

Ιανουάριος 2020

Εγχειρίδιο ΚΙΤ PAXgene® Blood RNA Kit

Έκδοση 2



50 (αρ. καταλόγου 762174)

R3 **MAT** 1120409EL

REF 762174



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Παράγεται από την QIAGEN GmbH για την PreAnalytiX

 **PreAnalytiX**
A QIAGEN / BD Company

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

Τα kit PAXgene Blood RNA Kit δεν είναι διαθέσιμα σε όλες τις χώρες. Παρακαλούμε πληροφορηθείτε σχετικά.

Άδεια περιορισμένης χρήσης

Η χρήση αυτού του προϊόντος ισοδυναμεί με την αποδοχή από πλευράς οποιοδήποτε αγοραστή ή χρήστη του PAXgene Blood RNA Kit των εξής όρων:

1. Η χρήση του PAXgene Blood RNA Kit επιτρέπεται μόνο σύμφωνα με το *Εγχειρίδιο kit PAXgene Blood RNA Kit* και μόνο μαζί με τα συστατικά που περιέχει το kit. Η PreAnalytiX δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του kit σε οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτά τα kit, εκτός και αν περιγράφεται διαφορετικά στο *Εγχειρίδιο kit PAXgene Blood RNA Kit* και στα πρόσθετα πρωτόκολλα που διατίθενται στον ιστότοπο www.preanalytix.com.
2. Με την εξαίρεση των ρητά αναφερόμενων αδειών, η PreAnalytiX δεν παρέχει καμία εγγύηση πως αυτό το kit και/ή η χρήση(εις) του δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το kit και τα συστατικά του φέρουν άδεια χρήσης για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση, η εκ νέου επεξεργασία ή η μεταπώλησή του.
4. Η PreAnalytiX αποποιείται ειδικά οποιαδήποτε άλλες άδειες, ρητές ή έμμεσες, εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής και ο χρήστης του kit συμφωνούν να μην προβούν και να μην επιτρέψουν σε άλλο πρόσωπο να προβεί σε ενέργειες οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν ή να διευκολύνουν τις ενέργειες που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα.
6. Η PreAnalytiX διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και θα αποζημιωθεί για όλες τις δαπάνες ανάκρισης και δικαστηρίου, συμπεριλαμβανομένων των δαπανών υπεράσπισης στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή αυτής της Άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιοδήποτε των πνευματικών δικαιωμάτων της σχετικά με το kit και/ή τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, βλ. www.preanalytix.com.

Πώληση υπό προϋποθέσεις

Το παρόν προϊόν συνοδεύεται από άδεια στα πλαίσια ορισμένων αξιώσεων των US-7,270,953 και US-7,682,790, καθώς και EP-1820793 B1 και αξιώσεων διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας τρίτων χωρών ισοδύναμων με τις αξιώσεις αυτών των διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας για την επεξεργασία του συμπλόκου νουκλεϊκών οξέων που σχηματίζεται κατά τη διαδικασία της συλλογής δείγματος σε ένα σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-006 BD-8945 1120409 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

PreAnalytiX Company

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Ελβετία

www.preanalytix.com

Διανομείς PreAnalytiX

Τα προϊόντα PreAnalytiX κατασκευάζονται για την PreAnalytiX από την QIAGEN ή BD και διανέμονται για την PreAnalytiX από την QIAGEN ή BD. Τα προϊόντα δεν μπορούν να παραγγελθούν από την PreAnalytiX GmbH.

Ανατρέξτε στην τελευταία σελίδα για πληροφορίες επικοινωνίας με τον τοπικό σας διανομέα της PreAnalytiX.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα του κιτ	5
Σύμβολα	7
Συνθήκες φύλαξης	9
Προβλεπόμενη χρήση	9
Περιορισμοί χρήσης του προϊόντος	10
Έλεγχος ποιότητας	10
Τεχνική υποστήριξη	10
Πληροφορίες ασφάλειας	11
Εισαγωγή.....	14
Αρχή λειτουργίας και διαδικασία.....	14
Δειγματοληψία και σταθεροποίηση.....	15
Συγκέντρωση και καθαρισμός RNA.....	20
Χειροκίνητη απομόνωση RNA.....	20
Αυτοματοποιημένη απομόνωση του RNA	30
Εξοπλισμός και αντιδραστήρια που παρέχονται από τον χρήστη	36
Σημαντικές σημειώσεις	38
Χρήση του QIAcube	38
Εκκίνηση του QIAcube	38
Εγκατάσταση πρωτοκόλλων στο QIAcube.....	38
Φόρτωση του QIAcube.....	40
Πρωτόκολλο: Χειροκίνητη απομόνωση του συνολικού RNA από ανθρώπινο ολικό αίμα συλλεγμένο σε σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	49


