

Januar 2020

PAXgene® Blood RNA Kit Handbuch

Version 2

R3 **MAT** 1120409DE

IVD



50 (Katalognr. 762174)

REF

762174

CE



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Erstellt von der QIAGEN GmbH für PreAnalytiX

 **PreAnalytiX**

A QIAGEN / BD Company

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

Die PAXgene Blood RNA Kits sind nicht in allen Ländern erhältlich; fragen Sie bitte nach.

Eingeschränkter Lizenzvertrag

Mit Gebrauch dieses Produkts erkennt der Käufer oder Anwender des PAXgene Blood RNA Kits die folgenden Vertragsbedingungen an:

1. Der PAXgene Blood RNA Kit darf nur gemäß den Angaben im *PAXgene Blood RNA Kit Handbuch* und mit den im Kit enthaltenen Komponenten verwendet werden. PreAnalytiX erteilt keinerlei Lizenz, die durch gewerbliche Eigentumsrechte geschützten Komponenten in diesem Kit in Kombination mit anderen Komponenten, die nicht Bestandteil des Kits sind, zu verwenden, mit Ausnahme der Anwendungen, die im *PAXgene Blood RNA Kit Handbuch* und in weiteren Protokollen, die unter www.preanalytix.com erhältlich sind, beschrieben sind.
2. Mit Ausnahme der ausdrücklich genannten Lizenzen übernimmt PreAnalytiX keine Garantie, dass dieses Kit und/oder seine Verwendung(en) keine Rechte Dritter verletzen.
3. Dieses Kit und seine Komponenten sind für den einmaligen Gebrauch lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, aufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. Mit Ausnahme der ausdrücklich angegebenen Lizenzen erkennt PreAnalytiX keine anderen genannten oder implizierten Lizenzen an.
5. Käufer und Nutzer des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen oder solche erleichtern könnten.
6. PreAnalytiX kann die in diesem eingeschränkten Lizenzvertrag genannten Verbote vor jedem Gericht durchsetzen und wird für sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, die ihr bei der Durchsetzung dieses eingeschränkten Lizenzvertrags oder ihrer geistigen Eigentumsrechte in Bezug auf dieses Kit und/oder seine Komponenten entstehen, Schadenersatz fordern.

Aktualisierte Lizenzbedingungen finden Sie unter www.preanalytix.com.

Verkauf unter Vorbehalt

Das vorliegende Produkt wird mit einer Lizenz unter bestimmten Ansprüchen der Patente US 7,270,953 und US 7,682,790 sowie EP 1820793 B1 und Äquivalente dieser Patentansprüche anderer Länder ausgeliefert, das Produkt zum Verarbeiten des Nukleinsäure-Komplex zu verwenden, der bei der Probennahme in einem PAXgene Blood RNA Tube ausgebildet wird.

HB-0101-006 BD-8945 1120409 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, alle Rechte vorbehalten.

PreAnalytiX Company
PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse
CH – 8634 Hombrechtikon
Schweiz
www.preanalytix.com

PreAnalytiX Distributoren

Die PreAnalytiX Produkte werden von QIAGEN oder BD für PreAnalytiX hergestellt und werden von QIAGEN oder BD für PreAnalytiX vertrieben. Die Produkte können nicht bei PreAnalytiX GmbH bestellt werden.

Die Kontaktdaten Ihres lokalen PreAnalytiX Distributors finden Sie auf der letzten Seite.

Inhalt

Kit-Inhalt	5
Symbole	7
Lagerungsbedingungen	8
Verwendungszweck	9
Anwendungseinschränkungen	9
Qualitätskontrolle.....	10
Technischer Service.....	10
Sicherheitshinweise	10
Einleitung.....	14
Prinzip und Anwendung	14
Probennahme und Stabilisierung	15
RNA-Konzentration und Aufreinigung.....	20
Manuelle RNA-Aufreinigung	20
Automatische RNA-Aufreinigung.....	30
Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien.....	36
Wichtige Hinweise.....	38
Hinweise zur Bedienung des QIAcube	38
Einschalten des QIAcube.....	38
Installation von Protokollen auf dem QIAcube	38
Beladen des QIAcube	40
Protokoll: Manuelle Aufreinigung von Gesamt-RNA aus humanem Vollblut, das in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen wurde	49

Protokoll: Automatische Aufreinigung von Gesamt-RNA aus humanem Vollblut, das in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen wurde.....	56
Hilfe zur Fehlerbehebung.....	63
Anhang A: Allgemeine Hinweise zur Handhabung von RNA	65
Anhang B: Quantifizierung und Qualitätsbestimmung der Gesamt-RNA	66
Anhang C: Handhabung der PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	67
Bestellinformationen	69
Bearbeitungsverlauf des Handbuchs.....	71

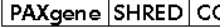

Kit-Inhalt

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Katalog-Nr.			762174
Anzahl der Präparationen			50
BR1	Resuspension Buffer (Resuspendierungspuffer)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Bindungspuffer) *	BIND BUF	18 ml
BR3	Waschpuffer 1 *	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) (Waschpuffer 2, Konzentrat) †	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Elutionspuffer)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-free Water (bottle) (RNase-freies Wasser, Flasche)	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (grüner Deckel)	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (PAXgene RNA-Spinsäulen, rot)	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (Reaktionsröhrchen) (2 ml)	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures (Secondary BD Hemogard™ Deckel)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (1.5 ml) (Mikrozentrifugenröhrchen, 1,5 ml)	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNase I, RNase-frei, lyophilisiert)	DNA REM	1.500 Kunitz-Einheiten ‡
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (DNA-Verdaupuffer, weißer Deckel)	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (DNase-Resuspendierungspuffer, Röhrchen, lila Deckel)	DNase RES BUF	2 ml

*Nicht mit Desinfektionsmitteln in Kontakt bringen, die Bleiche enthalten. Enthält ein Guanidinsalz. Auf Seite 10 finden Sie weitere Sicherheitshinweise.

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

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

PAXgene Blood RNA Kit		(50)	
Katalog-Nr.		762174	
Anzahl der Präparationen		50	
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (Homogenisier-Spinsäulen) (lila)		5 × 10
Handbuch	PAXgene Blood RNA Kit Handbuch (Version 2)		1

Symbole



Kit enthält Reagenzien für <N> Tests.



Gebrauchsanweisung beachten



Verfallsdatum



In-vitro-Diagnostikum



Katalognummer



Chargennummer



Materialnummer



Komponenten



Anzahl



Sterilisierung durch UV-Bestrahlung



Kunitz-Einheiten



Hinzugeben



Enthält











Rekonstituiert



Doxyribonuclease I



Ethanol

GITC	Guanidinisothiocyanat
RNase-Free DNase Set	RNase-Free DNase Set
GTIN	Global Trade Item Number (GTIN)
	Nicht wiederverwenden
	Zulässiger Temperaturbereich
	Obere Temperaturgrenze
	Hersteller
	Wichtiger Hinweis
	Notieren Sie das aktuelle Datum nach Ethanol-Zugabe in die Flasche
	Nach Lieferung
	Führt zu

Lagerungsbedingungen

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

Der RNase-freie DNase-Satz, der DNase I (RNFD), DNA-Verdaupuffer (RDD) und DNase-Resuspendierungspuffer (DRB) enthält, wird bei Raumtemperatur versandt. Lagern Sie alle Komponenten des RNase-freien DNase-Satzes sofort nach Lieferung bei der auf dem Etikett

angegebenen Temperatur. Bei ordnungsgemäßer Lagerung unter diesen Bedingungen sind die Kits bis zum Haltbarkeitsdatum, das auf der Kit-Verpackung angegeben ist, haltbar.

Verwendungszweck

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

Die in diesem Handbuch angegebene Leistungscharakteristik des PAXgene Blood RNA Systems gilt nur für FOS- und IL1B-Gentranskripte. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, entsprechende Leistungscharakteristiken des PAXgene Blood RNA Systems für andere Zieltranskripte zu erstellen.

Anwendungseinschränkungen

Das PAXgene Blood RNA Kit ist zur Aufreinigung von intrazellulärer RNA aus humanem Vollblut ($4,8 \times 10^6$ bis $1,1 \times 10^7$ Leukozyten/ml) für Anwendungen im Rahmen der In-vitro-Diagnostik vorgesehen. Er dient nicht für die Aufreinigung genomischer DNA oder viraler Nukleinsäuren aus humanem Vollblut. Da nur eine begrenzte Anzahl Transkripte für die Stabilisierungsspezifikationen validiert wurde (FOS- und IL1B-Gentranskripte), kann nicht für alle Transkripte eine Leistungscharakteristik angegeben werden. Das Laborpersonal muss die Angaben des Herstellers und eigene Daten prüfen, um zu bestimmen, ob eine Validierung für andere Transkripte notwendig ist.

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

Qualitätskontrolle

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

Technischer Service

Der Technische Service von QIAGEN garantiert dank seiner hohen Qualität und Verfügbarkeit eine einzigartige Unterstützung unserer Kunden. Hier stehen Ihnen erfahrene Wissenschaftler für Ihre Fragen zu PreAnalytiX Produkten gerne zur Verfügung. Bitte wenden Sie sich an uns, wenn Sie Fragen zum PAXgene Blood RNA Kit haben.

Für technische Hinweise und weitere Informationen wenden Sie sich bitte an den Technischen Service von QIAGEN.

Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und eine Schutzbrille.

Tragen Sie beim Umgang mit biologischen und chemischen Materialien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Handschuhe und eine Schutzbrille, um das Risiko einer Infektion (z. B. mit HIV- oder Hepatitis-B-Viren) oder einer Verletzung zu minimieren. Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (SDS). Diese sind im

praktischen und kompakten PDF-Format online verfügbar unter www.PreAnalytiX.com, wo Sie die SDS zu diesem Kit finden, einsehen und ausdrucken können.

ACHTUNG



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

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

Die RNA-Stabilisierungslösung und die Blutflüssigkeit aus dem PAXgene Blood RNA Tube (BRT) können mit 1 Volumenteil Industriebleichelösung (5 % Natriumhypochlorit) auf 9 Volumenteile RNA-Stabilisierungslösung bzw. Blutflüssigkeit desinfiziert werden.

Probenvorbereitungsabfall, beispielsweise Überstände nach Zentrifugierschritten während der RNA-Aufreinigung, müssen stets als potenziell infektiös angesehen werden. Abfälle müssen daher vor der Entsorgung autoklaviert oder verbrannt werden, um infektiöses Material zu zerstören. Beachten Sie bei der Entsorgung die gültigen Vorschriften und Richtlinien.

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

Puffer BR2



Enthält: Guanidinisoithiocyanat. Gefahr! Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut oder beim Einatmen. Verursacht schwere Augenschäden. Schädlich für Wasserorganismen mit langfristigen Auswirkungen. Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

Puffer BR3



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

DNase I



Enthält: DNase. Gefahr! Kann allergische Hautreaktionen verursachen. Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen. Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dämpfen/Aerosol vermeiden. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Atemschutz tragen. Bei Exposition oder falls betroffen: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. Die betroffene Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.

Proteinase K



Enthält: Proteinase K. Gefahr! Verursacht leichte Hautreizungen. Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen. Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dämpfen/Aerosol vermeiden. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Atemschutz tragen. Bei Exposition oder falls betroffen: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. Die betroffene Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.

Einleitung

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

Prinzip und Anwendung

PreAnalytiX hat ein neues System entwickelt, das Entnahme, Stabilisierung, Lagerung und Transport menschlicher Vollblutproben ermöglicht und zugleich ein schnelles und effizientes Protokoll zur Aufreinigung intrazellulärer RNA bereitstellt. Das System besteht aus den PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; US-Patente 6,602,718 und 6,617,170) zur Blutentnahme und gleichzeitigen RNA-Stabilisierung und dem PAXgene Blood RNA Kit, mit dem anschließend eine manuelle oder automatische RNA-Aufreinigung durchgeführt wird. Sowohl das manuelle als auch das automatische Protokoll stellen eine vergleichbare Leistung in Bezug auf RNA-Qualität und -Ausbeute bereit. Die Leistungsdaten für das manuelle Protokoll (siehe Seite 23–30) und für das automatische Protokoll (siehe Seite 33–35) sind in diesem Handbuch enthalten.

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

Probennahme und Stabilisierung

Die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) enthalten eine proprietäre Reagenzzusammensetzung basierend auf einer patentierten RNA-Stabilisierungstechnik. Diese Reagenzzusammensetzung schützt RNA-Moleküle vor Abbau durch RNasen und minimiert ex-vivo-Veränderungen der Genexpression. Die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) sind für die Entnahme von humanem Vollblut und die Stabilisierung zellulärer RNA für bis zu 3 Tage bei 18 bis 25 °C (siehe Abbildung 1 und 2 auf Seite 16 und 17) oder für bis zu 5 Tage bei 2 bis 8 °C vorgesehen (Abbildung 3 und 4 auf Seite 18 und 19). Die zurzeit verfügbaren Daten zeigen, dass bei –20 °C oder –70 °C die Stabilisierung zellulärer RNA für mindestens 11 Jahre möglich ist.* Weitere Informationen über laufende Studien zur Evaluierung noch längerer Stabilisierungszeiten erhalten Sie beim Technischen Service von QIAGEN.

