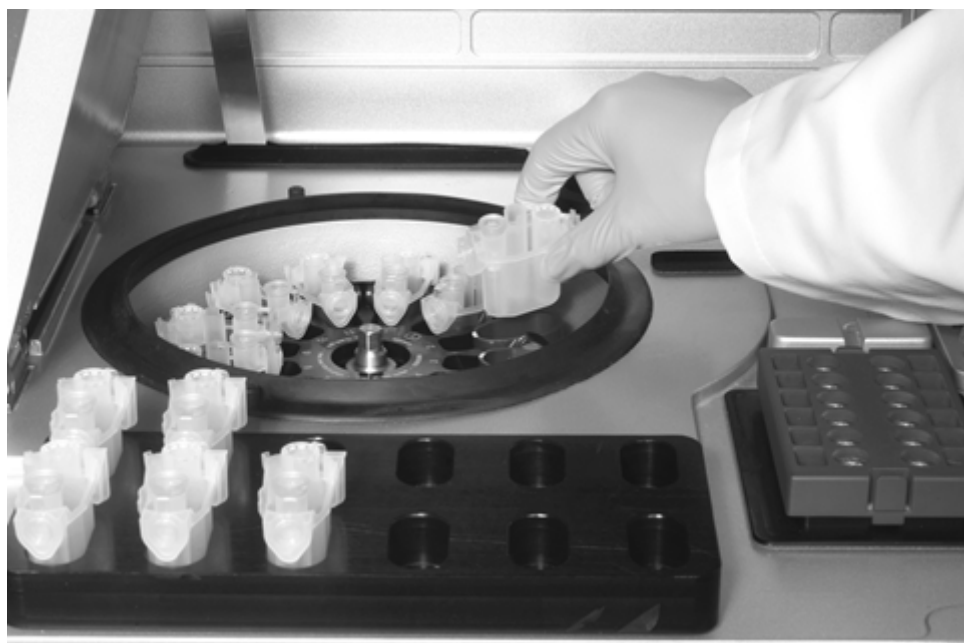
**Figur 19. Positioner i rotoradapteren.** Rotoradapteren har tre røpositioner (1–3) og tre lågpositioner (L1–L3).

## Opfyldning af centrifugen

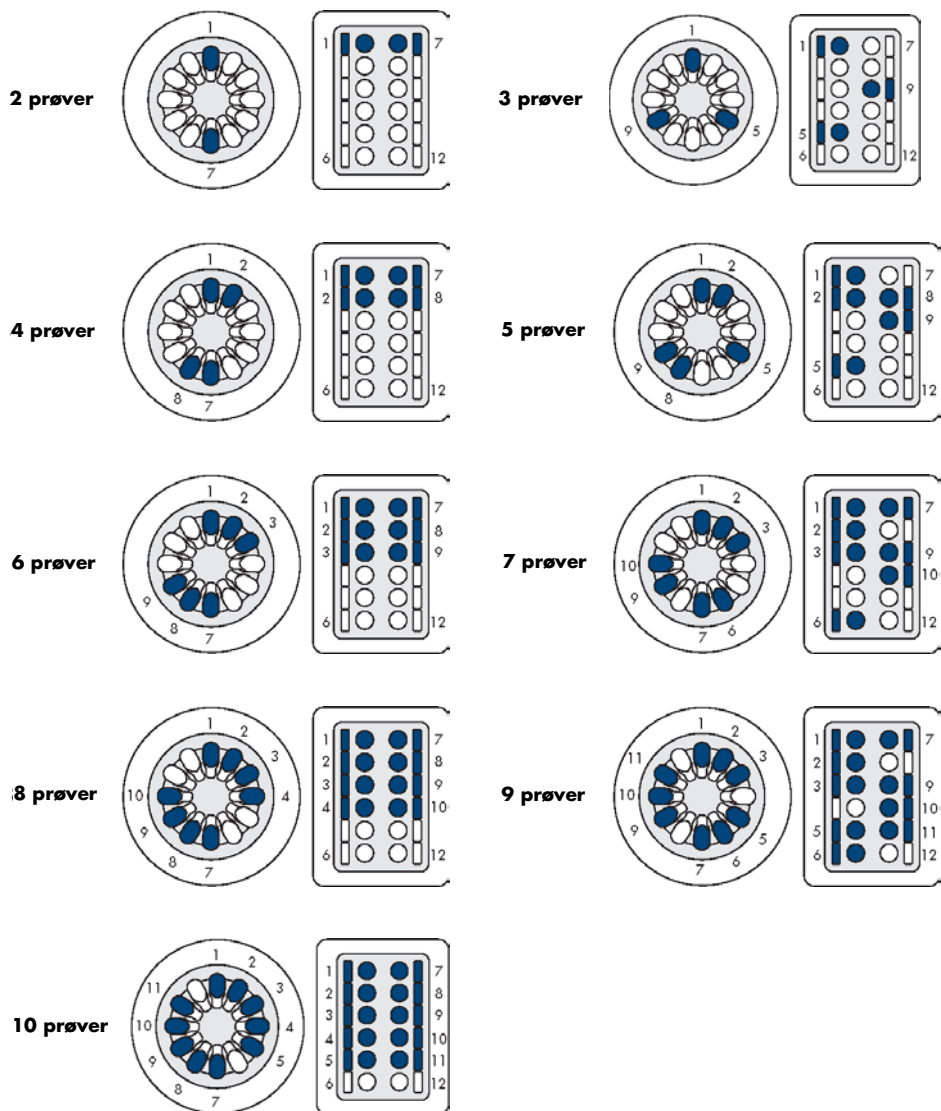
Sæt de samlede rotoradaptere i centrifugespandene som vist i figur 20 nedenfor.



Ved forarbejdning af mindre end 12 prøver skal centrifugerotoren fyldes, så den er i radial balance (se figur 21, side 45). Alle centrifugespande skal være monteret, før en protokolkørsel påbegyndes, selv hvis der skal forarbejdes mindre end 12 prøver. Det er ikke muligt at forarbejde en enkelt (én) eller 11 prøver.