Πρωτόκολλο: Αυτοματοποιημένη απομόνωση του συνολικού RNA από ανθρώπινο ολικό αίμα συλλεγμένο σε σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	57
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων.....	64
Παράρτημα Α: Γενικές υποδείξεις για τον χειρισμό του RNA	66
Παράρτημα Β: Ποσοτικοποίηση και προσδιορισμός της ποιότητας του συνολικού RNA.....	67
Παράρτημα Γ: Χειρισμός των σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	69
Πληροφορίες παραγγελίας	71
Ιστορικό αναθεώρησης εγχειριδίου.....	73

Περιεχόμενα του KIT

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Αρ. καταλόγου			762174
Αριθμός παρασκευών			50
BR1	Resuspension Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα επαναιώρησης)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Δεσμευτικό ρυθμιστικό διάλυμα)*	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 1)*	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) (Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2 [συμπυκνωμένο διάλυμα])†	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-free Water (bottle) (Νερό ελεύθερο RNάσης [φιάλη])	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid) (Πρωτεϊνάση Κ [πράσινο κάλυμμα])	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (Στήλες διαχωρισμού PAXgene RNA [κόκκινο])	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (Σωληνάρια επεξεργασίας) (2 ml)	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures (Δευτερεύοντα κλείστρα BD Hemogard™)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (Σωληνάρια μικροφυγοκέντρησης) (1,5 ml)	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10

*Μη συμβατό με απολυμαντικά αντιδραστήρια που περιέχουν λευκαντικά χλωρίου. Περιέχει ένα άλας γουανιδίνης. Βλ. σελίδα 11 για πληροφορίες ασφάλειας.

† Το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2 (BR4) παρέχεται σε συμπυκνωμένη μορφή. Πριν από την πρώτη χρήση, προσθέστε στη φιάλη 4 όγκους αιθανόλης (96–100% βαθμός καθαρότητας p.a.) όπως υποδεικνύεται στη φιάλη για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας.

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Αρ. καταλόγου			762174
Αριθμός παρασκευών			50
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNάση I, ελεύθερη RNάσης [λυσφιλοποιημένη])	DNA REM	1500 μονάδες Kunitz*
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (Ρυθμιστικό διάλυμα κατάτμησης DNA [λευκό κάλυμμα])	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (Ρυθμιστικό διάλυμα επαναιώρησης DNάσης [σωληνάριο, μοβ κάλυμμα])	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (Στήλες διαχωρισμού PAXgene Shredder [μοβ])	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Εγχειρίδιο	Εγχειρίδιο κιτ PAXgene Blood RNA Kit (Έκδοση 2)		1

* Οι μονάδες Kunitz είναι η κοινή μονάδα μέτρησης της DNάσης I, οριζόμενη ως η ποσότητα DNάσης I που προκαλεί αύξηση της A_{260} κατά 0,001 ανά λεπτό ανά χιλιοστόλιτρο στους 25°C, pH 5,0, με υψηλά πολυμερισμένο DNA ως υπόστρωμα (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 και 363).