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

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

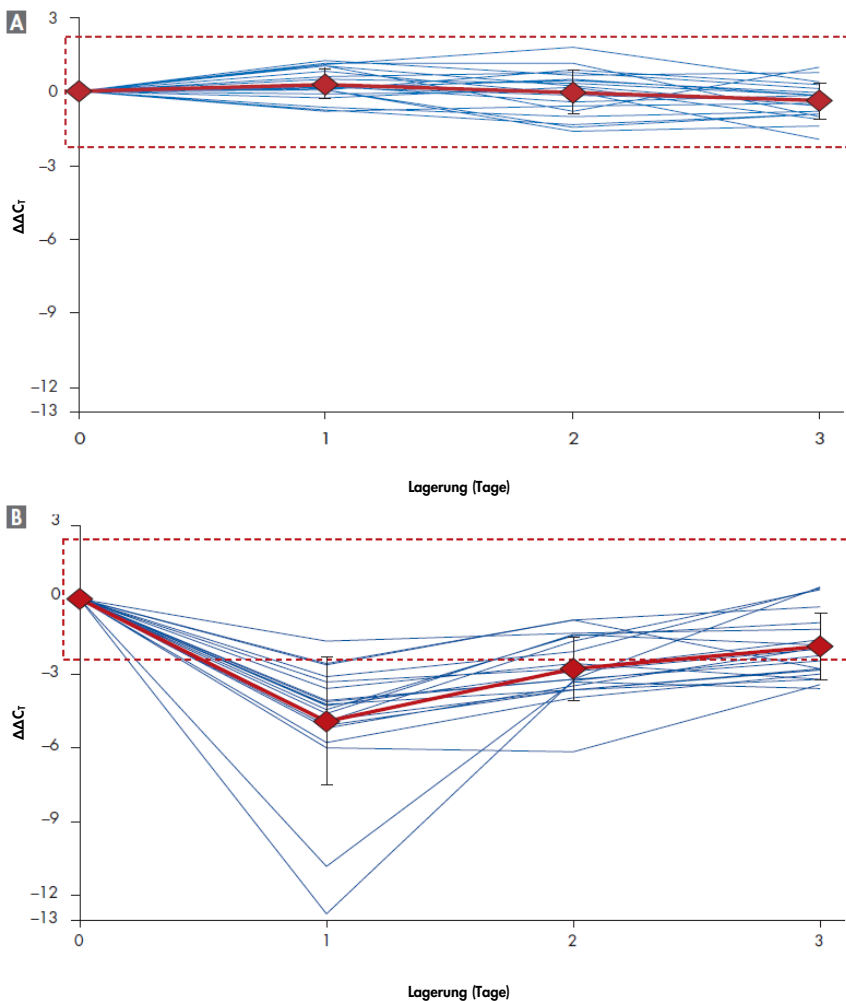


Abbildung 1: RNA-Stabilität in Blutproben bei 18 bis 25 °C: FOS. 10 Spendern wurden jeweils zwei Blutproben entnommen, die bei 18 bis 25 °C für die angegebene Anzahl von Tagen gelagert wurden, bevor die Gesamt-RNA aufgereinigt wurde. **[A]** Blutentnahme und Lagerung erfolgten in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), und die Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Blutentnahme und Lagerung erfolgten in Standard-Blutentnahmeröhrchen mit EDTA als Antikoagulans, und die Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte mit einem organischen Standard-Extraktionsverfahren mit Silica-Membran-basierter RNA-Aufreinigung. Die relativen FOS-Transkriptkonzentrationen wurden mittels Echtzeit-Duplex-RT-PCR unter Verwendung von 18S-rRNA als internem Standard bestimmt. Die Werte für alle Proben sind aufgetragen, wobei Mittelwerte und Standardabweichungen aller Proben gezeigt werden. Die unterbrochenen Linien geben den $\pm 3\times$ -Bereich der Gesamtpräzision des Assays (2,34 C_t) an.

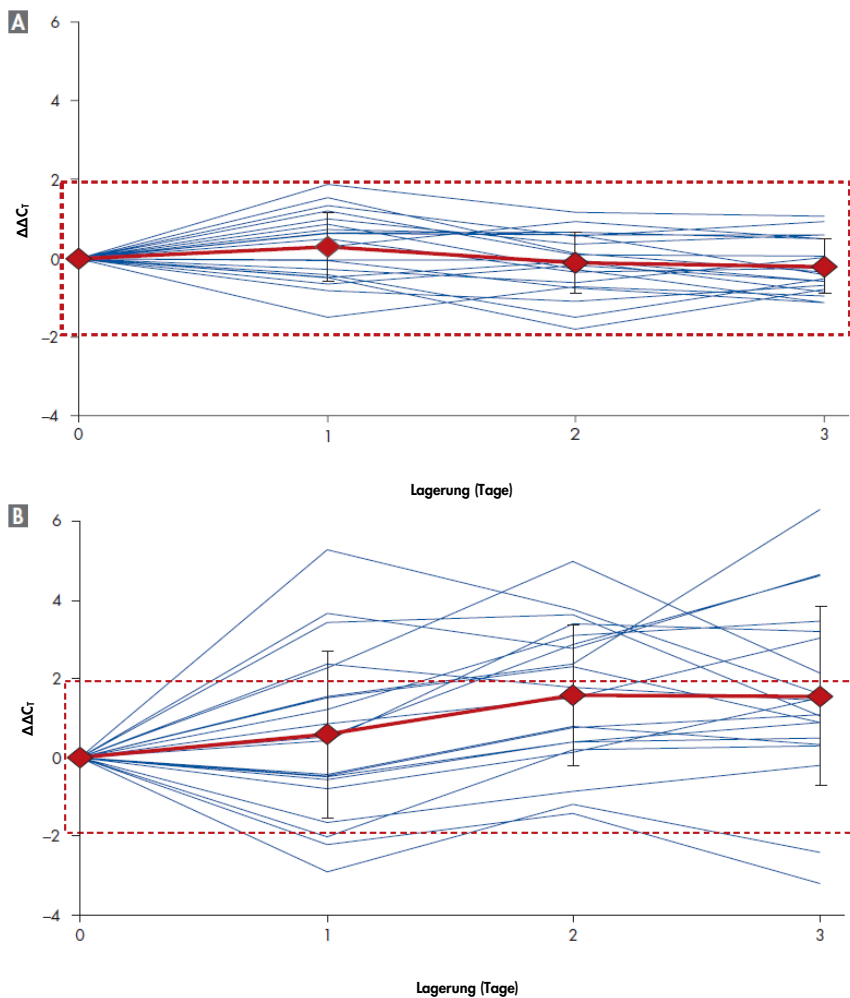


Abbildung 2: RNA-Stabilität in Blutproben bei 18 bis 25 °C: IL1B. Die Blutentnahme und Gesamt-RNA-Aufreinigung nach Lagerung bei 18 bis 25 °C erfolgten wie in Abbildung 1 beschrieben. Die relativen IL1B-Transkriptkonzentrationen wurden mittels Echtzeit-Duplex-RT-PCR unter Verwendung von 18S-rRNA als internem Standard bestimmt. Die Werte für alle Proben sind aufgetragen, wobei Mittelwerte und Standardabweichungen aller Proben gezeigt werden. Die unterbrochenen Linien geben den $\pm 3 \times$ -Bereich der Gesamtpräzision des Assays (1,93 C_t) an.

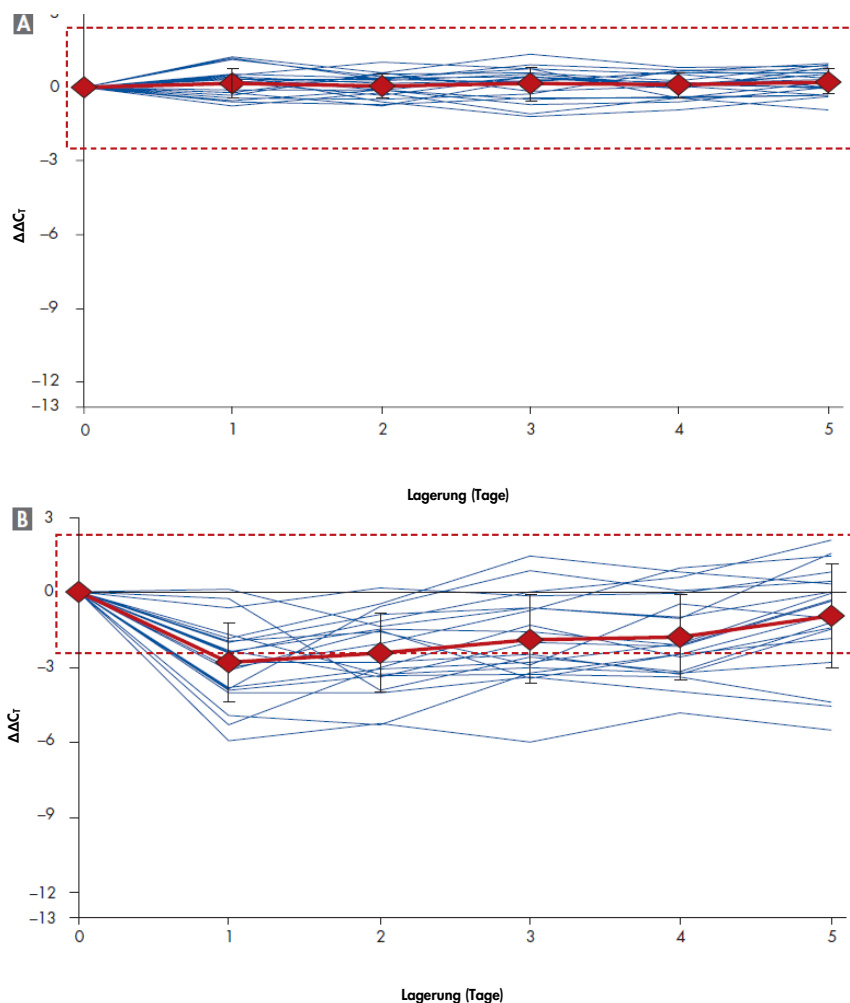


Abbildung 3: RNA-Stabilität in Blutproben bei 2 bis 8 °C: FOS. 10 Spendern wurden jeweils zwei Blutproben entnommen, die bei 2 bis 8 °C für die angegebene Anzahl von Tagen gelagert wurden, bevor die Gesamt-RNA aufgereinigt wurde. **[A]** Blutentnahme und Lagerung erfolgten in PAXgene Blood RNA Tubes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

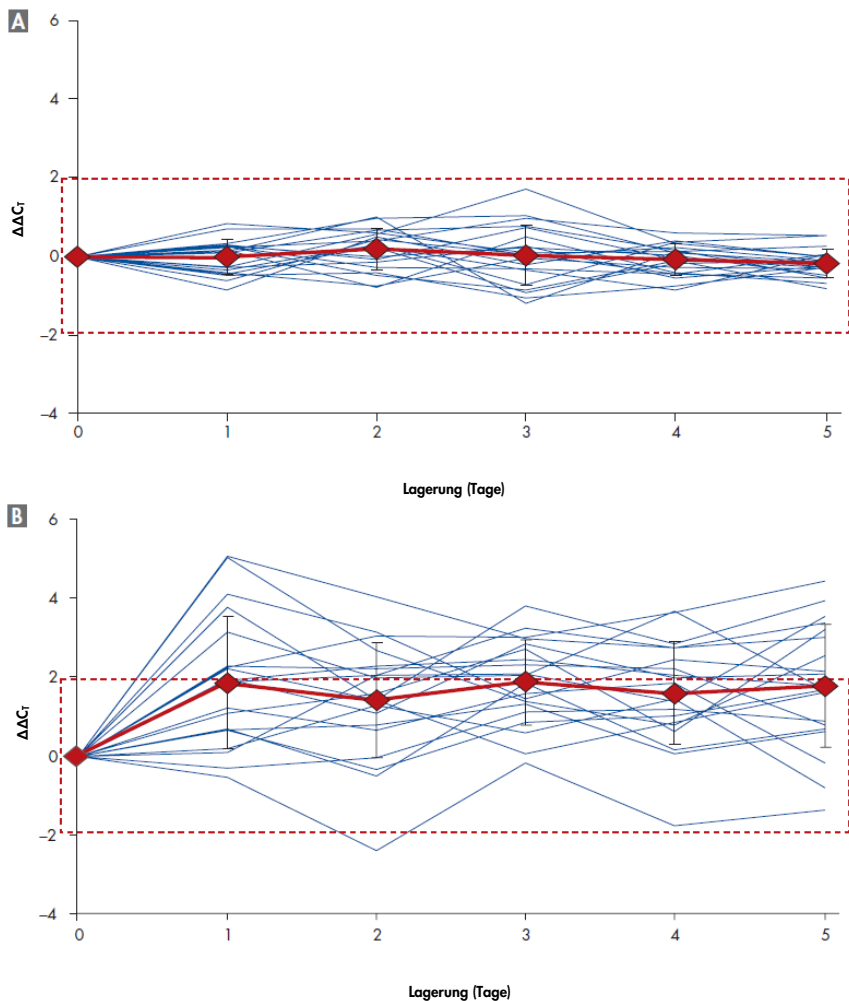


Abbildung 4: RNA-Stabilität in Blutproben bei 2 bis 8 °C: IL1B. Die Blutentnahme und Gesamt-RNA-Aufreinigung nach Lagerung bei 2 bis 8 °C erfolgten wie in Abbildung 3 beschrieben. Die relativen IL1B-Transkriptkonzentrationen wurden mittels Echtzeit-Duplex-RT-PCR unter Verwendung von 18S-rRNA als internem Standard bestimmt. Die Werte für alle Proben sind aufgetragen, wobei Mittelwerte und Standardabweichungen aller Proben gezeigt werden. Die unterbrochenen Linien geben den $\pm 3 \times$ -Bereich der Gesamtpräzision des Assays ($1,93 C_t$) an.

RNA-Konzentration und Aufreinigung

Das PAXgene Blood RNA Kit ist für die Aufreinigung von Gesamt-RNA aus 2,5 ml humanem Vollblut vorgesehen, das in einem PAXgene Blood RNA Tube (BRT) entnommen wurde. Das Verfahren ist einfach und kann mit dem manuellen oder dem automatischen Verfahren durchgeführt werden (siehe Abbildung 5 und 10, Seite 21 und 31). Bei beiden Protokollen beginnt die Aufreinigung mit einem Zentrifugierschritt, um die Nukleinsäuren in dem PAXgene Blood RNA Tube (BRT) zu pelletieren. Das Pellet wird dann gewaschen und resuspendiert, anschließend erfolgt die manuelle oder automatische RNA-Aufreinigung. Im Prinzip folgen beide Protokollen denselben Protokollschritten mit denselben Kit-Komponenten.

Manuelle RNA-Aufreinigung

Im Einzelnen wird das resuspendierte Pellet zunächst in optimierten Puffern mit Proteinase K (PK) inkubiert, um Proteine zu verdauen. Ein weiteres Zentrifugieren durch eine PAXgene Shredder Spinsäule (Homogenisier-Spinsäule) (PSC) dient dem Homogenisieren des Zelllysats und dem Entfernen restlicher Zelltrümmer. Der Überstand der Durchflussfraktion wird in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Mit dem dann zugegebenen Ethanol werden optimale Bindungsbedingungen eingestellt, und das Lysat wird auf eine PAXgene RNA Spinsäule (PRC) gegeben. Während einem kurzen Zentrifugieren bindet RNA selektiv an die PAXgene Silica-Membran, während Kontaminationen passieren. Restliche Kontaminationen werden in mehreren effizienten Waschschritten entfernt. Zwischen dem ersten und dem zweiten Waschschrift wird die Membran mit DNase I (RNFD) behandelt, um Spuren gebundener DNA zu entfernen. Nach den Waschschritten wird die RNA in Elutionspuffer (BR5) eluiert und durch Hitze denaturiert.

Die mit dem PAXgene Blood RNA System aufgereinigte Gesamt-RNA ist rein. Bei Anwendung des manuellen Verfahrens liegen die A_{260}/A_{280} -Werte zwischen 1,8 und 2,2 und in ≥ 95 % aller Proben ist genomische DNA in einem Anteil ≤ 1 % (w/w) vorhanden, wie durch quantitative Echtzeit-PCR einer Sequenz des Beta-Actin-Gens gemessen wurde. Bei Verwendung von bis zu 30 % des Eluats zeigten mindestens 95 % der Proben keine Inhibition bei der RT-PCR.