**Figur 20. Opfyldning af centrifugen.** Placer de samlede rotoradaptere i centrifugespandene.



**Figur 21. Opfyldning af centrifuge og ryster.** Centrifuge- og rysterpositioner er vist for forarbejdning af to (2 prøver) til ti (10 prøver) prøver. Det er ikke muligt at forarbejde én eller 11 prøver.

## Forarbejdningsrør (PT)

Fjern alle forarbejdningsrør (PT), der stadig sidder i mikrocentrifugens røråbninger fra tidligere kørsler (se figur 17, side 41). Fyld 3 forarbejdningsrør (PT) med den mængde reagens, der er angivet i tabel 5, i overensstemmelse med antallet af prøver i kørslen.

Til DNase I inkuberingsblanding pipetteres den angivne mængde DNA-digestionsbuffer (RDD) i et forarbejdningsrør (PT), og den angivne mængde DNase I (RNFD)-stamopløsning tilsættes. Bland forsigtigt ved at pipettere hele blandingen op og ned 3 gange med en 1.000 µl pipettespids.

Brug de forarbejdningsrør på 2 ml (PT), der leveres med PAXgene Blood RNA Kit. Mærk rørene (PT) tydeligt med reagensnavne, og placer dem i de korrekte positioner i mikrocentrifugens røråbninger, som vist i tabel 6 (side 47).



DNase I (RNFD) er meget modtageligt for fysisk denaturering. Bland kun ved pipettering, hvor wide-bore-pipettespidser anvendes for at reducere forskydning. Undlad at vortexe.



Sørg for kun at pipettere den påkrævede mængde, som angivet i Tabel 5.

**Tabel 5. Den påkrævede mængde reagens i forarbejdningsrør til mikrocentrifugens røråbninger**

Antal prøver	Reagensmængde til det angivne antal prøver (µl)		
	Proteinase K (PK)	DNase I inkuberingsblanding	Elueringsbuffer (BR5)
2	126	187 (23 DNase I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNase I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNase I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNase I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNase I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNase I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNase I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNase I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNase I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNase I + 806 Buffer RDD)	1177

**Tabel 6. Mikrocentrifugens røråbninger**

	Position		
	A	B	C
<b>Indhold</b>	Proteinase K (PK)	DNase I inkuberingsblanding	Elueringsbuffer (BR5)
<b>Kar</b>	Forarbejdningsrør (PT)*	Forarbejdningsrør (PT)*	Forarbejdningsrør (PT)*

\* Brug de forarbejdningsrør på 2 ml (PT), der leveres med PAXgene Blood RNA Kit.

# Protokol: Manuel oprensning af total RNA fra humant fuldblod indsamlet i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

## Vigtige anvisninger før start

- Det skal kontrolleres, at kittets æske er ubeskadiget, og at ingen af buffer-beholderne er utætte. Beskadigede kits må ikke anvendes.
- Ved brug af pipette skal det kontrolleres, at volumenet er indstillet korrekt, og at væsken opsuges og dispenseres fuldstændigt.
- For at undgå at overføre prøver til det forkerte rør eller spinsøjle, skal det sikres, at alle rør eller spinsøjler er korrekt mærket med en vandfast tusch. Mærk låget og kroppen på hvert rør (PR, MCT). For spinsøjler mærkes kroppen af forarbejdningsrøret (PT). Luk hvert rør eller spinsøjle, når væske er blevet overført til den.
- Spild af prøve- og buffervæsker under klargøringen kan nedsætte RNAs udbytte og renhed.
- Alle protokoltrin (inklusive centrifugeringerne) skal gennemføres ved stuetemperatur (15-25 °C), medmindre andet er angivet.

På grund af nukleinsyre-amplifikationsmetodernes høje sensitivitet skal følgende forholdsregler overholdes for at undgå krydskontaminering:

- Prøver skal altid pipetteres i spinsøjlerne (PRC, PSC) uden at fugte søjlens rand.
- Udskift altid pipettespidser mellem væskeoverførsler. Brug pipettespidser med aerosol-barriere.
- Undgå at røre ved membranen i spinsøjlen (PRC, PSC) med pipettespidsen.



- Når et mikrocentrifugerør (MCT) er blandet eller opvarmet, skal det centrifugeres kortvarigt for at fjerne dråber fra lågets inderside.
- Brug handsker under hele proceduren. Skift handsker med det samme, hvis de kommer i berøring med prøven.
- Spinsøjlerne (PRC, PSC) skal lukkes, før de sættes ind i mikrocentrifugen. Centrifugeringen skal foretages som angivet i protokollen.
- Åbn kun én spinsøjle (PRC, PSC) ad gangen, og vær omhyggelig med at undgå aerosoldannelse.
- For at opnå en effektiv parallel-forarbejdning af mange prøver anbefales det at fylde en holder med forarbejdningsrør (PT), hvortil spinsøjlerne (PRC, PSC) kan overføres efter centrifugering. Bortskaf de brugte forarbejdningsrør (PT) med gennemstrømningen og placer de nye forarbejdningsrør (PT) med spinsøjlerne (PRC, PSC) direkte i mikrocentrifugen.



### Ting, der skal gøres før start

- Blod skal indsamles i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) efter anvisningerne i *PAXgene Blood RNA Tube-håndbogen*. I bilag C (på side 66) findes anbefalinger vedr. håndtering af PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Efter blodprøvetagningen skal PAXgene Blood RNA Tube (BRT) inkuberes i mindst 2 timer ved stuetemperatur for at sikre, at blodcellerne lyseres fuldstændigt. Inkubation af PAXgene Blood RNA Tube (BRT) natten over kan føre til et øget udbytte. Hvis PAXgene Blood RNA Tube (BRT) efter blodprøvetagningen blev opbevaret ved 2-8 °C, -20 °C eller -70 °C, skal røret først bringes op på stuetemperatur og derefter opbevares ved stuetemperatur i to timer, før protokollen startes.
- Læs sikkerhedsinformationerne på side 10.
- Læs retningslinierne for håndtering af RNA (bilag A, side 64).
- Sørg for, at instrumenter, såsom pipetter og rysteinkubator, regelmæssigt kontrolleres og kalibreres efter producentens anvisninger.