Σύμβολα



Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> εξετάσεις



Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης



Ημερομηνία λήξης



In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός παρτίδας



Αριθμός υλικού



Συστατικά



Αριθμός



Μέθοδος αποστείρωσης με χρήση ακτινοβολίας



Μονάδες Kunitz



Προσθήκη



Περιέχει



Ανασυσταθέν



Δεοξυριβονουκλεάση I



Αιθανόλη

GITC

Ισοθειοκυανική γουανιδίνη

RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

GTIN

Παγκόσμιος κωδικός μονάδων εμπορίας



Μην επαναχρησιμοποιείτε



Περιορισμός θερμοκρασίας



Ανω όριο θερμοκρασίας



Κατασκευαστής



Σημαντική σημείωση



Μετά την προσθήκη αιθανόλης στη φιάλη, σημειώστε την τρέχουσα ημερομηνία



Κατά την παραλαβή



Οδηγεί σε

Συνθήκες φύλαξης

Οι στήλες διαχωρισμού PAXgene RNA (PRC), οι στήλες διαχωρισμού PAXgene Shredder (PSC), η πρωτεΐνάση K (PK) και τα ρυθμιστικά διαλύματα (BR1, BR2, BR3, BR4 και BR5) μπορούν να φυλαχθούν υπό ξηρές συνθήκες στη θερμοκρασία που αναγράφεται στην ετικέτα του κιτ.

Το RNase-Free DNase Set, το οποίο περιέχει DNάση I (RNFD), ρυθμιστικό διάλυμα κατάτμησης DNA (RDD) και ρυθμιστικό διάλυμα επαναιώρησης DNάσης (DRB), αποστέλλεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Αμέσως μετά την παραλαβή, αποθηκεύστε όλα τα συστατικά του RNase-Free DNase Set στη θερμοκρασία που αναφέρεται στην ετικέτα. Εάν φυλαχθεί σωστά, το κιτ παραμένει σταθερό έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο κουτί του.

Προβλεπόμενη χρήση

Το κιτ PAXgene Blood RNA Kit χρησιμεύει στον καθαρισμό του ενδοκυτταρικού RNA από ολικό αίμα που συλλέγεται στο σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Όταν το κιτ χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT), το σύστημα παρέχει καθαρό ενδοκυτταρικό RNA από ολικό αίμα για την RT-PCR που χρησιμοποιείται στις μοριακές διαγνωστικές εξετάσεις. Βλ. το *Εγχειρίδιο σωληναρίου PAXgene Blood RNA Tube (PAXgene Blood RNA Tube Handbook)* για πληροφορίες σχετικά με τη χρήση των σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Τα χαρακτηριστικά απόδοσης για το σύστημα PAXgene Blood RNA System έχουν τεκμηριωθεί μόνο για τα μεταγραφήματα γονιδίων FOS και IL1B. Ο χρήστης είναι υπεύθυνος για την τεκμηρίωση των κατάλληλων χαρακτηριστικών απόδοσης του συστήματος PAXgene Blood RNA System για άλλα μεταγραφήματα-στόχους.

Περιορισμοί χρήσης του προϊόντος

Το kit PAXgene Blood RNA Kit προορίζεται για τον καθαρισμό ενδοκυτταρικού RNA από ανθρώπινο ολικό αίμα ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ λευκοκύτταρα/ml), για διαγνωστικές εφαρμογές in vitro. Δεν ενδείκνυται για τον καθαρισμό γονιδιωματικού DNA ή νουκλεϊκών οξέων ιών από ανθρώπινο ολικό αίμα. Επειδή οι αναφερόμενες στο εγχειρίδιο αυτό προδιαγραφές σταθεροποίησης ισχύουν για έναν περιορισμένο αριθμό μεταγραφημάτων (μεταγραφήματα γονιδίων FOS και IL1B), δεν έχουν τεκμηριωθεί τα χαρακτηριστικά απόδοσης για όλα τα μεταγραφήματα. Το εργαστηριακό προσωπικό πρέπει να ανασκοπήσει τα δεδομένα του κατασκευαστή και τα δεδομένα του εργαστηρίου για να καθορίσει εάν είναι απαραίτητη επικύρωση για άλλα μεταγραφήματα.

Το προϊόν προορίζεται για χρήση από επαγγελματίες, π.χ. τεχνολόγους και ιατρούς που έχουν εκπαιδευθεί σε διαγνωστικές διαδικασίες in vitro.

Έλεγχος ποιότητας

Σύμφωνα με το πιστοποιημένο κατά ISO σύστημα διαχείρισης ποιότητας της QIAGEN, ελέγχεται κάθε παρτίδα του kit PAXgene Blood RNA Kit έναντι προκαθορισμένων προδιαγραφών, για την εξασφάλιση μιας ομοιόμορφης ποιότητας του προϊόντος.