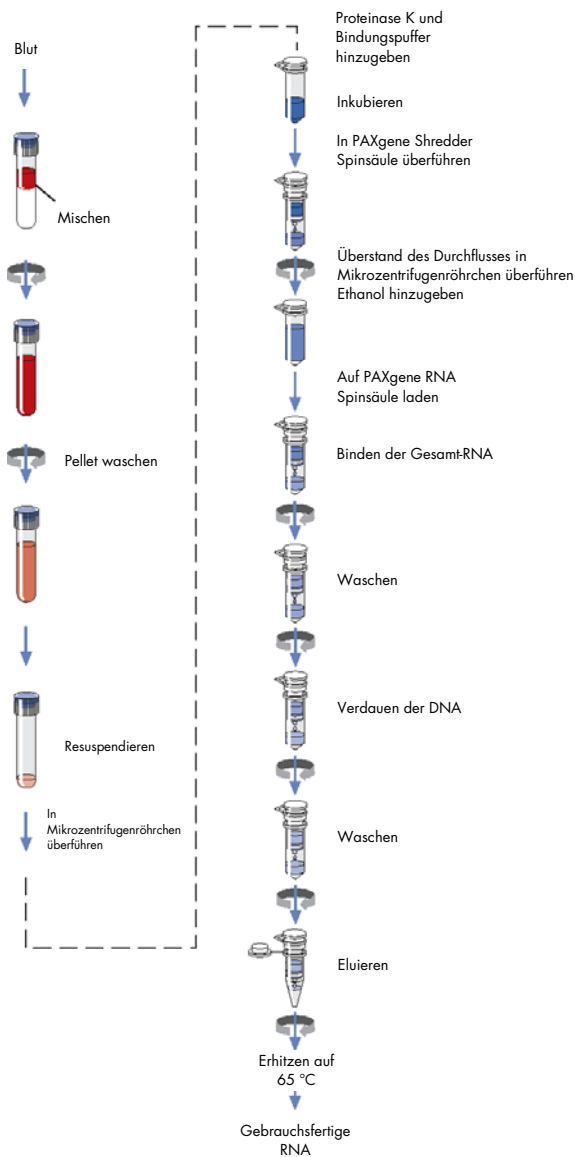


Abbildung 5: Das manuelle PAXgene Blood RNA Verfahren

Bei dem manuellen Protokoll beträgt die durchschnittliche Probenvorbereitungszeit (auf der Basis der Daten von 12 Probenverarbeitungsdurchgängen) etwa 90 Minuten*, wobei die reine Handhabungszeit nur 40 Minuten beträgt. Bei ≥ 95 % der verarbeiteten Proben wird eine RNA-Ausbeute von ≥ 3 μg aus 2,5 ml Vollblut gesunder Probanden erzielt. Da die Ausbeuten stark vom Probanden abhängen, kann die individuelle Ausbeute variieren. Für individuelle Probanden liefert das PAXgene Blood RNA System hochreproduzierbare und wiederholbare Ausbeuten (siehe Abbildung 6 und 7 auf Seite 23 und 24) sowie eine reproduzierbare und wiederholbare RT-PCR (siehe Abbildung 8 und 9 auf Seite 28 und 29), so dass es für klinische diagnostische Tests hochrobust ist.

Abbildung 6 (Seite 23) zeigt die Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit des PAXgene Blood RNA Systems. Es wurden weitere Studien durchgeführt, um den Einfluss verschiedener Chargen der PAXgene Blood RNA Kits und verschiedener Laboranten auf die Reproduzierbarkeit der RNA-Ausbeute und der Leistung der Echtzeit-RT-PCR zu zeigen. Da für diese Studien gepoolte Blutproben und keine individuellen PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) verwendet wurden, spiegeln die Ergebnisse nicht die Systemwiederholbarkeit wider, die auch Variationen zwischen individuellen Blutentnahmen umfasst, sondern lediglich die Wiederholbarkeit der Probenvorbereitung (siehe Abbildung 7 auf Seite 24).

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

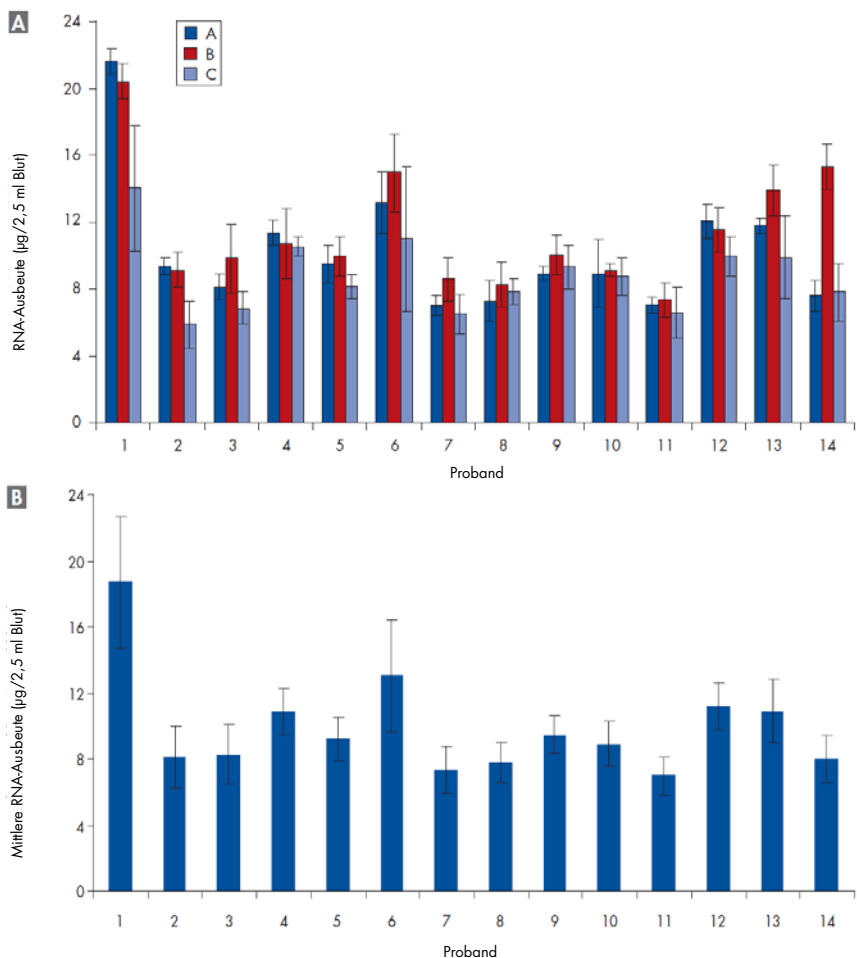


Abbildung 6: Reproduzierbare und wiederholbare RNA-Aufreinigung. Vierfachbestimmungen der Blutproben von 14 Probanden wurden jeweils von 3 Laboranten (A, B, C) manuell durchgeführt. Dabei wurden drei verschiedene Gerätesätze verwendet, wobei alle Proben von einem einzelnen Laboranten mit demselben Gerätesatz vorbereitet wurden. **[A]** Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der RNA-Ausbeute der Replikatproben von denselben Probanden und verschiedenen Laboranten. **[B]** Zwölf Replikatblutproben von jedem der 14 Probanden wurden von den 3 Laboranten verarbeitet. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der RNA-Ausbeute der Proben von denselben Probanden und allen Laboranten. Bei allen RNA-Proben lagen die A_{260}/A_{280} -Verhältnisse im Bereich von 1,8 bis 2,2.

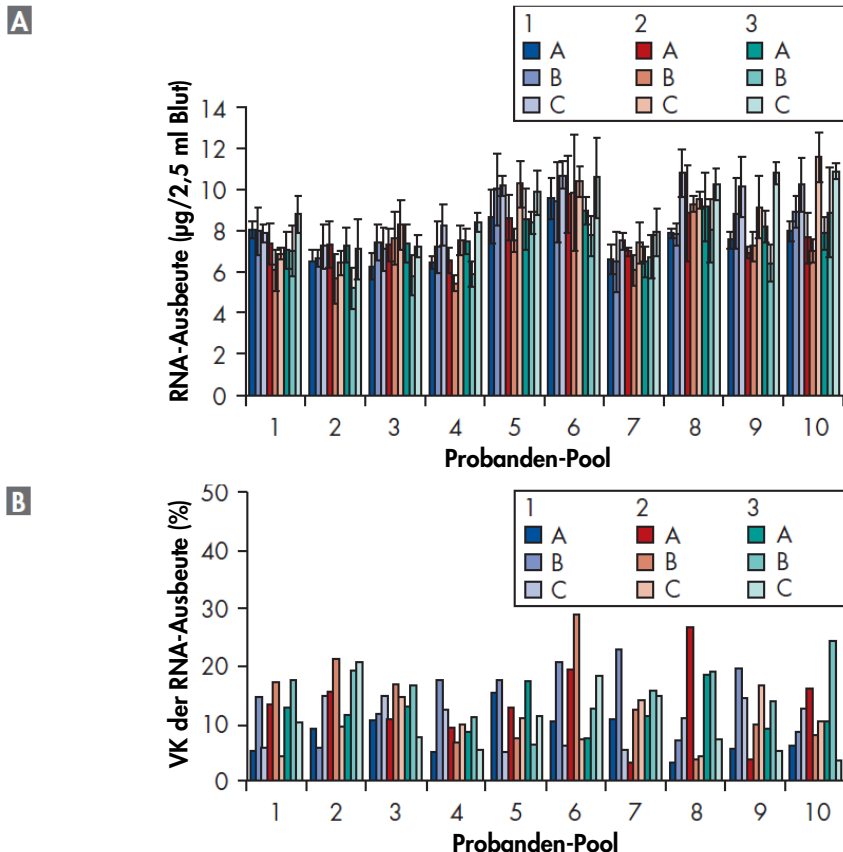


Abbildung 7: Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit der RNA-Ausbeute bei verschiedenen Laboranten und verschiedenen Chargen des PAXgene Blood RNA Kits unter Verwendung gepoolter Blutproben. Blutproben von 30 Probanden wurden in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen (12 Röhrchen pro Proband, d. h. insgesamt 360 Röhrchen). Die Inhalte aller Röhrchen von jeweils 3 Probanden wurden gepoolt und anschließend wieder auf 36 Proben aliquotiert. Diese 36 Proben pro 3-Probanden-Pool wurden von 3 verschiedenen Laboranten manuell verarbeitet. Jeder Laborant verwendete PAXgene Blood RNA Kits aus 3 verschiedenen Chargen für die Aufreinigung und verarbeitete vier Replikatproben aus jedem der 10 Probanden-Pools. **[A]** RNA-Ausbeute und Standardabweichung für alle Kombinationen aus Laborant und Charge. Vier Replikatblutproben aus 10 Probanden-Pools wurden von 3 Laboranten (A, B und C) mit jeder von 3 Chargen des Kits (1, 2 und 3) verarbeitet. Die mittleren Ausbeuten (Säulen) und Standardabweichungen (Fehlerbalken) jeder der vier Replikatproben aus demselben Probanden-Pool für verschiedene Laboranten und Chargen des Kits sind dargestellt. **[B]** Variationskoeffizient (VK) der RNA-Ausbeute pro Probanden-Pool für alle Kombinationen aus Laborant und Charge (A, B und C; 1, 2 und 3), wie berechnet aus den in Abbildung 7A gezeigten mittleren Ausbeuten und Standardabweichungen.

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

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

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

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

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

Datenkombinationen	Probanden-Pool 1 5,1 x 10 ⁶ Zellen/ml			Probanden-Pool 6 6,5 x 10 ⁶ Zellen/ml		
	Mittlere Ausbeute (µg)	SA (µg)	VK (%)	Mittlere Ausbeute (µg)	SA (µg)	VK (%)
Charge 1, alle Laboranten	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Charge 2, alle Laboranten	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Charge 3, alle Laboranten	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Datenkombinationen	Probanden-Pool 9 8,4 x 10 ⁶ Zellen/ml			Probanden-Pool 10 10,2 x 10 ⁶ Zellen/ml		
	Mittlere Ausbeute (µg)	SA (µg)	VK (%)	Mittlere Ausbeute (µg)	SA (µg)	VK (%)
Charge 1, alle Laboranten	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Charge 2, alle Laboranten	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Charge 3, alle Laboranten	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

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

Datenkombinationen	Probanden-Pool 1 5,1 x 10 ⁶ Zellen/ml			Probanden-Pool 6 6,5 x 10 ⁶ Zellen/ml		
	Mittlere Ausbeute (µg)	SA (µg)	VK (%)	Mittlere Ausbeute (µg)	SA (µg)	VK (%)
Charge 1, alle Laboranten	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
Datenkombinationen	Probanden-Pool 9 8,4 x 10 ⁶ Zellen/ml			Probanden-Pool 10 10,2 x 10 ⁶ Zellen/ml		
	Mittlere Ausbeute (µg)	SA (µg)	VK (%)	Mittlere Ausbeute (µg)	SA (µg)	VK (%)
Charge 1, alle Laboranten	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Detaillierte Analyse von vier repräsentativen Probanden-Pools. Die Pools wurden nach Zellenzahl der Leukozyten ausgewählt und spiegeln die oberen, mittleren und unteren Werte des Normalbereichs der Leukozytenzahlen wider (4,8 x 10⁶ bis 1,1 x 10⁷ Leukozyten/ml). Die Leukozytenzahl ist der Mittelwert von 3 Leukozytenzahlen der drei Probanden jedes Probanden-Pools.