- En ryster-inkubator er påkrævet i trin 5 og 20. Sæt temperaturen i rysterinkubatoren til 55 °C.
- Bindingsbufferen (BR2) kan efter længere opbevaring danne bundfald. Det kan om nødvendigt opløses ved at opvarme bufferen til 37 °C.
- Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som koncentrat. For at fremstille en brugsklar opløsning skal der inden første brug tilsættes fire dele ethanol (96–100 %, renhedsgrad p.a.), som angivet på flaskeetiketten.
- Før den første brug af RNase-Free DNase Set skal der tilberedes en DNase I-stamopløsning. Opløs DNase I (RNFD; 1500 Kunitz-enheder) \* i 550 µl DNase-resuspensionsbuffer (DRB), som leveres med kittet. Sørg for, at der ikke spildes DNase I (RNFD), når hætteglasset åbnes. Den rekonstituerede DNase I (RNFD) må ikke blandes på en vortex-mixer. DNase I er meget modtageligt for fysisk denaturering. Blandingen bør kun foregå ved at vende røret forsigtigt.
- Aktuelle data viser, at rekonstitueret DNase I (RNFD) kan opbevares ved 2-8°C i op til 6 uger. Ved længere tids opbevaring af DNase I (RNFD) skal stamopløsningen fjernes fra glasflasken, og den skal deles op i portioner til enkelt-brug (brug mikrocentrifugerørrene [MC] på 1,5 ml, der blev leveret med kittet, der er nok til 5 portioner), og opbevares ved -20 °C i op til 9 måneder. Optøede portioner kan opbevares ved 2-8°C i op til 6 uger. De optøede portioner kan ikke nedfryses igen.
- Ved rekonstituering og opdeling af DNase I (RNFD) skal retningslinjerne for håndtering af RNA (bilag A, side 64) følges.

\* Kunitz-enheden er den almindeligt anvendte enhed til opmåling af DNase I, defineret som den mængde DNase I som forårsager en stigning i  $A_{260}$  på 0,001 pr. minut pr. milliliter ved 25 °C, pH 5,0, hvor der anvendes høj-polymeriseret DNA som substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 og 363).

## Procedure

1. Centrifuger PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i 10 minutter ved 3.000–5.000 x g i en udsvingsrotor.
  -  Sørg for, at blodprøverne i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) blev inkuberet i mindst 2 timer ved stuetemperatur (15–25 °C) for at opnå fuldstændig lysering af blodcellerne.
  -  Rotoren skal være udstyret med adaptere til rundbundede rør. Hvis der anvendes andre typer adaptere, kan rørene blive beskadigede under centrifugeringen.
2. Fjern supernatanten ved at dekantere eller pipettere. Tilsæt 4 ml RNase-frit vand (RNFV) til pelletet, og luk røret med en ny sekundær BD Hemogard-sikkerhedslukning (følger med kittet). Hvis supernatanten dekanteres, skal det sikres, at pelletet ikke forstyrres, og rørets kant skal tørres med en ren papirserviet.
3. Opløs pelletet med en vortex-mixer, og centrifuger i 10 minutter ved 3.000–5.000 x g med en udsvingsrotor. Fjern og bortskaf supernatanten fuldstændigt.

Små cellerester, som befinder sig i supernatanten efter vortex, men før centrifugeringen, berører ikke proceduren.

  -  Hvis supernatanten ikke fjernes fuldstændigt, bliver lyseringen hæmmet og lysatet fortyndet, hvilket har en negativ indvirkning på betingelserne for bindingen af RNA til PAXgene-membranen.
4. Tilsæt 350 µl resuspensionsbuffer (BR1), og bland på en vortex-mixer, indtil pelletet er fuldstændigt opløst.
5. Overfør prøven med en pipette til et 1,5 ml mikrocentrifugerør (MCT). Tilsæt 300 µl bindingsbuffer (BR2) og 40 µl proteinase K (PK). Bland i ca. 5 sekunder (vortex), og inkuber i 10 minutter ved 55 °C i en rysteinkubator ved en hastighed fra 400–1400 rpm. Efter inkubationen øges rysteinkubatorens temperatur til 65 °C (for trin 20).
  -  Bland ikke bindingsbuffer (BR2) og proteinase K (PK), før de tilsættes prøven.

6. Pipetter lysatet direkte ind i PAXgene Shredder-spinsøjlen (PSC, lilla), som er anbragt i et 2 ml forarbejdningsrør (PT), og centrifuger i 3 minutter ved maksimalt omdrejningstal (maks. 20.000 x g).



Overfør forsigtigt lysatet til spinsøjlen (PRC) med en pipette, og kontroller visuelt, at lysatet er fuldstændigt overført til spinsøjlen (PSC).

For at undgå en eventuel beskadigelse af spinsøjlerne (PSC) og rørene (PT), må der ikke centrifugeres ved mere end 20.000 x g.



Visse prøver kan løbe gennem PAXgene Shredder-spinsøjlen (PSC) uden centrifugering. Dette skyldes den lave viskositet i nogle prøver, og bør ikke opfattes som tegn på produktfejl.

7. Overfør forsigtigt hele supernatanten fra gennemstrømningsfraktionen til et nyt 1,5 ml mikrocentrifugerør (MCT) uden at forstyrre pelletet i forarbejdningsrøret.
8. Tilsæt 350 µl ethanol (96-100 %, renhedsgrad p. a.). Bland og centrifuger kort (1–2 sekunder ved 500–1.000 x g) for at fjerne dråber fra indersiden af rørenes låg.



Der må ikke centrifugeres længere end 1–2 sekunder, da dette eventuelt fører til pelletering af nukleinsyrer og dermed til et reduceret udbytte af total RNA.

9. Pipetter 700 µl af prøven ind i en PAXgene RNA spinsøjle (PRC, rød), som før blev puttet ind i en 2 ml Processing Tube (PT), og centrifuger i 1 minut ved 8000–20.000 x g. Overfør spinsøjlerne (PRC) i en ny 2 ml Processing Tube (PT) og forkast den benyttede Processing Tube (PT) samt gennemstrømningen.