Τεχνική υποστήριξη

Στην QIAGEN είμαστε υπερήφανοι για την ποιότητα και τη διαθεσιμότητα της τεχνικής υποστήριξής μας. Τα τμήματα τεχνικής εξυπηρέτησης της εταιρείας μας είναι πλαισιωμένα με έμπειρους επιστήμονες με ευρεία πρακτική και θεωρητική γνώση στη μοριακή βιολογία και στη χρήση των προϊόντων της PreAnalytiX. Εάν έχετε ερωτήσεις που αφορούν το kit PAXgene Blood RNA Kit, μη διστάσετε να επικοινωνήσετε μαζί μας.

Για τεχνική υποστήριξη και περισσότερες πληροφορίες, παρακαλούμε καλέστε το τμήμα τεχνικής εξυπηρέτησης της QIAGEN.

Πληροφορίες ασφάλειας

Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά.

Για να αποφύγετε τον κίνδυνο μιας μόλυνσης (π.χ. με τους ιούς HIV ή ηπατίτιδας Β) ή τραυματισμού κατά την εργασία με βιολογικά και χημικά υλικά, θα πρέπει πάντοτε να φοράτε κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (safety data sheets, SDS). Διατίθενται στο διαδίκτυο σε εύχρηστη και συμπιεσμένη μορφή PDF στον ιστότοπο **www.preanalytix.com**, όπου μπορείτε να βρείτε, να δείτε και να εκτυπώσετε τα SDS για αυτό το kit.

ΠΡΟΣΟΧΗ



ΜΗΝ προσθέτετε λευκαντικά χλωρίου ή όξινα διαλύματα απευθείας στα υγρά απορρίμματα της παρασκευής δειγμάτων.

Το δεσμευτικό ρυθμιστικό διάλυμα (BR2) και το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 1 (BR3) περιέχουν θειοκυανική γουανιδίνη, η οποία κατά την επαφή με λευκαντικό χλωρίου αντιδρά έντονα. Εάν χυθεί δεσμευτικό ρυθμιστικό διάλυμα (BR2) ή ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 1 (BR3), καθαρίστε με κατάλληλο απορρυπαντικό εργαστηρίου και νερό. Εάν χυθεί υγρό που περιέχει δυνητικά μολυσματικούς παράγοντες, καθαρίστε την προσβεβλημένη περιοχή αρχικά με απορρυπαντικό εργαστηρίου και νερό και, στη συνέχεια, με 1% (v/v) υποχλωριώδες νάτριο.

Το μείγμα σταθεροποιητικού διαλύματος RNA και αίματος από το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) μπορεί να απολυμανθεί χρησιμοποιώντας 1 όγκο διαλύματος λευκαντικού χλωρίου του εμπορίου (5% υποχλωριώδες νάτριο) ανά 9 όγκους μείγματος σταθεροποιητικού διαλύματος RNA και αίματος.

Τα απορρίμματα που προκύπτουν κατά την παρασκευή των δειγμάτων, π.χ. τα υπερκείμενα υγρά από τα στάδια φυγοκέντρισης στη διαδικασία καθαρισμού του RNA, πρέπει να θεωρούνται πάντα δυνητικά μολυσματικά. Για την καταστροφή των μολυσματικών υλικών, πρέπει τα απορρίμματα, πριν από την τελική τους απομάκρυνση, να αποστειρωθούν σε αυτόκαυστο ή να αποτεφρωθούν. Η απόρριψη πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με τους επίσημους κανονισμούς.

Οι ακόλουθες δηλώσεις κινδύνου και προφύλαξης ισχύουν για τα συστατικά του κιτ PAXgene Blood RNA Kit. Βλ. το *Εγχειρίδιο σωληναρίου PAXgene Blood RNA Tube* για πληροφορίες ασφάλειας σχετικά με τα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Ρυθμιστικό διάλυμα BR2



Περιέχει: θειοκυανική γουανιδίνη. Κίνδυνος! Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης. Μπορεί να είναι επιβλαβές σε επαφή με το δέρμα ή σε περίπτωση εισπνοής. Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Επιβλαβές για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις. Σε επαφή με οξέα ελευθερώνονται πολύ τοξικά αέρια. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε. Καλέστε αμέσως το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή ένα γιατρό.