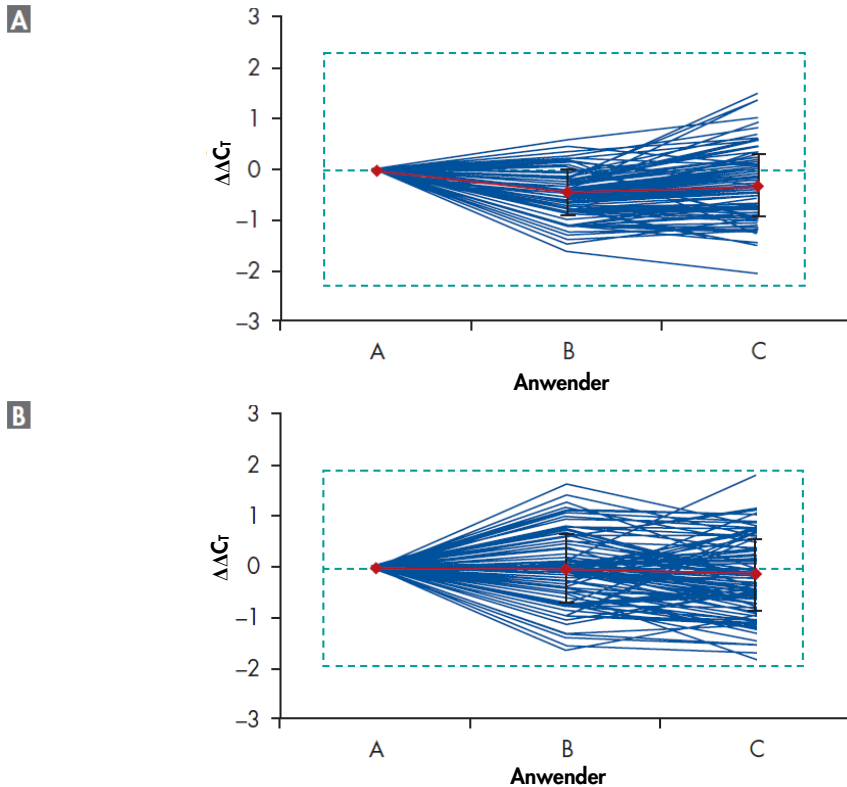


Abbildung 8: Reproduzierbarkeit der RT-PCR – zwischen Anwendern. Die bei dem in Abbildung 7 beschriebenen Experiment aufgereinigte RNA wurde für Echtzeit-RT-PCR verwendet. Die relativen Transkriptkonzentrationen von **[A]** FOS und **[B]** IL1B wurden durch Echtzeit-Duplex-RT-PCR unter Verwendung von 18S-rRNA als internem Standard bestimmt. Aufgetragen sind die Werte aller Proben relativ zu den Werten für Laborant 1 (10 Probanden-Pools x 3 Kit-Chargen x 4 Replikate = 120 Datensätze für jedes Gen) mit Mittelwerten (rote Linien) und Standardabweichungen (schwarze Balken) für alle Proben. Die unterbrochenen Linien geben den $\pm 3x$ -Bereich der Gesamtpräzision der Assays (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

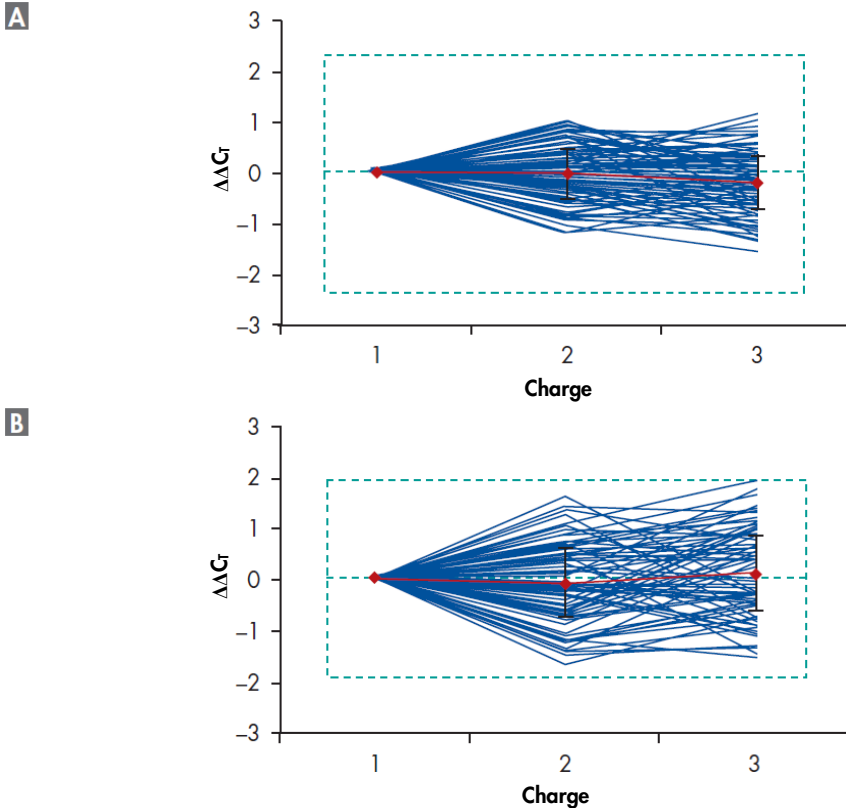


Abbildung 9: Reproduzierbarkeit der RT-PCR – zwischen Kit-Chargen. Die bei dem in Abbildung 7 beschriebenen Experiment aufgereinigte RNA wurde für Echtzeit-RT-PCR verwendet. Die relativen Transkriptkonzentrationen von **[A]** FOS und **[B]** IL1B wurden durch Echtzeit-Duplex-RT-PCR unter Verwendung von 18S-rRNA als internem Standard bestimmt. Aufgetragen sind die Werte aller Proben relativ zu den Werten für Kit-Charge 1 (10 Probanden-Pools x 3 Laboranten x 4 Replikate = 120 Datensätze für jedes Gen) mit Mittelwerten (rote Linien) und Standardabweichungen (schwarze Balken) für alle Proben. Die unterbrochenen Linien geben den $\pm 3x$ -Bereich der Gesamtpräzision der Assays (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).

Tabelle 2. Zusammenfassung der RT-PCR-Daten aus Abbildung 8 und 9

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

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

Charge: Chargennummer des für diese verwendeten Kits.

SD: Standardabweichung.

Gezeigt sind die mittleren $\Delta\Delta C_T$ -Werte (N = 120) und die Standardabweichungen für die in der Abbildung 8 und 9 dargestellten Daten.

Automatische RNA-Aufreinigung

Die Probenvorbereitung wird automatisch auf dem QIAcube® Gerät (Kat.-Nr. 9001882 [110 V], Kat.-Nr. 9001293 [230 V]; ohne QIAcube Connect) durchgeführt und beinhaltet dieselben Schritte wie das manuelle Verfahren, sodass Sie weiterhin das PAXgene Blood RNA Kit zur Aufreinigung von hochwertiger RNA verwenden können. Ausführliche Informationen über den QIAcube finden Sie im *QIAcube Benutzerhandbuch (QIAcube User Manual)* und www.qiagen.com/MyQIAcube.

Das automatische RNA-Aufreinigungsprotokoll besteht aus 2 Teilen (oder Protokollen), dem „PAXgene Blood RNA Part A“ und dem „PAXgene Blood RNA Part B“, mit einem kurzen manuellen Arbeitsschritt zwischen den beiden Teilen (siehe Abbildung 10, Seite 31).

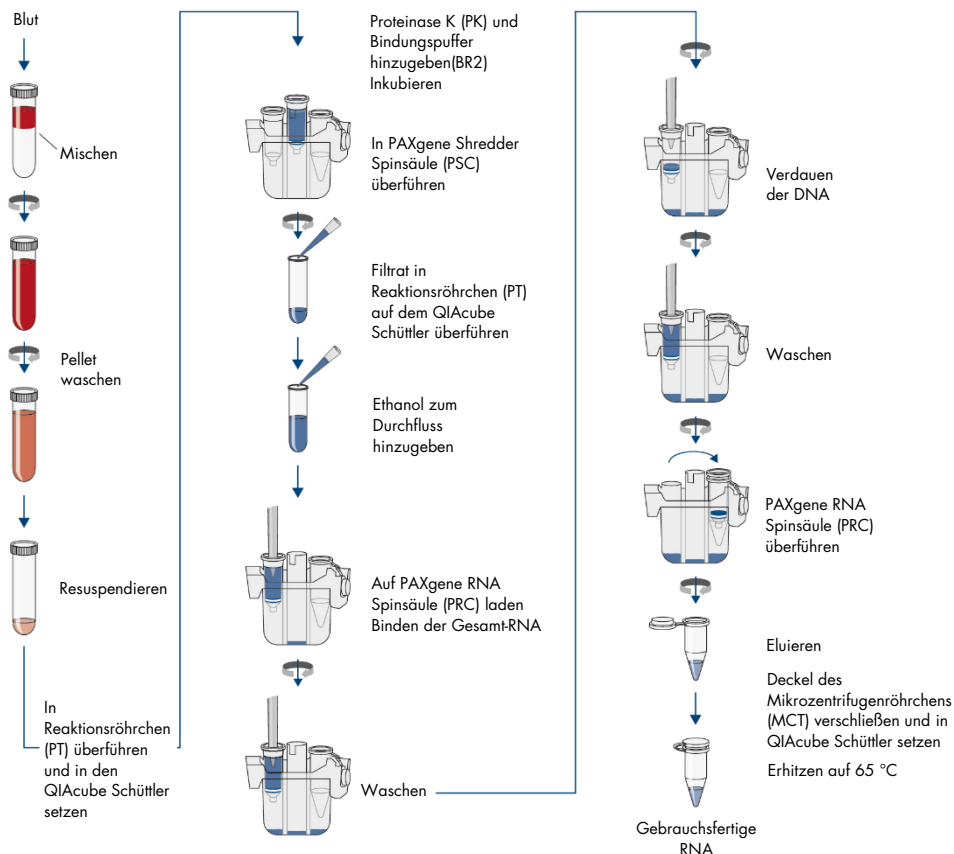


Abbildung 10: Das PAXgene Blood RNA Protokoll (automatisches Verfahren).

Das zentrifugierte, gewaschene und resuspendierte Nukleinsäure-Pellet (siehe „RNA-Konzentrierung und Aufreinigung“ auf Seite 20) wird aus dem PAXgene Blood RNA Tube (BRT) in Reaktionsröhrchen (PT) überführt, die dann in den Thermoschüttler auf die QIAcube Arbeitsplattform gestellt werden. Der Anwender wählt das Protokoll „PAXgene Blood RNA Part A“ aus dem Menü aus und startet es. Der QIAcube führt dann alle Protokollschritte bis zur Elution der RNA in Elutionspuffer (BR5) durch. Der Anwender überführt die Mikrozentrifugenröhrchen (MCT) mit der aufgereinigten RNA in den Thermoschüttler des

QIAcube. Der Anwender wählt das Protokoll „PAXgene Blood RNA Part B“ aus dem Menü aus und startet es, und der QIAcube führt eine Hitzedenaturierung durch.

Die durchschnittliche Probenvorbereitungszeit (auf der Basis von 12 Probenvorbereitungen) beträgt 151 Minuten*, wobei die Handhabungszeit im Vergleich zum manuellen Protokoll erheblich geringer ist.

Bei ≥ 95 % der verarbeiteten Proben wird eine RNA-Ausbeute von ≥ 3 μg aus 2,5 ml Vollblut gesunder Probanden erzielt. Abbildung 11 (Seite 33) zeigt die RNA-Ausbeuten aus insgesamt 216 Proben, die mit dem automatischen Protokoll mit 3 Kit-Chargen von 3 Laboranten vorbereitet wurden. Da für diese Studien gepoolte Blutproben und keine individuellen PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) verwendet wurden, spiegeln die Ergebnisse nicht die RNA-Ausbeute wider, die bei einer Einzel-Blutprobe eines einzigen Probanden erwartet werden kann. Da die Ausbeuten stark vom untersuchten Probanden abhängen, können die einzelnen RNA-Ausbeuten variieren (Abbildung 11 auf Seite 33).

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

RNA, die mit dem PAXgene Blood RNA System und dem automatischen Protokoll aufgereinigt wurde, ist rein, was die fehlende Inhibition der RT-PCR (siehe Abb. 11, Seite 33) und die A_{260}/A_{280} -Werte zwischen 1,8 und 2,2 zeigen. In ≥ 95 % aller Proben ist genomische DNA in einem Anteil ≤ 1 % (w/w) vorhanden, wie durch quantitative Echtzeit-PCR einer Sequenz des Beta-Actin-Gens gemessen wurde. Die Abbildungen 12 und 13 (Seite 33 und 34) zeigen die A_{260}/A_{280} -Werte sowie den relativen Anteil genomischer DNA von insgesamt 216 Proben, die mit dem automatischen Protokoll mit 3 Kit-Chargen von 3 Laboranten vorbereitet wurden.

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

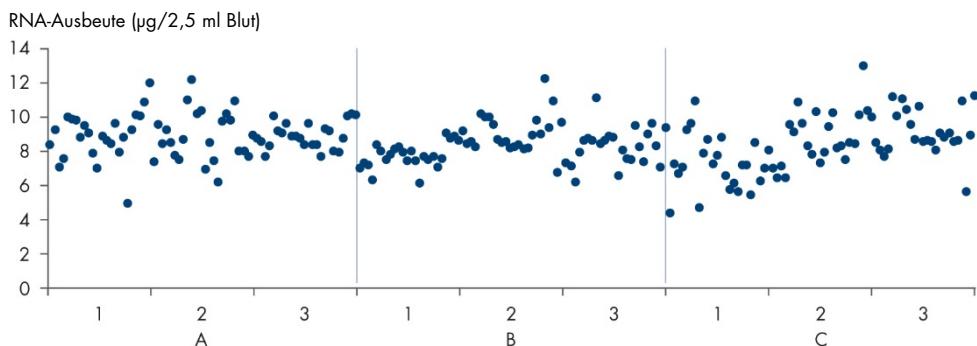


Abbildung 11: RNA-Ausbeute – Automatische Probenverarbeitung. Blutproben von 36 Probanden wurden in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen (6 Röhrchen pro Proband, d. h. insgesamt 216 Röhrchen). Die Inhalte aller Röhrchen von jeweils 6 Probanden wurden gepoolt und anschließend wieder auf 36 Proben aliquotiert. Diese 36 Proben pro 6-Probanden-Pool wurden von 3 verschiedenen Laboranten (A, B und C) verarbeitet. Jeder Laborant verwendete PAXgene Blood RNA Kits aus 3 unterschiedlichen Chargen (1, 2 und 3) für die automatische Aufreinigung und verarbeitete für jeweils eine Probe der 6 Probanden-Pools vier Replikate. Die RNA-Ausbeuten aller individuellen Proben sind für jede Kombination aus Laborant und Charge dargestellt.

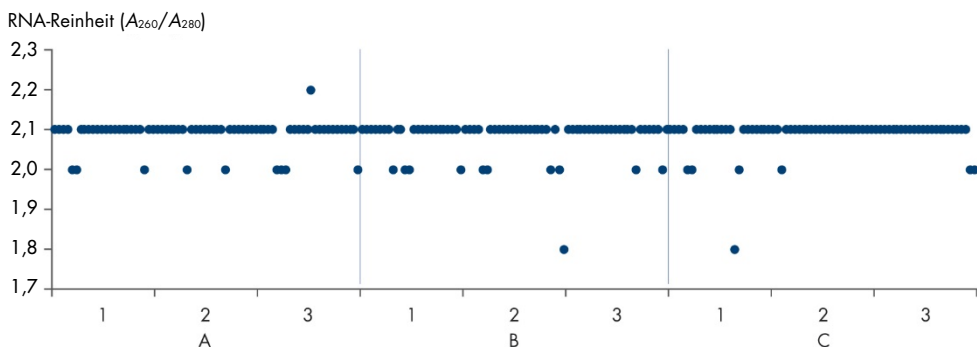


Abbildung 12. RNA-Reinheit (A_{260}/A_{280} -Werte) – Automatische Verarbeitung. Von 3 Laboranten (A, B und C) wurde unter Verwendung von PAXgene Blood RNA Kits aus 3 unterschiedlichen Chargen (1, 2 und 3) mit dem in Abbildung 11 beschriebenen Experiment RNA aufgereinigt. Es sind die A_{260}/A_{280} -Werte aller individuellen Proben jeder Kombination aus Laborant und Charge gezeigt.