10. Overfør resten af prøven til PAXgene RNA-spinsøjlen (PRC), og centrifuger i 1 minut ved 8.000–20.000 x g. Placer spinsøjlen (PRC) i et nyt 2 ml forarbejdningsrør (PT), og bortskaf det gamle forarbejdningsrør (PT) med gennemstrømning.



Overfør forsigtigt prøven til spinsøjlen (PRC), og kontroller visuelt at prøven er fuldstændigt overført til spinsøjlen (PRC).

11. Tilsæt 350 µl vaskebuffer 1 (BR3) til PAXgene RNA-spinsøjlen (PRC). Centrifuger i 1 minut ved 8.000–20.000 x g. Placer spinsøjlen (PRC) i et nyt 2 ml forarbejdningsrør (PT), og bortskaf det gamle forarbejdningsrør (PT) med gennemstrømning.

12. Tilsæt 10 µl DNase I (RNFD) stamopløsning til 70 µl DNA digestionsbuffer (RDD) i et 1,5 ml mikrocentrifugerør (MCT). Bland ved forsigtigt at slå med fingrene på røret og centrifuger kort for at samle væskerester fra rørets væg.

For at forarbejde f.eks. 10 prøver tilsættes 100 µl DNase I (RNFD) stamopløsning til 700 µl DNA digestionsbuffer (RDD). Anvend de 1,5 ml mikrocentrifugerør (MCT), der følger med kittet.



DNase I er meget modtageligt for fysisk denaturering. Opløsningen må kun blandes ved at slå med fingrene på røret. Undlad at vortexe.

13. Pipetter DNase I (RNDF) inkubationsblandingen (80 µl) direkte på membranen i PAXgene RNA-spinsøjlen (PRC), og lad den stå på bordet (20–30 °C) i 15 minutter.



Sørg for, at DNase I (RNDF) inkubationsblandingen kommer direkte på membranen. Hvis en del af blandingen hænger fast på væggen eller på O-ringen i spinsøjlen (PRC), vil DNase-digestionen muligvis være ufuldstændig.

14. Pipetter 350 µl vaskebuffer 1 (BR3) ind i PAXgene RNA-spinsøjlen (PRC) og centrifuger i 1 minut ved 8000–20.000 x g. Overfør spinsøjlen (PRC) i et nyt 2 ml forarbejdningsrør (PT), og bortskaf det benyttede forarbejdningsrør (PT) samt gennemstrømningen.

15. Pipetter 500 µl vaskebuffer 2 (BR4) ind i PAXgene RNA-spinsøjlen (PRC) og centrifuger i 1 minut ved 8000–20.000 x g. Overfør spinsøjlen (PRC) i et nyt 2 ml forarbejdningsrør (PT), og bortskaf det benyttede forarbejdningsrør (PT) samt gennemstrømningen.



Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som koncentrat. Sørg for, at der tilsættes ethanol til vaskebuffer 2 (BR4) før den første brug (se "Ting der skal gøres før start" på side 49).

16. Tilsæt igen 500 µl vaskebuffer 2 (BR4) til PAXgene RNA-spinsøjlen (PRC). Centrifuger i 3 minutter ved 8.000–20.000 x g.

17. Bortskaf det forarbejdningsrør (PT), der indeholder gennemstrømningen, og anbring PAXgene RNA-spinsøjlen (PRC) i et nyt 2 ml forarbejdningsrør (PT). Centrifuger i 1 minut ved 8.000–20.000 x g.

18. Bortskaf det forarbejdningsrør (PT), der indeholder gennemstrømningen. Placer PAXgene RNA-spinsøjlen (PRC) i et 1,5 ml mikrocentrifugerør (MCT), og pipetter 40 µl elueringsbuffer (BR5) direkte på membranen i PAXgene RNA-spinsøjlen (PRC).

Centrifuger i 1 minut ved 8.000–20.000 x g, for at eluere RNAen.

For at opnå en maksimal elueringseffektivitet er det vigtigt, at hele membranen fugtes med elueringsbuffer (BR5).

19. Gentag elueringstrinnet (trin 18) som beskrevet, med 40 µl elueringsbuffer (BR5) og det samme mikrocentrifugerør (MCT).

20. Inkuber eluatet i 5 minutter ved 65 °C i en rysteinkubator (se trin 5), dog uden at ryste.

Derefter køles prøverne straks med is.

Denne inkubation ved 65 °C denaturerer RNAen til downstream-applikationer.

Inkubationstiden eller –temperaturen må ikke overskrides.

21. Hvis RNA-prøverne ikke straks skal bruges, skal de opbevares ved –20 °C eller –70 °C.

Da RNAen forbliver denatureret, også efter flere ganges nedfrysning og optøning, er det ikke nødvendigt at gentage inkubationen ved 65 °C. Hvis RNA-prøverne skal bruges til en diagnostisk analyse, skal producentens angivelser overholdes.

For at få en nøjagtig RNA-quantificering ved absorbering ved 260 nm, anbefaler vi, at prøven fortyndes med 10 mM Tris-Cl, pH 7,5. \* En fortynding af prøven med RNase-frit vand kan føre til lave værdier og ringe præcision.

Nulstil spektrofotometeret med en blindprøve, der indeholder det samme forhold elueringsbuffer (BR5) og Tris-HCl-buffer som i de prøver, der skal måles. Elueringsbufferen (BR5) absorberer stærkt ved 220 nm, hvilket kan føre til for høje baggrundsabsorptionsværdier, hvis spektrofotometeret ikke er korrekt nulstillet.

**Bemærk:** Ved kvantificering i Tris-HCl-buffer bruges forholdet

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ . Se bilag B, side 65.

\* Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

# Protokol: Automatisk oprensning af total RNA fra humant fuldblod indsamlet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT)

## Vigtige anvisninger før start

- Det skal kontrolleres, at kittets æske er ubeskadiget, og at ingen af buffer-beholderne er utætte. Beskadigede kits må ikke anvendes.
- Ved brug af pipette skal det kontrolleres, at volumenet er indstillet korrekt og at væsken opsuges og dispenseres fuldstændigt.
- For at undgå at overføre prøver til de forkerte rør og plastikforbrugsvarer skal det sikres, at alle forarbejdningsrør (PT), mikrocentrifugerør (MCT) og rotoradaptere er korrekt mærket med en vandfast tusch. Mærk låget og kroppen på hvert mikrocentrifugerør (MCT), kroppen på hvert forarbejdningsrør (PT) og den ydre væg på hver rotoradapter.
- Spild af prøve- og buffervæsker under klargøringen kan nedsætte RNAs udbytte og renhed.
- Alle protokoltrin (inklusive centrifugeringerne) skal gennemføres ved stuetemperatur (15-25 °C), medmindre andet er angivet.