Ρυθμιστικό διάλυμα BR3



Περιέχει: αιθανόλη, θειοκυανική γουανιδίνη. Κίνδυνος! Υγρό και ατμοί εύφλεκτα. Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Σε επαφή με οξέα ελευθερώνονται πολύ τοξικά αέρια. Μακριά από θερμότητα/σπινθήρες/γυμνές φλόγες/θερμές επιφάνειες. Μην καπνίζετε. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με

νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε. Καλέστε αμέσως το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή ένα γιατρό.

DNάση I



Περιέχει: DNάση. Κίνδυνος! Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση. Μπορεί να προκαλέσει αλλεργία ή συμπτώματα άσθματος ή δύσπνοια σε περίπτωση εισπνοής. Αποφεύγετε να αναπνέετε σκόνη/ αναθυμιάσεις/ αέρια/ σταγονίδια/ ατμούς/ εκνεφώματα. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο. Να φοράτε μέσα ατομικής προστασίας της αναπνοής. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ έκθεσης ή πιθανής έκθεσης: Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή ένα γιατρό. Μεταφέρετε τον παθόντα στον καθαρό αέρα και αφήστε τον να ξεκουραστεί σε στάση που διευκολύνει την αναπνοή.

Πρωτεΐνάση K



Περιέχει: πρωτεΐνάση K. Κίνδυνος! Προκαλεί ήπιο ερεθισμό του δέρματος. Μπορεί να προκαλέσει αλλεργία ή συμπτώματα άσθματος ή δύσπνοια σε περίπτωση εισπνοής. Αποφεύγετε να αναπνέετε σκόνη/ αναθυμιάσεις/ αέρια/ σταγονίδια/ ατμούς/ εκνεφώματα. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο. Να φοράτε μέσα ατομικής προστασίας της αναπνοής. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ έκθεσης ή πιθανής έκθεσης: Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή ένα γιατρό. Μεταφέρετε τον παθόντα στον καθαρό αέρα και αφήστε τον να ξεκουραστεί σε στάση που διευκολύνει την αναπνοή.

Εισαγωγή

Το πρώτο βήμα σε πολλές μοριοβιολογικές αναλύσεις κυτταρικού RNA είναι η λήψη δείγματος ολικού αίματος. Το κύριο πρόβλημα σε αυτές τις περιπτώσεις είναι η αστάθεια του προφίλ του κυτταρικού RNA in vitro. Μελέτες της PreAnalytiX έδειξαν ότι ο αριθμός αντιγράφων, για μεμονωμένα είδη mRNA στο ολικό αίμα, μπορεί να αλλάξει περισσότερο από το 1.000-πλάσιο κατά τη διάρκεια της φύλαξης ή της μεταφοράς σε θερμοκρασία δωματίου.* Αυτό οφείλεται τόσο στην ταχεία αποδόμηση του RNA όσο και στην επαγόμενη έκφραση ορισμένων γονιδίων, μετά τη λήψη αίματος. Τέτοιου είδους αλλαγές του προφίλ έκφρασης RNA εμποδίζουν την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων από μελέτες έκφρασης γονιδίων. Για το λόγο αυτό, μία μέθοδος που διατηρεί το προφίλ έκφρασης RNA κατά τη διάρκεια και μετά τη λήψη αίματος θεωρείται ουσιαστική για ακριβείς αναλύσεις έκφρασης γονιδίων στο ολικό αίμα ανθρώπου.