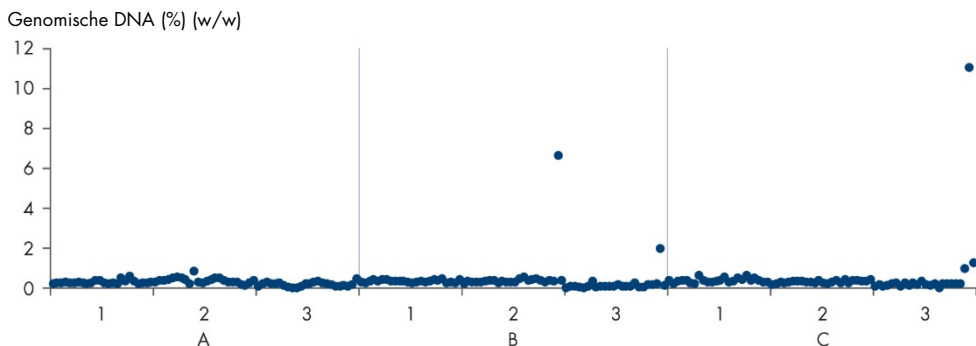


Abbildung 13: RNA-Reinheit (% Kontamination mit genomischer DNA) – Automatische Verarbeitung. Von 3 Laboranten (A, B und C) wurde unter Verwendung von PAXgene Blood RNA Kits aus 3 unterschiedlichen Chargen (1, 2 und 3) mit dem in Abbildung 11 beschriebenen Experiment RNA aufgereinigt. Es sind die Mengen genomischer DNA (w/w) in allen individuellen Proben jeder Kombination aus Laborant und Charge gezeigt.

Das automatische Protokoll zur RNA-Aufreinigung mit dem PAXgene Blood RNA System liefert hochreproduzierbare und wiederholbare RT-PCR-Ergebnisse, wie in Abbildung 14 auf Seite 35 gezeigt ist, so dass dieses Protokoll für klinische diagnostische Tests hochrobust ist.

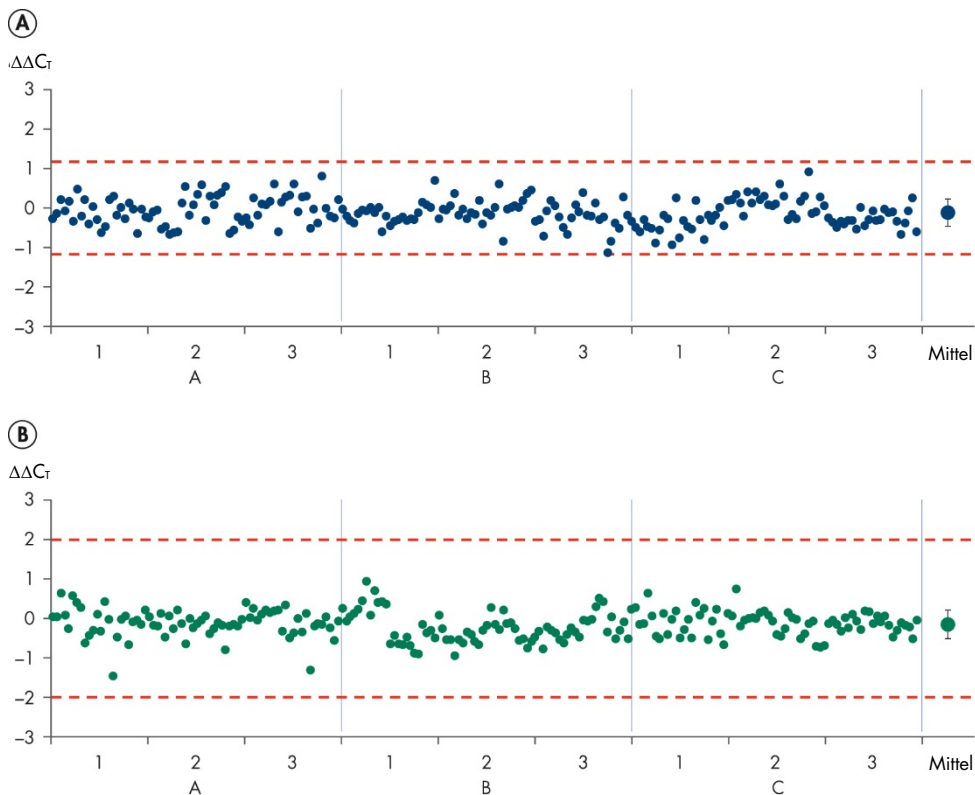


Abbildung 14: Reproduzierbarkeit der RT-PCR – zwischen automatischem und manuellem Protokoll Von 3 Laboranten (A, B und C) wurde unter Verwendung von PAXgene Blood RNA Kits aus 3 unterschiedlichen Chargen (1, 2 und 3) mit dem in Abbildung 11 beschriebenen Experiment unter Verwendung des automatischen Protokolls RNA aufgereinigt. Parallel dazu wurde unter Verwendung des manuellen Protokolls RNA aus den entsprechenden Replikatröhrchen aufgereinigt. Die relativen Transkriptkonzentrationen von **[A]** FOS und **[B]** IL1B wurden durch Echtzeit-Duplex-RT-PCR unter Verwendung von 18S-rRNA als internem Standard bestimmt. Mögliche Unterschiede der Transkriptkonzentrationen zwischen der RNA, die aus gepaarten Blutproben unter Verwendung der beiden Aufreinigungsprotokolle (automatisches und manuelles Protokoll) vorbereitet wurde, wurden nach dem $\Delta\Delta C_T$ -Verfahren berechnet. Individuelle $\Delta\Delta C_T$ -Werte für alle Probenpaare (4 Replikate \times 6 Probanden-Pools \times 3 Kit-Chargen \times 3 Laboranten = 216 Paare für jedes Gen) sind als Einzelpunkte mit Mittelwerten (größere Punkte) und Standardabweichungen (schwarze Balken) für alle gezeigten Proben aufgetragen. Die unterbrochenen Linien geben den $\pm 3x$ -Bereich der Gesamtprecision der Assays (FOS: 1,16 C_T ; IL1B: 1,98 C_T ; verschiedene Testpräzisionen im Vergleich zu den Abbildungen 1–4, 8 und 9 aufgrund verschiedener Testversionen) an.

Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Für alle Protokolle

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

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

[†] Stellen Sie sicher, dass Sie mit den Richtlinien zur Handhabung von RNA (Anhang A auf Seite 64) vertraut sind.

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

Für das manuelle Protokoll

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

Für das automatische Protokoll

- QIAcube* (QIAGEN, Kat.-Nr. 9001882 [110 V], Kat.-Nr. 9001293 [230 V])
- Schere

QIAcube Verbrauchsmaterialien

- Filter-Tips, 1000 µl (1024) (QIAGEN, Kat.-Nr. 990352)[†]
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, Kat.-Nr. 990393)[†]
- Rotor Adapters (10 x 24) (QIAGEN, Kat.-Nr. 990394)[†]

QIAcube Zubehör

- Reagent Bottle Rack (QIAGEN, Kat.-Nr. 990390)[†]
- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, Kat.-Nr. 990392)[†]

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

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

Wichtige Hinweise

Hinweise zur Bedienung des QIAcube

Sie sollten mit der Bedienung des QIAcube vertraut sein. Lesen Sie bitte das *QIAcube Benutzerhandbuch* und alle weiteren mit dem QIAcube gelieferten Informationen, wobei Sie insbesondere die Sicherheitshinweise beachten sollten, bevor Sie mit den automatischen PAXgene Blood RNA Protokollen beginnen.

Einschalten des QIAcube

Schließen Sie die Tür des QIAcube und schalten Sie das Gerät mit dem Netzschalter ein (siehe Abbildung 15 auf Seite 39).

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

Installation von Protokollen auf dem QIAcube

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

Protokolle stehen unter **www.qiagen.com/MyQIAcube** bereit und müssen auf den USB-Stick heruntergeladen werden, der mit dem QIAcube geliefert wurde, und über den USB-Port auf den QIAcube übertragen werden.

Der USB-Port, der sich hinter dem Schutzdeckel befindet (siehe Abbildung 15 auf Seite 39), ermöglicht eine Verbindung des QIAcube mit einem USB- Stick (mit dem QIAcube geliefert).

Über den USB-Port können auch Dateien, z. B. Log-Dateien oder Berichtdateien, vom QIAcube auf den USB-Stick übertragen werden.



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



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



Abbildung 15. Vorderansicht des QIAcube

1

Touchscreen

2

Tür

3

Serielle RS232-Schnittstelle hinter Schutzdeckel
(nur zur Verwendung durch die Instrument Service
Spezialisten von QIAGEN)

4

USB-Port hinter Schutzdeckel

5

Netzschalter

6

Abfallschublade

Beladen des QIAcube

Um Zeit zu sparen, kann die QIAcube Arbeitsplattform auch während einer oder beider der 10-minütigen Zentrifugierschritte (Schritt 3 und 5) des Protokolls. „Automatische Aufreinigung von Gesamt-RNA aus humanem Vollblut, das in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen wurde“ (siehe Seite 56) beladen werden.

Reagenzflaschen

Vor jedem Lauf auf dem QIAcube, füllen Sie die 4 Reagenzflaschen mit den in Tabelle 3 aufgeführten Reagenzien sorgfältig bis zur Maximalmarkierung oder, falls dies unmöglich ist, bis zu dem Niveau, das die mit dem PAXgene Blood RNA Kit gelieferten Puffervolumen erlauben. Beschriften Sie die Flaschen und Deckel mit den Puffernamen und setzen Sie die gefüllten Reagenzflaschen in die richtigen Positionen des Reagenzflaschengestells. Stellen Sie das Gestell auf die QIAcube Arbeitsplattform (wie in Abbildung 16 und 17 auf Seite 41 und 42 gezeigt).



Das mitgelieferte Volumen des Puffers BR2 füllt eine Reagenzflasche nicht bis zur Marke. Die Puffer BR3 und BR4 können nicht ausreichen, die Flasche bis zur Marke zu füllen, nachdem mehrere Proben in vergangenen Läufen verarbeitet wurden.



Vergewissern Sie sich, dass die Deckel der Flaschen entfernt wurden, bevor Sie diese auf die Arbeitsplattform stellen.



Die Puffervolumen im PAXgene Blood RNA Kit (50) reichen für maximal 7 RNA-Vorbereitungsläufe mit 2 bis 12 Proben pro Lauf auf dem QIAcube aus. Generell gilt, dass Läufe mit niedrigeren Probenzahlen vermieden werden sollten, um insgesamt 50 Proben pro Kit bei maximal 7 RNA-Vorbereitungsläufen zu verarbeiten. Mehr als 7 RNA-Vorbereitungsläufe könnten dazu führen, dass für die Verarbeitung der letzten Proben keine ausreichenden Puffermengen mehr zur Verfügung stehen.

Tabelle 3. Positionen im Reagenzflaschengestell

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

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

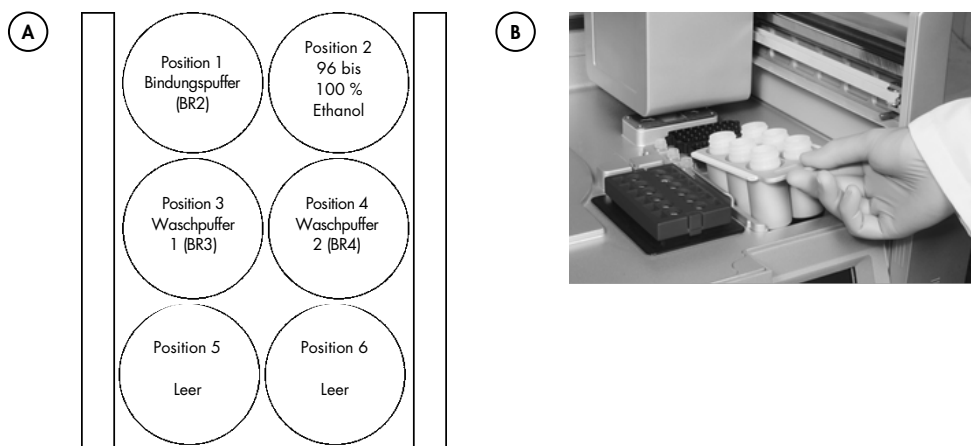


Abbildung 16: Einsetzen des Reagenzflaschengestells. [A] Schematische Darstellung der Positionen und Inhalte der Flaschen im Reagenzflaschengestell. [B] Einsetzen des Gestells auf die QIAcube Arbeitsplattform.

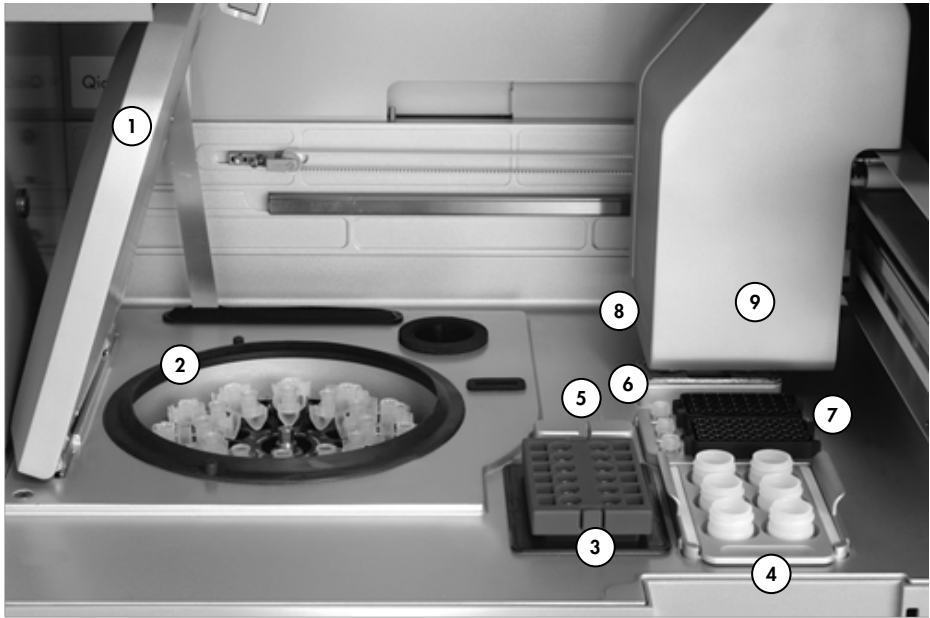


Abbildung 17. Ansicht der QIAcube Arbeitsplattform.