På grund af nukleinsyre-amplifikationsmetodernes høje sensitivitet skal følgende forholdsregler overholdes for at undgå krydskontaminering:

- Pipetter forsigtigt prøven til forarbejdningsrøret (PT) på bunden af hvert rør uden at fugte kanten af røret.
- Udskift altid pipettespidser mellem væskeoverførsler. Brug pipettespidser med aerosol-barriere.
- Undgå at røre ved membranen i spinsøjlen (PRC, PSC) med pipettespidsen.

- Når et mikrocentrifugerør (MCT) er blandet eller opvarmet, skal det centrifugeres kortvarigt for at fjerne dråber fra lågets inderside.
- Brug handsker under hele proceduren. Skift handsker med det samme, hvis de kommer i berøring med prøven.

### Ting, der skal gøres før start

- Blod skal indsamles i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) efter anvisningerne i *PAXgene Blood RNA Tube-håndbogen*. I bilag C (på side 66) findes anbefalinger vedr. håndtering af PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Efter blodprøvetagningen skal PAXgene Blood RNA Tube (BRT) inkuberes i mindst 2 timer ved stuetemperatur for at sikre, at blodcellerne lyseres fuldstændigt. Inkubation af PAXgene Blood RNA Tube (BRT) natten over kan føre til et øget udbytte. Hvis PAXgene Blood RNA Tube (BRT) efter blodprøvetagningen blev opbevaret ved 2-8 °C, -20 °C eller -70 °C, skal røret først bringes op på stuetemperatur og derefter opbevares ved stuetemperatur i to timer, før protokollen startes.
- Læs sikkerhedsinformationerne på side 10.
- Læs "Vigtige bemærkninger", side 37.
- Læs retningslinierne for håndtering af RNA (bilag A, side 64).
- Læs *QIAcube-brugervejledningen* og al yderligere information, der følger med QIAcube, og vær ekstra opmærksom på sikkerhedsinformationen.
- Sørg for, at instrumenter, såsom pipetter og QIAcube, regelmæssigt kontrolleres og kalibreres efter producentens anvisninger.
- Bindingsbufferen (BR2) kan efter længere opbevaring danne bundfald. Det kan om nødvendigt opløses ved at opvarme bufferen til 37 °C.
- Vaskebuffer 2 (BR4) leveres som koncentrat. For at fremstille en brugsklar opløsning skal der inden første brug tilsættes fire dele ethanol (96–100 %, renhedsgrad p.a.), som angivet på flaskeetiketten.



- Før den første brug af RNase-Free DNase Set skal der tilberedes en DNase I-stamopløsning. Opløs DNase I (RNFD; 1500 Kunitz-enheder)\* i 550 µl DNase-resuspensionsbuffer (DRB), som leveres med kittet. Sørg for, at der ikke spildes DNase I (RNFD), når hætteglasset åbnes. Den rekonstituerede DNase I (RNFD) må ikke blandes på en vortex-mixer. DNase I er meget modtageligt for fysisk denaturering. Blandingen bør kun foregå ved at vende røret forsigtigt.
- Aktuelle data viser, at rekonstitueret DNase I (RNFD) kan opbevares ved 2-8°C i op til 6 uger. Ved længere tids opbevaring af DNase I (RNFD) skal stamopløsningen fjernes fra glasflasken, og den skal deles op i portioner til enkelt-brug (brug mikrocentrifugerørerne [MC] på 1,5 ml, der blev leveret med kittet, der er nok til 5 portioner), og opbevares ved -20 °C i op til 9 måneder. Optøede portioner kan opbevares ved 2-8°C i op til 6 uger. De optøede portioner kan ikke nedfryses igen.
- Ved rekonstituering og opdeling af DNase I (RNFD) skal retningslinjerne for håndtering af RNA (bilag A, side 64) følges.
- Monter den korrekte rysteadapter (følger med QIAcube; brug adapteren til 2 ml sikkerhedsrør, markeret med "2"), og placer rysteholderen ovenpå adapteren.
- Kontroller affaldsskuffen, og tøm den hvis det er nødvendigt.
- Installer protokollerne, hvis de ikke allerede er installeret ved tidligere kørsler. Installer begge protokollerne "PAXgene Blood RNA Part A" og "PAXgene Blood RNA Part B". Se "Installation af protokoller på QIAcube", side 37.

\* Kunitz-enheden er den almindeligt anvendte enhed til opmåling af DNase I, defineret som den mængde DNase I som forårsager en stigning i  $A_{260}$  på 0,001 pr. minut pr. milliliter ved 25 °C, pH 5,0, hvor der anvendes høj-polymeriseret DNA som substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 og 363).

## Procedure

1. Luk døren på QIAcube, og tænd for QIAcube med strømkontakten (se figur 15, side 38).

Der lyder et bip, og opstartsskærmen vises. Instrumentet udfører automatisk opstartstest.

2. Åbn døren til QIAcube, og placer de nødvendige reagenser og plastiktillbehør i QIAcube. Se "Opfyldning af QIAcube", side 39.

For at spare tid kan opfyldningen udføres under en eller begge de 10 minutters centrifugetrin (trin 3 og 5).

3. Centrifuger PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i 10 minutter ved 3.000–5.000 x g i en udsvingsrotor.



Sørg for, at blodprøverne i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) blev inkuberet i mindst 2 timer ved stuetemperatur (15–25 °C) for at opnå fuldstændig lysering af blodcellerne.



Rotoren skal være udstyret med adaptore til rundbundede rør. Hvis der anvendes andre typer adaptore, kan rørene blive beskadigede under centrifugeringen.

4. Fjern supernatanten ved at dekantere eller pipettere. Tilsæt 4 ml RNase-frit vand (RNFW) til pelletet, og luk røret med en ny sekundær BD Hemogard-sikkerhedslukning (følger med kittet).