Αρχή λειτουργίας και διαδικασία

Η PreAnalytiX ανέπτυξε ένα νέο σύστημα το οποίο καθιστά δυνατή τη λήψη, τη σταθεροποίηση, τη φύλαξη και τη μεταφορά δειγμάτων ολικού αίματος ανθρώπου, καθώς και ένα γρήγορο και αποτελεσματικό πρωτόκολλο για τον καθαρισμό του ενδοκυτταρικού RNA. Το σύστημα προϋποθέτει τη χρήση σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, διπλώματα ευρεσιτεχνίας Η.Π.Α. 6,602,718 και 6,617,170) για τη λήψη αίματος και τη σταθεροποίηση του RNA, και του κιτ PAXgene Blood RNA Kit για τον επακόλουθο χειροκίνητο ή αυτοματοποιημένο καθαρισμό του RNA. Και τα δύο πρωτόκολλα, χειροκίνητο και αυτοματοποιημένο, παρέχουν ουσιαστικά ισάξια εκτέλεση σχετικά με την ποιότητα και απόδοση του RNA. Στο εγχειρίδιο αυτό περιέχονται τα δεδομένα της εκτέλεσης του χειροκίνητου (σελίδες 23–30) και του αυτοματοποιημένου πρωτοκόλλου (σελίδες 33–35).

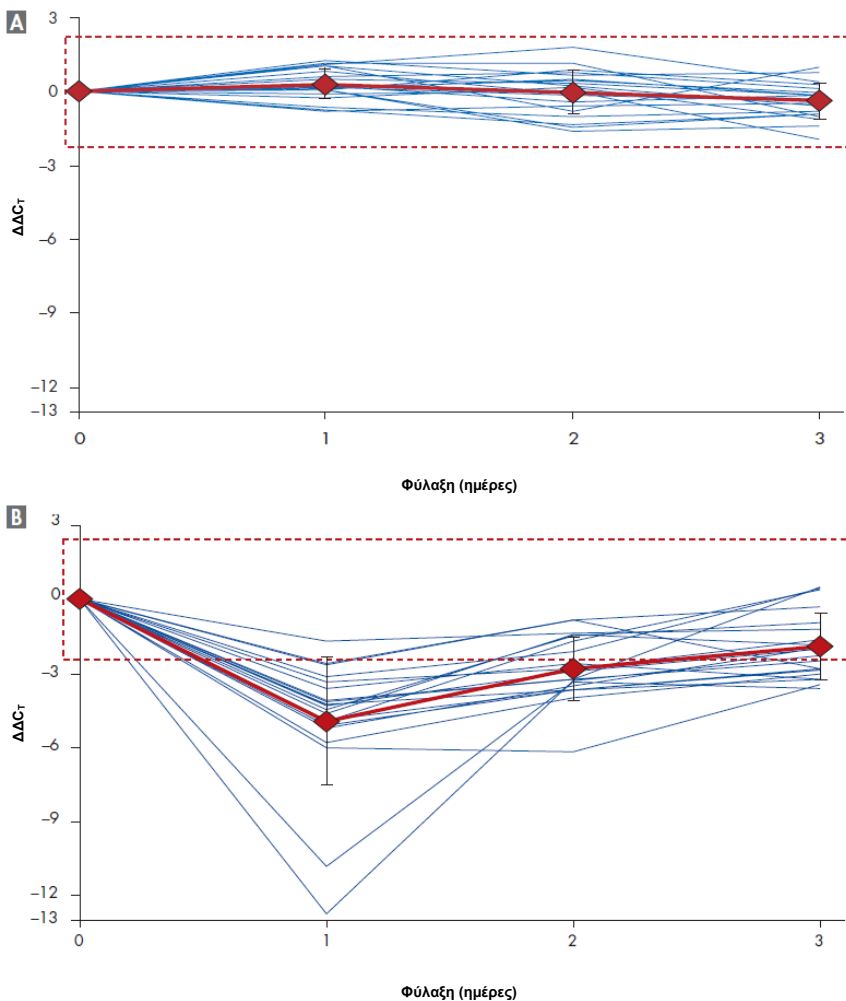
* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