- | | |
|--------------------------|--|
| ① Zentrifugendeckel | ⑥ Stellplätze für Mikrozentrifugenröhrchen |
| ② Zentrifuge | ⑦ Pipettenspitzenracks |
| ③ Schüttler | ⑧ Entsorgungskanäle für Pipettenspitzen und Spinsäulen |
| ④ Reagenzflaschengestell | ⑨ Roboterarm |
| ⑤ Pipettenspitzensensor | |

Spinsäulen (PRC, PSC), Mikrozentrifugenröhrchen (MCT) und andere Kunststoffartikel für den QIAcube

Setzen Sie 2 Pipettenspitzenge­stelle mit 1.000-µl-Filterspitzen in die QIAcube Arbeitsplattform (siehe Abbildung 17 auf Seite 42). Füllen Sie die Gestelle mit Spitzen auf, wenn erforderlich.



Verwenden Sie nur die 1.000-µl-Pipettenfilterspitzen, die zur Verwendung mit dem QIAcube vorgesehen sind.

Beschriften Sie die Rotoradapter und Mikrozentrifugenröhrchen (MCT) für jede Probe mit einem geeigneten wasserfesten Stift. Öffnen Sie die benötigten PAXgene Shredder Spinsäulen (PSC,) und schneiden Sie mit einer Schere die Deckel vollständig ab (siehe Abbildung 18, Seite 44).



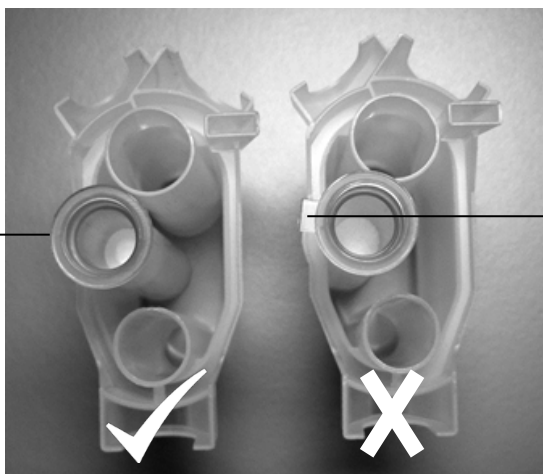
Für einen sachgemäßen Betrieb des Roboterarms im QIAcube müssen die Deckel und alle Verbindungsstege zu den PAXgene Shredder Spinsäulen (PSC) vollständig entfernt (abgeschnitten) werden (siehe Abbildung 16). Andernfalls kann der Roboterarm die Spinsäulen (PSC, PRC) nicht richtig greifen.

Setzen Sie die PAXgene RNA Spinsäule (PRC), die PAXgene Shredder Spinsäule (PSC, ohne Deckel) und ein beschriftetes Mikrozentrifugenröhrchen (MCT) in die vorgesehenen Positionen jedes zuvor beschrifteten Rotoradapters, wie in Tabelle 4 und Abbildung 19 (Seite 44) gezeigt ist.



Vergewissern Sie sich, dass die Deckel der Spinsäule (PRC) und Mikrozentrifugenröhrchen (MCT) bis ganz nach unten in die Schlitz­e an den Rändern des Rotoradapters hineingeschoben sind, andernfalls können die Deckel beim Zentrifugieren abbrechen.

Deckel der
Spinsäule
korrekt
entfernt



Deckel der
Spinsäule
nicht korrekt
entfernt; ein
Teil des
Deckels ist
noch
befestigt

Abbildung 18: Einsetzen der PAXgene Shredder Spinsäule (PSC). Die PAXgene Shredder Spinsäule (PSC) wird in die mittlere Position des Rotoradapters eingesetzt. Schneiden Sie den Deckel ab, bevor Sie die Spinsäule (PSC) einsetzen.

Tabelle 4. Verbrauchsmaterialien im Rotoradapter

Position	Reagenz	Deckelposition
1	PAXgene RNA Spinsäule (rot, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder Spinsäule (lila, PSC) (Deckel vor Einsetzen in Rotoradapter abschneiden)	–
3	Mikrozentrifugenröhrchen (MCT)*	L3

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

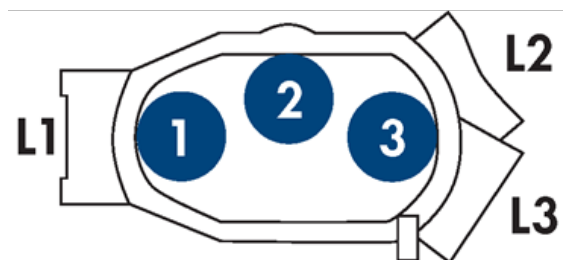


Abbildung 19: Positionen im Rotoradapter. Der Rotoradapter weist drei Röhrchenpositionen (1 bis 3) und drei Deckelpositionen (L1 bis L3) auf.

Beladen der Zentrifuge

Setzen Sie die bestückten Rotoradapter in die Zentrifugenbecher, wie in Abbildung 20 unten gezeigt.



Wenn Sie weniger als 12 Proben verarbeiten, stellen Sie sicher, dass der Zentrifugenrotor radial unwuchtfrei beladen wird (siehe Abbildung 21 auf Seite 46). Vor dem Start eines Protokolllaufs müssen auch dann alle Zentrifugenbecher eingesetzt werden, wenn weniger als 12 Proben verarbeitet werden sollen. Eine einzige (eine) Probe oder 11 Proben können nicht verarbeitet werden.

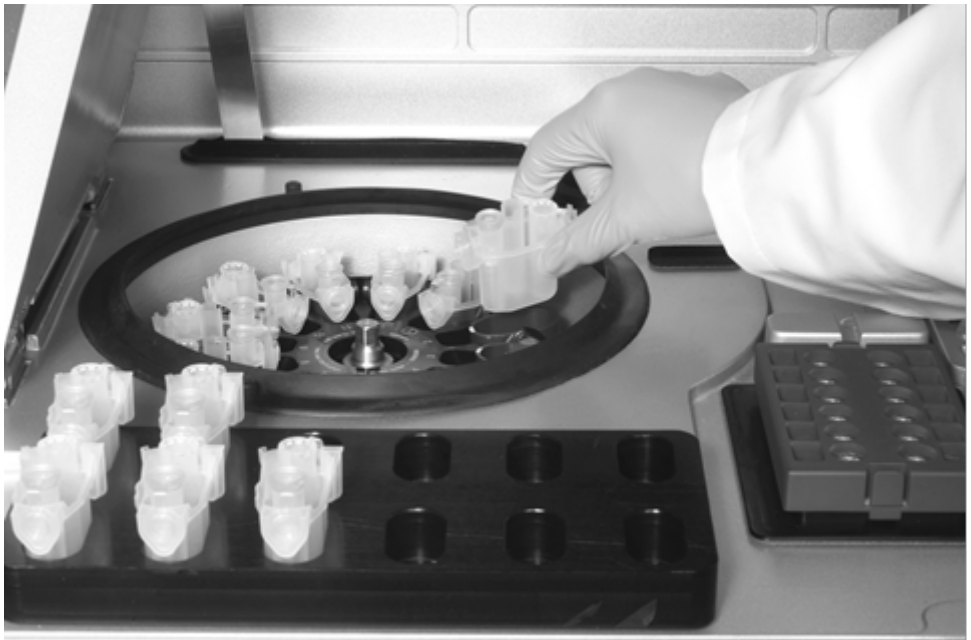


Abbildung 20: Beladen der Zentrifuge. Setzen Sie die bestückten Rotoradapter in die Zentrifugenbecher.

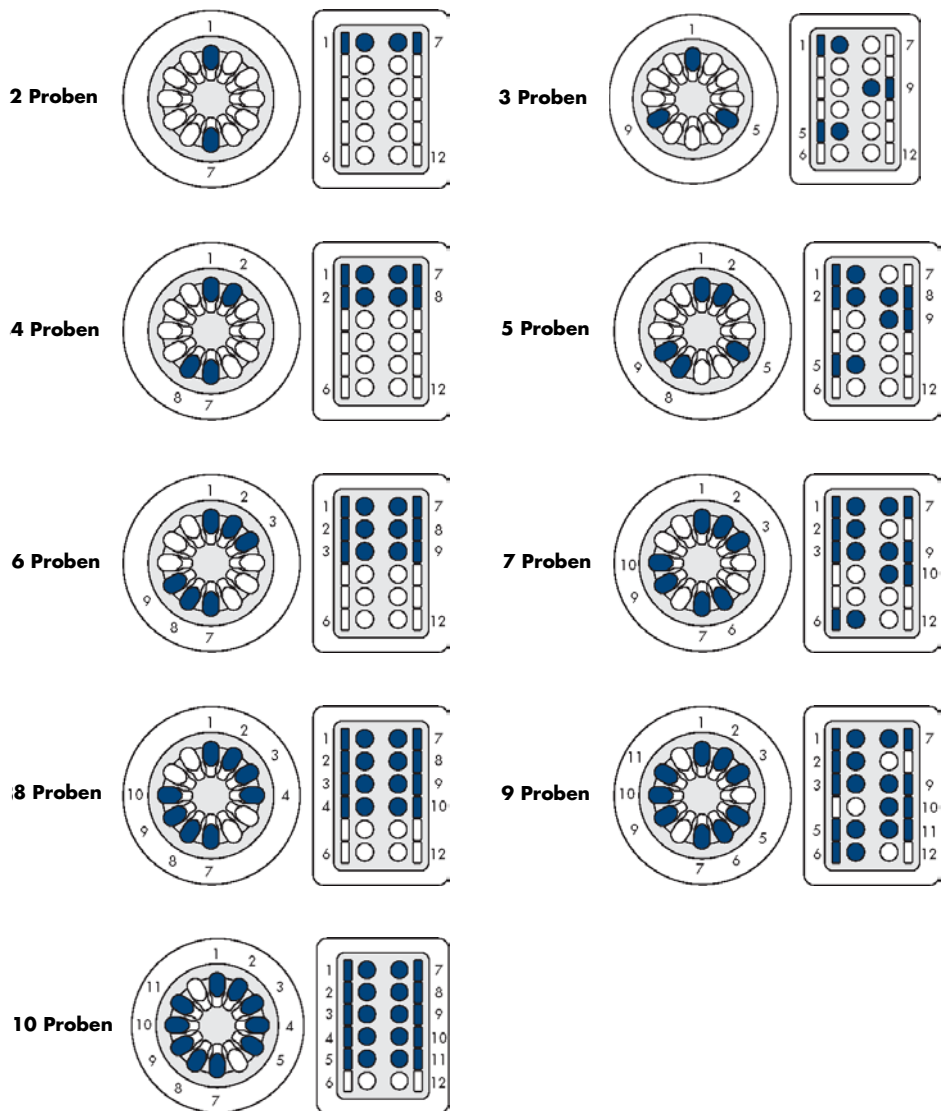



Abbildung 21: Beladen von Zentrifuge und Schüttler. Gezeigt sind die Positionen in Zentrifuge und Schüttler zum Verarbeiten von zwei (2) bis zehn (10) Proben. Nicht verarbeitet werden können eine oder 11 Proben.


Reaktionsröhrchen (PT)

Entfernen Sie alle noch von vergangenen Läufen in den Stellplätzen für Mikrozentrifugenröhrchen vorhandenen Reaktionsröhrchen (PT) (siehe Abbildung 17 auf Seite 42). Füllen Sie 3 Reaktionsröhrchen (PT) mit den in Tabelle 5 aufgeführten Reagenzmengen entsprechend der Probenzahl in diesem Lauf.

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

Verwenden Sie die 2-ml-Reaktionsröhrchen (PT), die im PAXgene Blood RNA Kit enthalten sind. Beschriften Sie die Röhrchen (PT) deutlich mit den Reagenznamen und setzen Sie diese in die vorgesehenen Stellplätze für Mikrozentrifugenröhrchen, wie in Tabelle 6 auf Seite 48 angegeben.

- 

DNase I (RNFD) ist besonders anfällig für physikalische Denaturierung. Mischen Sie nur durch Pipettieren mit Pipettenspitzen mit weiter Öffnung, um Scheren zu reduzieren. Nicht mit einem Vortexer mischen.
- 

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

Tabelle 5. Benötigte Reagenzvolumen in den Reaktionsröhrchen für die Stellplätze für Mikrozentrifugenröhrchen

Die Anzahl der Proben	Reagenzvolumen für die angegebene Anzahl Proben (µl)		
	Proteinase K (PK)	DNase-I-Inkubationsmischung	Elutionspuffer (BR5)
2	126	187 (23 DNase I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNase I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNase I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNase I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNase I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNase I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNase I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNase I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNase I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNase I + 806 Buffer RDD)	1177

Tabelle 6. Stellplätze für Mikrozentrifugenröhrchen

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

* Verwenden Sie die 2-ml-Reaktionsröhrchen (PT), die im PAXgene Blood RNA Kit enthalten sind.

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

Wichtige Hinweise vor Beginn

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

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

- Pipettieren Sie die Probe vorsichtig in die Spinsäule (PRC, PSC), ohne den oberen Rand der Säule zu benetzen.

- Wechseln Sie zwischen den verschiedenen Pipettierschritten stets die Pipettenspitzen. Verwenden Sie Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere.
- Berühren Sie mit der Pipettenspitze nicht die Membran in der Spinsäule (PRC, PSC).
- Zentrifugieren Sie die Mikrozentrifugenröhrchen (MCT) nach dem Mischen auf dem Vortexer oder Erhitzen ganz kurz, um Tropfen von der Deckelinnenseite zu entfernen.
- Tragen Sie während der gesamten Verarbeitung Laborhandschuhe. Sollten Sie die Proben mit den Handschuhen berühren, müssen die Handschuhe sofort gewechselt werden.
- Verschließen Sie die Spinsäulen (PRC, PSC), bevor Sie sie in die Mikrozentrifuge einsetzen. Zentrifugieren Sie wie im Protokoll beschrieben.
- Öffnen Sie stets nur eine Spinsäule (PRC, PSC) und vermeiden Sie Aerosolbildung.
- Für eine effiziente Parallelverarbeitung vieler Proben füllen Sie ein Gestell mit Reaktionsröhrchen (PT), in welche die Spinsäulen (PRC, PSC) nach dem Zentrifugieren überführt werden können. Entsorgen Sie benutzte Reaktionsröhrchen (PT) mit dem Filtrat und stellen Sie die neuen Reaktionsröhrchen (PT) mit den Spinsäulen (PRC, PSC) direkt in die Mikrozentrifuge.

Vorbereitende Schritte

- Das Blut muss in die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) gemäß den Anweisungen im *PAXgene Blood RNA Tube Handbuch* entnommen werden. Im Anhang C (auf Seite 67) finden Sie Empfehlungen zur Handhabung der PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Inkubieren Sie die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) nach der Blutentnahme für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur, um eine vollständige Lyse der Blutzellen sicherzustellen. Eine Inkubation der PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) über Nacht kann die Ausbeute erhöhen. Wenn ein PAXgene Blood RNA Tube (BRT) nach der Blutentnahme bei 2 bis 8 °C, –20 °C oder –70 °C gelagert worden ist, äquilibrieren Sie das Röhrchen erst auf Raumtemperatur und lagern Sie es für 2 Stunden bei Raumtemperatur, bevor Sie mit der Verarbeitung beginnen.
- Lesen Sie die Sicherheitsinformationen auf Seite 10.