Hvis supernatanten dekanteres, skal det sikres, at pelletet ikke forstyrres, og rørets kant skal tørres med en ren papirserviet.

5. Opløs pelletet med en vortex-mixer, og centrifuger i 10 minutter ved 3.000–5.000 x g med en udsvingsrotor. Fjern og bortskaf supernatanten fuldstændigt.

Små cellerester, som befinder sig i supernatanten efter vortex, men før centrifugeringen, berører ikke proceduren.



Hvis supernatanten ikke fjernes fuldstændigt, bliver lyseringen hæmmet og lysatet fortyndet, hvilket har en negativ indvirkning på betingelserne for bindingen af RNA til PAXgene-membranen.

6. Tilsæt 350 µl resuspensionsbuffer (BR1), og bland på en vortex-mixer, indtil pelletet er fuldstændigt opløst.

7. Overfør prøven med en pipette til et 2 ml forarbejdningsrør (PT).



Brug de forarbejdningsrør på 2 ml (PT), der leveres med PAXgene Blood RNA Kit.

8. Placer de åbne forarbejdningsrør (PT) med prøverne i QIAcube-rysteren (se figur 17, side 41). Prøvepositionerne har numre, så den er nemmere at fylde. Sæt rysterholderpropper (følger med QIAcube) i pladserne ved kanten af rysterholderen, ved siden af hvert forarbejdningsrør. Dette tillader detektion af prøver under opfyldningskontrol.



Sørg for, at den korrekte rysteradapter (rysteradapter, 2 ml, sikkerhedsrør, markeret med "2", følger med QIAcube) er installeret.



Ved forarbejdning af mindre end 12 prøver skal rysterholderen fyldes som vist i figur 21, side 45. Det er ikke muligt at forarbejde én eller 11 prøver.

9. Luk QIAcube-instrumentets dør (se figur 15, side 38).

10. Vælg protokollen "PAXgene Blood RNA Part A", og start den.

Følg instruktionerne på QIAcube-berøringskærmen.



Sørg for, at begge programdele (del A og del B) er installeret på QIAcube-instrumentet (se "Installation af protokoller på QIAcube", side 37).



QIAcube vil udføre opfyldningskontrol for prøver, spidser, rotoradaptere og reagensflasker.

11. Når protokollen "PAXgene Blood RNA Part A" er færdig, åbnes QIAcube-instrumentets dør (se figur 15, side 38). Fjern og bortskaf PAXgene RNA-spinsøjlerne (PRC) fra rotoradapterne, og de tomme forarbejdningsrør (PT) fra rysteren.



Under kørslen overføres spinsøjlerne fra rotoradapterposition 1 (lågposition L1) til rotoradapterposition 3 (lågposition L2) af instrumentet (se figur 19, side 43).

12. Luk lågene på alle 1,5 ml mikrocentrifugerør (MCT), der indeholder den oprensede RNA i rotoradapterne (position 3, lågposition L3, se figur 19, side 43). Overfør 1,5 ml mikrocentrifugerørene (MCT) til QIAcube rysteradapteren (se figur 17, side 41).

13. Luk QIAcube-instrumentets dør (se figur 15, side 38).

14. Vælg protokollen "PAXgene Blood RNA Part B", og start den.

Følg instruktionerne på QIAcube-berøringsskærmen.



Dette program inkuberer prøverne ved 65 °C og denaturerer RNA'en til downstream-applikationer. Dette trin må ikke udelades, selv hvis downstream-applikationen inkluderer et varmedenatureringstrin. Tilstrækkelig RNA-denaturering er yderst vigtig for maksimal effektivitet ved downstream-applikationer.

15. Når protokollen "PAXgene Blood RNA Part B" er færdig, åbnes QIAcube-instrumentets dør (se figur 15, side 38). Placer straks mikrocentrifugerørerne (MCT) med den oprensede RNA på is.



ADVARSEL: Varm overflade. Varmesystemets temperatur kan nå op på 70 °C. Undgå berøring, når den er varm.



Efterlad ikke den oprensede RNA i QIAcube. Da prøverne ikke er afkølede, kan den oprensede RNA nedbrydes. Ubemandede kørsler natten over kan derfor ikke anbefales.

16. Hvis RNA-prøverne ikke straks skal bruges, skal de opbevares ved –20 °C eller –70 °C.

Da RNA'en forbliver denatureret efter gentagen frysning og optøning, er det ikke nødvendigt at gentage varmeinkuberingsprotokollen ("PAXgene Blood RNA Part B"). Hvis RNA-prøverne skal bruges til en diagnostisk analyse, skal producentens angivelser overholdes.

For at få en nøjagtig RNA-kvantificering ved absorbering ved 260 nm, anbefaler vi, at prøven fortyndes i 10 mM Tris-Cl, pH 7,5. \* En fortynding af prøven med RNase-frit vand kan føre til lave værdier og ringe præcision.

Nulstil spektrofotometeret med en blindprøve, der indeholder det samme forhold elueringsbuffer (BR5) og Tris-HCl-buffer som i de prøver, der skal måles.

\* Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

Elueringsbufferen (BR5) absorberer stærkt ved 220 nm, hvilket kan føre til for høje baggrundsabsorptionsværdier, hvis spektrofotometeret ikke er korrekt nulstillet.



Ved kvantificering i Tris-HCl-buffer bruges forholdet

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ } \mu\text{g/ml}$ . Se bilag B, side 65.

17. Fjern reagensflaskeholderen fra QIAcube arbejdsbordet (se figur 17, side 41), og luk alle flasker med de korrekt mærkede låg. Buffer i flasker kan opbevares ved stuetemperatur (15–25 °C) i op til 3 måneder. Fjern, og bortskaf resterende reagenser i forarbejdningsrørene (PT) i QIAcube mikrocentrifugens røråbninger (se figur 17, side 41). Fjern, og bortskaf rotoradaptere fra centrifugen (se figur 17, side 41). Tøm QIAcube affaldsskuffen (se figur 15, side 38). Luk QIAcube-instrumentets dør, og sluk for instrumentet med strømkontakten (se figur 15, side 38).