- Lesen Sie auch die Richtlinien zur Handhabung von RNA (Anhang A auf Seite 65).
- Stellen Sie sicher, dass alle Geräte, wie z. B. Pipetten und Schüttelinkubator, regelmäßig nach den Empfehlungen des Herstellers überprüft und kalibriert werden.
- Ein Schüttelinkubator wird für die Protokollschritte 5 und 20 benötigt. Stellen Sie die Temperatur des Schüttelinkubators auf 55 °C ein.
- Im Bindungspuffer (BR2) kann sich beim Lagern ein Niederschlag bilden. Falls nötig, lösen Sie diesen durch Erwärmen auf 37 °C auf.
- Waschpuffer 2 (BR4) wird als Konzentrat geliefert. Vor der ersten Verwendung geben Sie, wie auf der Flasche angegeben, das 4-fache Volumen Ethanol (96 bis 100 %, Reinheitsgrad p.a.) hinzu, um eine gebrauchsfertige Arbeitslösung herzustellen.
- Bereiten Sie vor der erstmaligen Verwendung des RNase-freien DNase-Satzes eine DNase-I-Stammlösung vor. Lösen Sie die feste DNase I (RNFD; 1.500 Kunitz-Einheiten) * in 550 µl DNase-Resuspendierungspuffer (DRB) auf, der im dem Satz bereitgestellt ist. Achten Sie darauf, dass beim Öffnen des Gefäßes keine DNase I (RNFD) verloren geht. Die rekonstituierte DNase I (RNFD) darf nicht auf einem Vortexer gemischt werden. DNase I ist besonders anfällig für physikalische Denaturierung. Mischen Sie nur durch vorsichtiges Schwenken und Umdrehen des Röhrchens.
- Gegenwärtig vorliegende Daten zeigen, dass rekonstituierte DNase I (RNFD) bis zu 6 Wochen bei 2 bis 8 °C gelagert werden kann. Für eine längerfristige Lagerung der DNase I (RNFD) entnehmen Sie die Stammlösung aus dem Glasgefäß, teilen Sie diese in Aliquote für einmaligen Gebrauch auf (verwenden Sie dafür die mit dem Kit gelieferten 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen [MCT], die für 5 Aliquote reichen) und lagern Sie diese bei –20 °C für bis zu 9 Monate. Aufgetaute Aliquote können bis zu 6 Wochen bei 2 bis 8 °C gelagert werden. Nach dem Auftauen dürfen die Aliquote nicht wieder eingefroren werden.
- Beachten Sie beim Rekonstituieren und Aliquotieren der DNase I (RNFD) die Richtlinien zur Handhabung von RNA (Anhang A auf Seite 65).

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

Verfahren

1. Zentrifugieren Sie die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) für 10 Minuten bei 3.000–5.000 x g in einem Ausschwingrotor.



Stellen Sie sicher, dass die Blutproben in den PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zuvor für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) inkubiert wurden, um eine vollständige Lyse der Blutzellen zu erreichen.



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

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

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

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

Kleinere Zelltrümmer, die nach dem Vortexer aber vor Zentrifugieren im Überstand befinden, stören die weitere Verarbeitung nicht.



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

4. Geben Sie 350 µl Resuspendierungspuffer (BR1) hinzu und mischen Sie auf dem Vortexer, bis sich das Pellet sichtbar aufgelöst hat.
5. Pipettieren Sie die Probe in ein 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (MCT). Geben Sie 300 µl Bindungspuffer (BR2) und 40 µl Proteinase K (PK) hinzu. Mischen Sie für ca. 5 Sekunden auf dem Vortexer und inkubieren Sie für 10 Minuten bei 55 °C in einem Schüttelinkubator bei 400 bis 1.400 U/min. Stellen Sie nach der Inkubation die Temperatur des Schüttelinkubators auf 65 °C ein (für Schritt 20).



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

6. Pipettieren Sie das Lysat direkt in eine PAXgene Shredder Spinsäule (PSC, lila), die sich in einem 2-ml-Reaktionsröhrchen (PT) befindet, und zentrifugieren Sie für 3 Minuten bei maximaler Drehzahl (aber nicht mehr als 20.000 x g).



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

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



Manche Proben können bereits ohne Zentrifugieren durch die PAXgene Shredder Spinsäule (PSC) fließen. Dies liegt an niedriger Viskosität mancher Probe und darf nicht als Hinweis auf einen Produktfehler verstanden werden.

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



Länger als 1 bis 2 Sekunden darf nicht zentrifugiert werden, da dies zum Pelletieren von Nukleinsäuren und damit reduzierte Gesamt-RNA-Ausbeuten führen kann.

9. Pipettieren Sie 700 µl Probe in die PAXgene RNA Spinsäule (PRC, rot), die sich in einem 2-ml-Reaktionsröhrchen (PT) befindet, und zentrifugieren Sie für 1 Minute bei 8.000 bis 20.000 x g. Überführen Sie die Spinsäule (PRC) in ein neues 2-ml-Reaktionsröhrchen (PT) und entsorgen Sie das benutzte Reaktionsröhrchen (PT) mit dem Durchfluss.
10. Pipettieren Sie die verbliebene Probe in die PAXgene RNA Spinsäule (PRC) und zentrifugieren Sie für 1 Minute bei 8.000 bis 20.000 x g. Überführen Sie die Spinsäule (PRC) in ein neues 2-ml-Reaktionsröhrchen (PT) und entsorgen Sie das benutzte Reaktionsröhrchen (PT) mit dem Durchfluss.



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

11. Pipettieren Sie 350 µl Waschpuffer 1 (BR3) in die PAXgene RNA Spinsäule (PRC). Zentrifugieren Sie für 1 Minute bei 8.000 bis 20.000 x g. Überführen Sie die Spinsäule

(PRC) in ein neues 2-ml-Reaktionsröhrchen (PT) und entsorgen Sie das benutzte Reaktionsröhrchen (PT) mit dem Durchfluss.

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

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



DNase I ist besonders anfällig für physikalische Denaturierung. Mischen Sie nur durch vorsichtiges Schlenzen des Röhrchens. Nicht mit einem Vortexer mischen.

13. Pipettieren Sie die DNase-I-Inkubationsmischung (80 µl) direkt auf die Membran in der PAXgene RNA Spinsäule (PRC) und inkubieren Sie für 15 Minuten bei 20 bis 30 °C.



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

14. Pipettieren Sie 350 µl Waschpuffer 1 (BR3) in die PAXgene RNA Spinsäule (PRC) und zentrifugieren Sie für 1 Minute bei 8.000 bis 20.000 x g. Überführen Sie die Spinsäule (PRC) in ein neues 2-ml-Reaktionsröhrchen (PT) und entsorgen Sie das benutzte Reaktionsröhrchen (PT) mit dem Durchfluss.

15. Pipettieren Sie 500 µl Waschpuffer 2 (BR4) in die PAXgene RNA Spinsäule (PRC) und zentrifugieren Sie für 1 Minute bei 8.000 bis 20.000 x g. Überführen Sie die Spinsäule (PRC) in ein neues 2-ml-Reaktionsröhrchen (PT) und entsorgen Sie das benutzte Reaktionsröhrchen (PT) mit dem Durchfluss.



Waschpuffer 2 (BR4) wird als Konzentrat geliefert. Stellen Sie sicher, dass vor der Verwendung Ethanol zum Waschpuffer 2 (BR4) gegeben wurde (siehe „Arbeiten vor Beginn“ auf Seite 50).

16. Geben Sie weitere 500 µl Waschpuffer 2 (BR4) in die PAXgene RNA- Spinsäule (PRC). Zentrifugieren Sie für 3 Minuten bei 8.000 bis 20.000 x g.
17. Entsorgen Sie das Reaktionsröhrchen (PT) mit dem Durchfluss und überführen Sie die PAXgene RNA Spinsäule (PRC) in ein neues 2-ml-Reaktionsröhrchen (PT). Zentrifugieren Sie für 1 Minute bei 8.000 bis 20.000 x g.

18. Entsorgen Sie das Reaktionsröhrchen (PT) mit dem Durchfluss. Überführen Sie die PAXgene RNA Spinsäule (PRC) in ein 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (MCT) und pipettieren Sie 40 µl Elutionspuffer (BR5) direkt auf die Membran der PAXgene RNA Spinsäule (PRC). Zentrifugieren Sie für 1 Minute bei 8.000 bis 20.000 x g, um die RNA zu eluieren.

Um maximale Elutionseffizienz zu erreichen, ist es wichtig, die gesamte Membranfläche mit Elutionspuffer (BR5) zu benetzen.

19. Wiederholen Sie den Elutionsschritt (Schritt 18) wie beschrieben mit 40 µl Elutionspuffer (BR5) und demselben Mikrozentrifugenröhrchen (MCT).

20. Inkubieren Sie das Eluat für 5 Minuten bei 65 °C im Schüttelinkubator (siehe Schritt 5), ohne zu schütteln. Kühlen Sie nach der Inkubation sofort auf Eis.

Durch diese Inkubation bei 65 °C wird die RNA für nachfolgende Applikationen denaturiert. Überschreiten Sie weder Inkubationsdauer noch -temperatur.

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

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

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

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

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

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$. Siehe Anhang B auf Seite 66.

* Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (safety data sheets, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

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

Wichtige Hinweise vor Beginn

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

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

- Pipettieren Sie die Probe vorsichtig auf den Boden des Reaktionsröhrchens (PT), ohne den oberen Rand des Röhrchens zu benetzen.

- Wechseln Sie zwischen den verschiedenen Pipettierschritten stets die Pipettenspitzen. Verwenden Sie Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere.
- Berühren Sie mit der Pipettenspitze nicht die Membran in der Spinsäule (PRC, PSC).
- Zentrifugieren Sie die Mikrozentrifugenröhrchen (MCT) nach dem Mischen auf dem Vortexer oder Erhitzen ganz kurz, um Tropfen von der Deckelinnenseite zu entfernen.
- Tragen Sie während der gesamten Verarbeitung Laborhandschuhe. Sollten Sie die Proben mit den Handschuhen berühren, müssen die Handschuhe sofort gewechselt werden.

Vorbereitende Schritte

- Das Blut muss in die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) gemäß den Anweisungen im *PAXgene Blood RNA Tube Handbuch* entnommen werden. Im Anhang C (auf Seite 67) finden Sie Empfehlungen zur Handhabung der PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Inkubieren Sie die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) nach der Blutentnahme für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur, um eine vollständige Lyse der Blutzellen sicherzustellen. Eine Inkubation der PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) über Nacht kann die Ausbeute erhöhen. Wenn ein PAXgene Blood RNA Tube (BRT) nach der Blutentnahme bei 2 bis 8 °C, –20 °C oder –70 °C gelagert worden ist, äquilibrieren Sie das Röhrchen erst auf Raumtemperatur und lagern Sie es für 2 Stunden bei Raumtemperatur, bevor Sie mit der Verarbeitung beginnen.
- Lesen Sie die Sicherheitsinformationen auf Seite 10.
- Lesen Sie den Abschnitt „Wichtige Hinweise“ auf Seite 38.
- Lesen Sie auch die Richtlinien zur Handhabung von RNA (Anhang A auf Seite 65).
- Lesen Sie das *QIAcube Benutzerhandbuch* und alle weiteren mit dem QIAcube gelieferten Informationen, insbesondere die Sicherheitshinweise.
- Stellen Sie sicher, dass alle Geräte, wie z. B. Pipetten und der QIAcube, regelmäßig nach den Empfehlungen des Herstellers überprüft und kalibriert werden.
- Im Bindungspuffer (BR2) kann sich beim Lagern ein Niederschlag bilden. Falls nötig, lösen Sie diesen durch Erwärmen auf 37 °C auf.

- Waschpuffer 2 (BR4) wird als Konzentrat geliefert. Vor der ersten Verwendung geben Sie, wie auf der Flasche angegeben, das 4-fache Volumen Ethanol (96 bis 100 %, Reinheitsgrad p.a.) hinzu, um eine gebrauchsfertige Arbeitslösung herzustellen.
- Bereiten Sie vor der erstmaligen Verwendung des RNase-freien DNase-Satzes eine DNase-I-Stammlösung vor. Lösen Sie die feste DNase I (RNFD; 1.500 Kunitz-Einheiten)* in 550 µl DNase-Resuspendierungspuffer (DRB) auf, der im dem Satz bereitgestellt ist. Achten Sie darauf, dass beim Öffnen des Gefäßes keine DNase I (RNFD) verloren geht. Die rekonstituierte DNase I (RNFD) darf nicht auf einem Vortexer gemischt werden. DNase I ist besonders anfällig für physikalische Denaturierung. Mischen Sie nur durch vorsichtiges Schwenken und Umdrehen des Röhrchens.
- Gegenwärtig vorliegende Daten zeigen, dass rekonstituierte DNase I (RNFD) bis zu 6 Wochen bei 2 bis 8 °C gelagert werden kann. Für eine längerfristige Lagerung der DNase I (RNFD) entfernen Sie die Stammlösung aus dem Glasgefäß, teilen Sie diese in Aliquote für einmaligen Gebrauch auf (verwenden Sie dafür die mit dem Kit gelieferten 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen [MCT], die für 5 Aliquote reichen) und lagern Sie diese bei –20 °C für bis zu 9 Monate. Aufgetaute Aliquote können bis zu 6 Wochen bei 2 bis 8 °C gelagert werden. Nach dem Auftauen dürfen die Aliquote nicht wieder eingefroren werden.
- Beachten Sie beim Rekonstituieren und Aliquotieren der DNase I (RNFD) die Richtlinien zur Handhabung von RNA (Anhang A auf Seite 65).
- Installieren Sie den richtigen Schüttleradapter (im Lieferumfang des QIAcube enthalten; verwenden Sie den mit der Ziffer „2“ markierten Adapter für 2-ml-Safe-Lock-Reaktionsröhrchen) und setzen Sie das Schüttlergestell auf den Adapter.
- Prüfen Sie die Abfallschublade und leeren Sie diese, falls erforderlich.
- Installieren Sie die Protokolle, wenn dies für vorherigen Läufe noch nicht geschehen ist. Installieren Sie die beiden Protokolle „PAXgene Blood RNA Part A“ und „PAXgene Blood RNA Part B“. Siehe den Abschnitt „Installation von Protokollen auf dem QIAcube“ auf Seite 38.

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

Verfahren

1. Schließen Sie die Tür des QIAcube und schalten Sie das Gerät mit dem Netzschalter ein (siehe Abbildung 15 auf Seite 39).

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

2. Öffnen Sie die Tür des QIAcube und stellen Sie die erforderlichen Reagenzien und Kunststoff-Verbrauchsmaterialien auf die QIAcube Arbeitsplattform. Siehe den Abschnitt „Beladen des QIAcube“ auf Seite 40.

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

3. Zentrifugieren Sie die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) für 10 Minuten bei 3.000–5.000 x g in einem Ausschwingrotor.



Stellen Sie sicher, dass die Blutproben in den PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zuvor für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) inkubiert wurden, um eine vollständige Lyse der Blutzellen zu erreichen.



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

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

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

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

Kleinere Zelltrümmer, die nach dem Vortexer aber vor Zentrifugieren im Überstand befinden, stören die weitere Verarbeitung nicht.



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

6. Geben Sie 350 µl Resuspendierungspuffer (BR1) hinzu und mischen Sie auf dem Vortexer, bis sich das Pellet sichtbar aufgelöst hat.

7. Pipettieren Sie die Probe in ein 2-ml-Reaktionsröhrchen (PT).



Verwenden Sie die 2-ml-Reaktionsröhrchen (PT), die im PAXgene Blood RNA Kit enthalten sind.

8. Stellen Sie die offenen Reaktionsröhrchen (PT) mit den Proben in den QIAcube Schüttler (siehe Abbildung 17 auf Seite 42). Die Probenpositionen sind nummeriert, um das Beladen zu erleichtern. Stecken Sie die Schüttlergestellstopfen (im Lieferumfang des QIAcube enthalten) in die seitlichen Schlitzes des Schüttlergestells neben dem jeweiligen Reaktionsröhrchen. Dies ermöglicht die Probendetektion während der Beladungsprüfung.



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



Wenn Sie weniger als 12 Proben verarbeiten, stellen Sie sicher, dass das Schüttlergestell korrekt beladen wird, wie in Abbildung 21 auf Seite 46 gezeigt. Nicht verarbeitet werden können eine oder 11 Proben.

9. Schließen Sie die Gerätetür des QIAcube (siehe Abbildung 15 auf Seite 39).

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

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



Vergewissern Sie sich, dass beide Protokollteile (Teil A und Teil B) auf dem QIAcube installiert sind (siehe den Abschnitt „Installation von Protokollen auf dem QIAcube“ auf Seite 38).



Der QIAcube führt Beladungsprüfungen für Proben, Pipettenspitzen, Rotoradapter und Reagenzflaschen durch.

11. Wenn das Protokoll „PAXgene Blood RNA Part A“ beendet ist, öffnen Sie die Gerätetür des QIAcube (siehe Abbildung 15 auf Seite 39). Entnehmen und entsorgen Sie die PAXgene RNA Spinsäulen (PRC) aus den Rotoradaptern und die leeren Reaktionsröhrchen (PT) aus dem Schüttler.



Während des Laufs werden die Spinsäulen innerhalb des Rotoradapters vom Roboterarm von Position 1 (Deckelposition L1) nach Position 3 (Deckelposition L2) umgesetzt (siehe Abbildung 19 auf Seite 44).

12. Schließen Sie die Deckel aller 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (MCT) mit der aufgereinigten RNA in den Rotoradaptern (Position 3, Deckelposition L3; siehe Abbildung 19 auf Seite 44). Überführen Sie die 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (MCT) auf den Schüttleradapter des QIAcube (siehe Abbildung 17 auf Seite 42).

13. Schließen Sie die Gerätetür des QIAcube (siehe Abbildung 15 auf Seite 39).

14. Wählen Sie das Protokoll „PAXgene Blood RNA Part B“ aus und starten Sie das Protokoll. Befolgen Sie die Anweisungen, die auf dem Touchscreen des QIAcube angezeigt werden.



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

15. Öffnen Sie die Gerätetür des QIAcube (siehe Abbildung 15 auf Seite 39), wenn das Protokoll „PAXgene Blood RNA Part B“ beendet ist. Stellen Sie die Mikrozentrifugenröhrchen (MCT) mit der aufgereinigten RNA sofort auf Eis.



WARNHINWEIS: Heiße Oberfläche. Der Schüttler kann Temperaturen von bis zu 70 °C erreichen. Berühren Sie sie nicht, wenn sie aufgeheizt ist.



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

16. Wenn die RNA-Proben nicht sofort verwendet werden, lagern Sie sie bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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

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

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



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

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44\text{ }\mu\text{g/ml}$. Siehe Anhang B auf Seite 66.

17. Entnehmen Sie das Reagenzflaschengestell aus der QIAcube Arbeitsplattform (siehe Abbildung 17 auf Seite 42) und verschließen Sie alle Flaschen mit den entsprechend beschrifteten Deckeln. In den Flaschen können die Puffer bei Raumtemperatur (15 bis $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) für bis zu drei 3 Monate gelagert werden. Entnehmen Sie die Reaktionsröhrchen (PT) mitsamt Reagenzresten aus den Stellplätzen für Mikrozentrifugenröhrchen des QIAcube und entsorgen Sie diese (siehe Abbildung 17 auf Seite 42). Entfernen Sie die Rotoradapter aus der Zentrifuge und entsorgen Sie diese (siehe Abbildung 17 auf Seite 42). Leeren Sie die Abfallschublade des QIAcube (siehe Abbildung 15 auf Seite 39). Schließen Sie die Gerätetür des QIAcube und schalten Sie das Gerät mit dem Netzschalter aus (siehe Abbildung 15 auf Seite 39).

* Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (safety data sheets, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Hilfe zur Fehlerbehebung

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

Kommentare und Vorschläge

RNase ist abgebaut

RNase-Kontamination



Achten Sie sorgfältig darauf, dass Sie bei der Verarbeitung oder späteren Behandlung keine RNasen in die Reagenzien einschleppen (siehe Anhang A auf Seite 65).

Zu niedrige RNA-Ausbeute

a) Weniger als 2,5 ml Blut in das PAXgene Blood RNA Tube (BRT) entnommen



Stellen Sie sicher, dass 2,5 ml Blut in die PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) entnommen wird (siehe *PAXgene Blood RNA Tube Handbuch*).

b) RNA-Konzentration in Wasser gemessen



Die RNA muss in 10 mM Tris-HCl bei pH 7,5* verdünnt werden, damit eine genaue Quantifizierung möglich ist (siehe Anhang B auf Seite 66).

c) Zelltrümmer wurden in die PAXgene RNA Spinsäule (PRC) in den Schritten 9 und 10 des manuellen Protokolls überführt



Vermeiden Sie beim Pipettieren des Überstands in Schritt 7 des manuellen Protokolls, größere Partikel zu überführen (Überführung kleiner Zelltrümmer beeinträchtigt die Verarbeitung nicht).

* Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (safety data sheets, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Kommentare und Vorschläge

- d) Überstand in Schritt 3 nicht vollständig entfernt



Stellen Sie sicher, dass der gesamte Überstand entfernt wird. Wenn der Überstand dekantiert wird, entfernen Sie am Rand des PAXgene Blood RNA Tube (BRT) anhaftende Tröpfchen durch Abtupfen auf einem Papiertuch. Führen Sie angemessene Vorsichtsmaßnahmen durch, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

- e) Das Blut wurde nach Entnahme in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) weniger als 2 Stunden inkubiert



Inkubieren Sie das Blut nach der Entnahme in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) für mindestens 2 Stunden.

Niedriger A_{260}/A_{280} -Wert

- a) Zum Verdünnen der RNA für die A_{260}/A_{280} -Messung wurde Wasser verwendet
- b) Nullpunkt des Spektralphotometers nicht richtig eingestellt



Verwenden Sie 10 mM Tris-HCl bei pH 7,5, um die RNA vor dem Messen der Reinheit zu verdünnen* (siehe Anhang B auf Seite 66).



Stellen Sie den Nullpunkt des Spektralphotometers mit einer Leerprobe ein, welche die gleichen Anteile Elutionspuffer (BR5) und 10 mM Tris-HCl bei pH 7,5 enthält wie die zu messenden Proben. Der Elutionspuffer (BR5) absorbiert stark bei 220 nm, was zu hohen Hintergrundabsorptionswerten führen kann, wenn der Nullpunkt des Spektralphotometers nicht sachgemäß eingestellt wurde.

Gerätefehler

- QIAcube nicht ordnungsgemäß bedient

Lesen Sie bitte das *QIAcube Benutzerhandbuch* sorgfältig und insbesondere den Abschnitt Hilfe zur Fehlersuche. Stellen Sie sicher, dass der QIAcube ordnungsgemäß gewartet wird, wie im *QIAcube Benutzerhandbuch* beschrieben.

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

Anhang A: Allgemeine Hinweise zur Handhabung von RNA

Handhabung von RNA



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

Allgemeine Handhabung



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

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

Anhang B: Quantifizierung und Qualitätsbestimmung der Gesamt-RNA

Quantifizierung der Gesamt-RNA

Die Konzentration von RNA kann durch Messen der Absorption bei 260 nm (A_{260}) in einem Spektralphotometer bestimmt werden. Um die Signifikanz der Messwerte zu gewährleisten, müssen sie im linearen Bereich des Spektralphotometers liegen. Eine Absorption von 1 Einheit bei 260 nm entspricht 44 µg RNA pro ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$). Diese Gleichung gilt nur für Messungen in 10 mM Tris-HCl* bei pH 7,5. Falls die RNA-Probe verdünnt werden muss, muss dies daher in 10 mM Tris-HCl erfolgen. Wie weiter unten beschrieben (siehe Abschnitt „Reinheit der RNA“ auf Seite 67), ist das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und bei 280 nm eine Abschätzung der Reinheit der RNA. Stellen Sie beim Messen der RNA-Proben sicher, dass die Küvetten RNase-frei sind. Stellen Sie den Nullpunkt des Spektralphotometers mit einer Leerprobe ein, welche die gleichen Anteile Elutionspuffer (BR5) und Tris-HCl-Puffer enthält wie die zu messenden Proben. Der Elutionspuffer (BR5) absorbiert stark bei 220 nm, was zu hohen Hintergrundabsorptionswerten führen kann, wenn der Nullpunkt des Spektralphotometers nicht sachgemäß eingestellt wurde. Beispiel für die Berechnung der RNA-Quantifizierung.

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

* Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (safety data sheets, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Reinheit der RNA

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

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



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

Anweisungen zum Entfernen des BD Hemogard-Deckels

1. Greifen Sie die PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mit einer Hand, wobei Sie den Daumen unter den BD Hemogard Closure platzieren. (Weitere Stabilität erreichen Sie, wenn Sie

* 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.

Ihren Arm auf einer festen Unterlage abstützen.) Drehen Sie mit der anderen Hand den BD Hemogard Closure, während Sie gleichzeitig mit dem Daumen nach oben drücken, NUR BIS SICH DER STOPFEN IM RÖHRCHEN LÖST.

2. Nehmen Sie den Daumen weg, bevor Sie den Verschluss abheben. Nehmen Sie NICHT den Daumen, um den Verschluss vom PAXgene Blood RNA Tube (BRT) zu drücken. Achtung: Wenn Blut im PAXgene Blood RNA Tube (BRT) enthalten ist, besteht Expositionsgefahr. Um eine Verletzung beim Entfernen des Verschlusses zu vermeiden, ist es wichtig, dass der Daumen, mit dem der Verschluss nach oben gedrückt wird, keinen Kontakt mehr mit dem PAXgene Blood RNA Tube (BRT) hat, sobald der BD Hemogard-Deckel gelöst worden ist.
3. Heben Sie den Deckel vom PAXgene Blood RNA Tube (BRT) ab. In dem unwahrscheinlichen Fall, dass sich die Kunststoff-Kappe vom Gummistopfen löst, VERSUCHEN SIE NICHT, DEN VERSCHLUSS WIEDER ZUSAMMENZUSETZEN. Entfernen Sie vorsichtig den Gummistopfen vom PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Anweisungen zum Einsetzen des Secondary BD Hemogard Closure

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

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene RNA Spinsäulen, 50 PAXgene Shredder Spinsäulen, Reaktionsröhrchen, RNase-freie DNase I, RNase-freie Reagenzien und Puffer. Zur Verwendung mit den PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 Blutentnahmeröhrchen	762165
Produkte, die bei QIAGEN bestellt werden können		
Starter Pack, QIAcube	Lieferumfang des Pakets: Reagenzflaschengestelle (3); Etikettenstreifen für Gestelle (8); 200-µl- Filterspitzen (1.024); 1.000-µl- Filterspitzen (1.024); 1.000-µl- Filterspitzen mit weiter Öffnung (1.024); 30-ml-Reagenzflaschen (18); Rotoradapter (240); Rotoradapterhalter	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Sterile Einmal-Filterspitzen in Gestell	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Reagenzflaschen (30 ml) mit Deckel; 6er- Packung; zur Verwendung mit dem Reagenzflaschengestell des QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	Für 240 Präparationen: 240 Einmal- Rotoradapter; zur Verwendung mit dem QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Gestell zur Aufnahme von 6 x 30-ml- Reagenzflaschen auf der QIAcube Arbeitsplattform	990390
Rotor Adapter Holder	Halter für 12 Einmal-Rotoradapter; zur Verwendung mit dem QIAcube	990392

Produkte, die bei BD bestellt werden können*

Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 21G, 0,75-Zoll-Kanüle (0,8 x 19 mm), 12-Zoll-Schlauch (305 mm) mit Luer-Adapter; 50 pro Box, 200 pro Verpackungseinheit	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Verpackungseinheit nur für Durchmesser von 13 mm und 16 mm; 1.000 pro Verpackungseinheit	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm, 4,0-ml-Sog, mit rotem BD Hemogard Verschluss und Papieretikett; 100 pro Box, 1.000 pro Verpackungseinheit	368975

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

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Hinweise finden Sie jeweils im PreAnalytiX oder QIAGEN Kit-Handbuch oder in den Gebrauchsanweisungen. Die PreAnalytiX und QIAGEN Kit-Handbücher und Benutzerhandbücher sind verfügbar auf www.preanalytix.com und www.qiagen.com oder können vom technischen Service von PreAnalytiX angefordert werden.

Bearbeitungsverlauf des Handbuchs

Dokument und Bearbeitung	Änderungen	Datum
HB-0101-004, R2	Änderungen zur Einhaltung der GHS-Bestimmungen im gesamten Dokument	Juni 2015
HB-0101-005, R3	Neue Vorlage; Überarbeitungen von automatisierten Protokoll- und Leistungsdaten; Aktualisierung der Sicherheitsinformationen zur Einhaltung der GHS-Vorschriften; Änderungen der Gerätedetails und der Erklärung zu den Produktbenutzungsbedingungen.	Februar 2019
HB-0101-006, R3	Korrektur des Kitnamens in der Tabelle „Kit-Inhalt“ auf S. 5.	Januar 2020

PreAnalytiX Worldwide

PreAnalytiX Produkte werden von den QIAGEN und BD vertrieben

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