# Fejlfindingsvejledning

Denne fejlfindingsvejledning kan være nyttig til at afhjælpe eventuelle problemer. For yderligere information henvises også til siden "Frequently Asked Questions" (Hyppigt stillede spørgsmål) hos vores Technical Support Center: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Derudover svarer personalet fra QIAGENs tekniske service gerne på spørgsmål vedrørende informationen og protokollerne i denne håndbog eller prøve- og analyseteknologier (kontaktinformation: se sidste side, eller besøg [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Kommentarer og forslag

---

### RNA er nedbrudt

RNase-kontaminering



Vær forsigtig med ikke at tilføre RNaser til reagenserne under proceduren eller ved senere håndtering (se bilag A, side 64).

### Lavt RNA-udbytte

a) Mindre end 2,5 ml blod, der er indsamlet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



Sørg for, at der indsamles 2,5 ml i PAXgene Blood RNA Tube (BRT; se *PAXgene Blood RNA Tube-håndbog*).

b) RNA-koncentrationen målt i vand



RNA skal fortyndes i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5\* for at få en nøjagtig kvantifikation (se bilag B, side 65).



c) Der blev overført cellerester til PAXgene RNA-spinsøjlen (PRC) i trin 9 og 10 af den manuelle protokol





Undgå at overføre større partikler, når super- natanten pipetteres efter trin 7 i den manuelle protokol (små cellerester indskrænker dog ikke præparationen).

\* Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

## Kommentarer og forslag

- |                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| d) Supernatanten blev ikke fuldstændigt fjernet i trin 3                                   |  Sørg for, at supernatanten fjernes fuldstændigt. Hvis supernatanten dekanteres, skal dråber på randen af PAXgene Blood RNA Tube (BRT) fjernes ved hjælp af en papirserviet. Overhold rimelige forholdsregler for at undgå krydskontaminering. |
| e) Efter indsamlingen i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) inkuberes blodet i mindre end 2 timer |  Efter indsamling skal blodet inkuberes i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i mindst 2 timer.                                                                                                                                                       |

### Lav $A_{260}/A_{280}$ -værdi

- |                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Vand, der bruges til at fortynde RNA til måling af $A_{260}/A_{280}$ |  Brug 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 til at fortynde RNA, før renheden måles* (se bilag B, side 65).                                                                                                                                                                                                                                           |
| b) Spektrofotometeret er ikke korrekt nulstillet                        |  Nulstil spektrofotometeret med en blindprøve, der indeholder det samme forhold elueringsbuffer (BR5) og 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, som i de prøver, der skal måles. Elueringsbufferen (BR5) absorberer stærkt ved 220 nm, hvilket kan føre til for høje baggrundsabsorptionsværdier, hvis spektrofotometeret ikke er korrekt nulstillet. |

### Fejlfunktion i instrumentet

- |                               |                                                                                                                                                                                            |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| QIAcube fungerer ikke korrekt | Læs <i>QIAcube-brugervejledningen</i> , og vær især opmærksom på afsnittet om fejlfinding. Sørg for, at QIAcube vedligeholdes korrekt, som beskrevet i <i>QIAcube-brugervejledningen</i> . |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

\* 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.

# Bilag A: Generelle bemærkninger om håndtering af RNA

## Håndtering af RNA



Ribonukleaser (RNase) er meget stabile og aktive enzymer, som normalt ikke kræver kofaktorer, for at være aktive. RNaser er svære at deaktivere og selv små mængder er nok til at nedbryde RNA. Derfor må der ikke anvendes laboratoriematerialer af glas eller plastik uden først at eliminere en eventuel RNase-kontaminering. Vær meget forsigtig med ikke utilsigtet at introducere RNaser til RNA-prøven under eller efter oprensningsproceduren. For at skabe og bevare et RNase-fri miljø, når der arbejdes med RNA, skal visse forholdsregler overholdes under forbehandling og brug af engangs- og flegangsbeholdere og opløsninger.

## Generel håndtering



Arbejdet med RNA skal altid følge principperne for korrekt mikrobiologisk og aseptisk arbejdsteknik. Hænder og støvpartikler kan bære bakterier og skimmelsvampe og leverer dermed den hyppigste årsag til RNase-kontaminering. Derfor skal der altid bæres latex- eller vinylhandsker, når der arbejdes med reagenser eller RNA-prøver, for at undgå RNase-kontaminering via huden eller fra støvet laboratorieudstyr. Skift laboratoriehandskerne hyppigt, og hold rørene lukket, når det er muligt. Lad den oprensede RNA forblive på is, når den opdeles til downstream-applikationer.

Protokoller til fjernelse af RNase-kontaminering fra glasmaterialer og opløsninger findes i almene molekylærbiologiske metodebøger såsom Sambrook, J. og Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.



# Bilag B: Kvantificering og kvalitetsbestemmelse for total RNA

## Kvantificering af RNA

Koncentrationen af RNA kan bestemmes ved at måle absorptionen ved 260 nm ( $A_{260}$ ) i et spektrofotometer. For at sikre signifikans bør aflæsninger være i det lineære område på spektrofotometeret. Absorption af 1 enhed ved 260 nm svarer til 44 µg DNA pr. ml ( $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$ ). Denne relation er kun gyldig for målinger i 10 mM Tris-HCl, \* pH 7,5. Det er derfor nødvendigt at fortynde RNA-prøven, hvilket skal gøres i 10 mM Tris-Cl. Som oplyst længere nede (se afsnit „renhed af RNA“ på side 66) er forholdet af absorptionsværdierne ved 260 nm og 280 nm en måleenhed for renheden af RNA. Sørg for, at kyvetterne, som bruges til måling af RNA-prøverne, er RNase-frie. Nulstil spektrofotometeret med en blindprøve, der indeholder det samme forhold elueringsbuffer (BR5) og Tris-HCl-buffer som i de prøver, der skal måles. Elueringsbufferen (BR5) absorberer stærkt ved 220 nm, hvilket kan føre til for høje baggrundsabsorptionsværdier, hvis spektrofotometeret ikke er korrekt nulstillet. Nedenfor vises et eksempel på beregning af RNA-kvantificering.

Volumen af RNA-prøven	=	80 µl
Fortynding (1/15)	=	10 µl RNA-prøve + 140 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Absorptionsmåling af den fortyndede prøve i en kyvette (RNase-fri).		
$A_{260}$	=	0,3
Koncentration af-prøve	=	$44 \times A_{260} \times \text{fortyndingsfaktoren}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 µg/ml
Samlet udbytte	=	koncentration x prøvevolumen i milliliter
	=	$198 \text{ µg/ml} \times 0,08 \text{ ml}$
	=	15,8 µg RNA

\* Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

## Renhed af RNA

Forholdet mellem læsninger ved 260 nm og 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) anslår renheden af RNA i forhold til urenheder, der absorberes i UV, såsom proteiner.  $A_{260}/A_{280}$ -forholdet påvirkes dog meget af pH. Ved relativt lave pH-værdier er  $A_{260}/A_{280}$ -forholdet og sensitiviteten reduceret over for proteinkontamination.\* Det anbefales at måle absorptionsforholdet i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, når der er behov for nøjagtige værdier. Ren RNA har et  $A_{260}/A_{280}$ -forhold på 1,8–2,2 i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Nulstil spektrofotometeret med en blindprøve, der indeholder det samme forhold elueringsbuffer (BR5) og Tris-HCl-buffer som i de prøver, der skal måles. Elueringsbufferen (BR5) absorberer stærkt ved 220 nm, hvilket kan føre til for høje baggrundsabsorptionsværdier, hvis spektrofotometeret ikke er korrekt nulstillet.

## Appendiks C: Håndtering af PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



De følgende anbefalinger fra BD kan hjælpe ved håndtering af PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Se *PAXgene Blood RNA Tube-håndbog* for at læse yderligere oplysninger om PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

### Instruktioner til fjernelse af BD Hemogard-lukningen

1. Tag PAXgene Blood RNA Tube (BRT) med den ene hånd, og anbring tommelfingeren direkte under BD Hemogard-lukningen. (Der kan opnås mere stabilitet, hvis underarmen placeres på en fast overflade). Med den anden hånd drejes BD Hemogard-lukningen, mens der samtidigt trykkes opad med tommelfingeren, men KUN INDTIL PROPPEN I RØRET LØSNER SIG.

\* 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.

2. Fjern tommelfingeren, før lukningen fjernes. Tryk IKKE lukningen af PAXgene Blood RNA Tube (BRT) med tommelfingeren. Advarsel: Hvis PAXgene Blood RNA Tube (BRT) indeholder blod, kan der være en potentiel infektionsfare. For at undgå skader under fjernelse af lukningen er det vigtigt at fjerne tommelfingeren, som lukningen trykkes op med, fra PAXgene Blood RNA Tube (BRT), så snart BD Hemogard-lukningen har løsnet sig.
3. Løft lukningen af PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Det er usandsynligt, at plastikkappen kan løsne sig fra gummiproppen, men PRØV IKKE AT SAMLE LUKNINGEN IGEN, hvis det skulle ske. Fjern gummiproppen forsigtigt fra PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

### **Anvisninger for indføring af den sekundære BD Hemogard-sikkerhedslukning**

1. Udskift lukningen af PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Drej og tryk nedad, indtil proppen er på plads igen. Proppen skal trykkes helt ind, for at PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kan håndteres sikkert.

# Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene-spinsøjler, 50 PAXgene Shredder-spinsøjler, forarbejdningsrør, RNase-fri DNase I, RNase-fri reagenser og buffere. Til anvendelse sammen med PAXgene Blood RNA Tube	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 rør til blodindsamling	762165
<b>Relaterede produkter, der kan bestilles fra QIAGEN</b>		
Starter Pack, QIAcube	Pakningen indeholder: reagensflaskeholdere (3); mærkningsstrips til holder (8); 200 µl filterspidser (1024); 1.000 µl filterspidser (1024); 1.000 µl filterspidser, wide-bore (1024); 30 ml reagensflasker (18); rotoradaptore (240); rotoradapterholder	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Sterile engangsfilterspidser i holder	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Reagensflasker (30 ml) med låg; pakke med 6; til brug med QIAcube reagensflaskeholderen	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	Til 240 præparater: 240 engangsrotoradaptore; til brug med QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Holder med plads til 6 x 30 ml reagensflasker på QIAcube arbejdsbordet	990390

Rotor Adapter Holder	Holder til 12 engangsrotoradaptere; til brug med QIAcube	990392
----------------------	----------------------------------------------------------	--------

### Relaterede produkter, der kan bestilles fra BD\*

Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 21G, 0,75" (0,8 x 19 mm nål), 12" (305 mm) slange med luer-adapter; 50 pr. æske, 200 pr. kasse	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Kasse, kun til 13 mm og 16 mm diameter; 1.000/kasse	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm 4,0 ml træk med rød BD Hemogard-lukning og papiretiket; 100/æske, 1.000/kasse	368975

\* Disse produkter er typiske tilbehørsartikler for blodtapning, som kan anvendes sammen med PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Der findes mere information om dette tilbehør, inklusiv om hvordan man bestiller, på [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

For opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle PreAnalytiX eller QIAGEN kit-håndbog eller -brugervejledning. PreAnalytiX- og QIAGEN kit-håndbøger og -brugermanualer kan fås via [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) og [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) eller kan rekvireres fra PreAnalytiX's tekniske service.

# Revisionshistorik for håndbogen

Dokument og revision	Ændringer	Dato
HB-0101-004, R2	Ændringer, som følger ændringer i GHS-regler, udført i hele dokumentet.	Juni 2015
HB-0101-005, R3	Ny skabelon, opdateringer af data i automatisk protokol og i præstationsdata; opdatering af sikkerhedsoplysninger, som følger ændringer i GHS-regler, ændringer i instrumentoplysninger og i erklæring om begrænsninger i produktets anvendelse.	Februar 2019
HB-0101-006, R3	Rettelse af kitnavn på side 5 i kitindholdstabellen.	Januar 2020

## PreAnalytiX Worldwide

### PreAnalytiX-produkter forhandles af QIAGEN- og BD-virksomheder

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 8000 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**