Δειγματοληψία και σταθεροποίηση

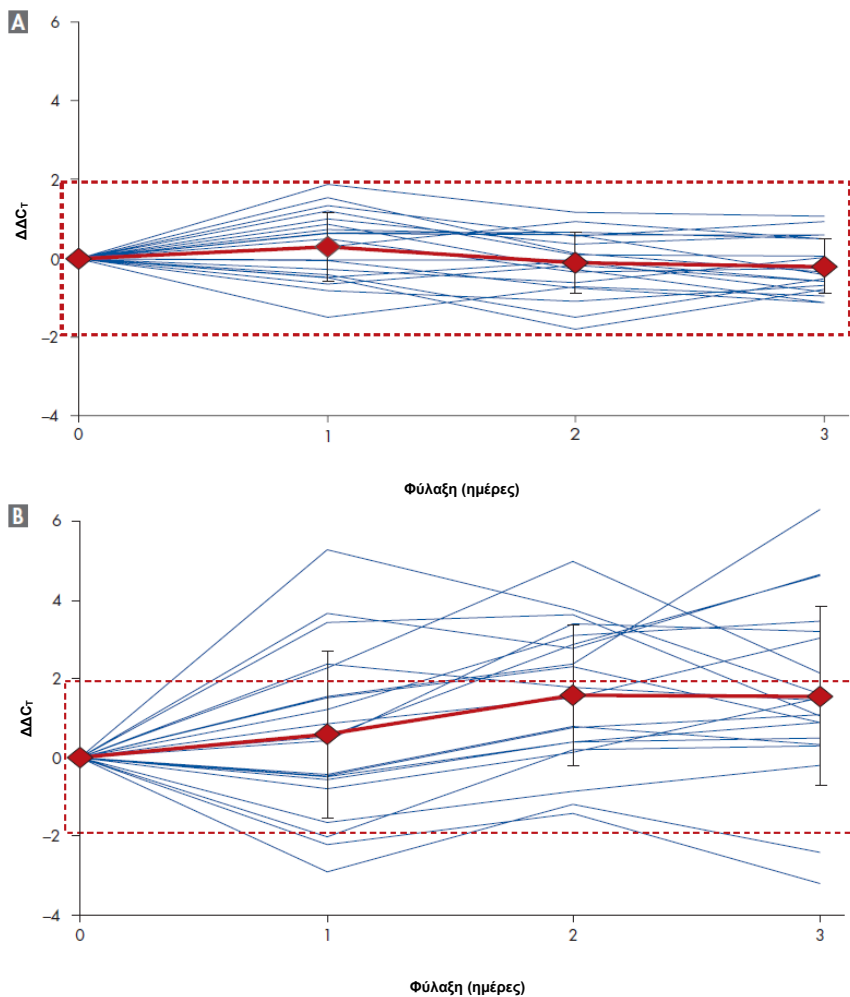
Τα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) περιέχουν ένα ιδιόκτητο αντιδραστήριο το οποίο βασίζεται σε μία κατοχυρωμένη τεχνολογία σταθεροποίησης RNA. Το αντιδραστήριο αυτό προστατεύει το μοριακό RNA από την αποδόμηση μέσω της RNάσης και μειώνει στο ελάχιστο αλλαγές *ex vivo* στην έκφραση γονιδίων. Τα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) προορίζονται για τη λήψη ανθρώπινου ολικού αίματος και τη σταθεροποίηση κυτταρικού RNA για έως 3 ημέρες στους 18–25°C (εικόνες 1 και 2, σελίδες 16 και 17) ή έως 5 ημέρες στους 2–8°C (εικόνες 3 και 4, σελίδες 18 και 19). Προς το παρόν, τα διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι το κυτταρικό RNA παραμένει σταθερό το λιγότερο για 11 έτη στους –20°C ή –70°C*. Για περισσότερες πληροφορίες από τρέχουσες μελέτες που αξιολογούν τη σταθερότητα για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, παρακαλούμε επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής εξυπηρέτησης της QIAGEN.

Η πραγματική διάρκεια της σταθεροποίησης του RNA μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το είδος κυτταρικού RNA και την καθοδική (downstream) εφαρμογή που χρησιμοποιείται. Επειδή οι αναφερόμενες στο εγχειρίδιο αυτό προδιαγραφές σταθεροποίησης ισχύουν για έναν περιορισμένο αριθμό μεταγραφημάτων (μεταγραφήματα γονιδίων FOS και IL1B), δεν έχουν τεκμηριωθεί τα χαρακτηριστικά απόδοσης για όλα τα μεταγραφήματα. Το εργαστηριακό προσωπικό πρέπει να ανασκοπήσει τα δεδομένα του κατασκευαστή και τα δεδομένα του εργαστηρίου για να καθορίσει εάν είναι απαραίτητη επικύρωση για άλλα μεταγραφήματα.

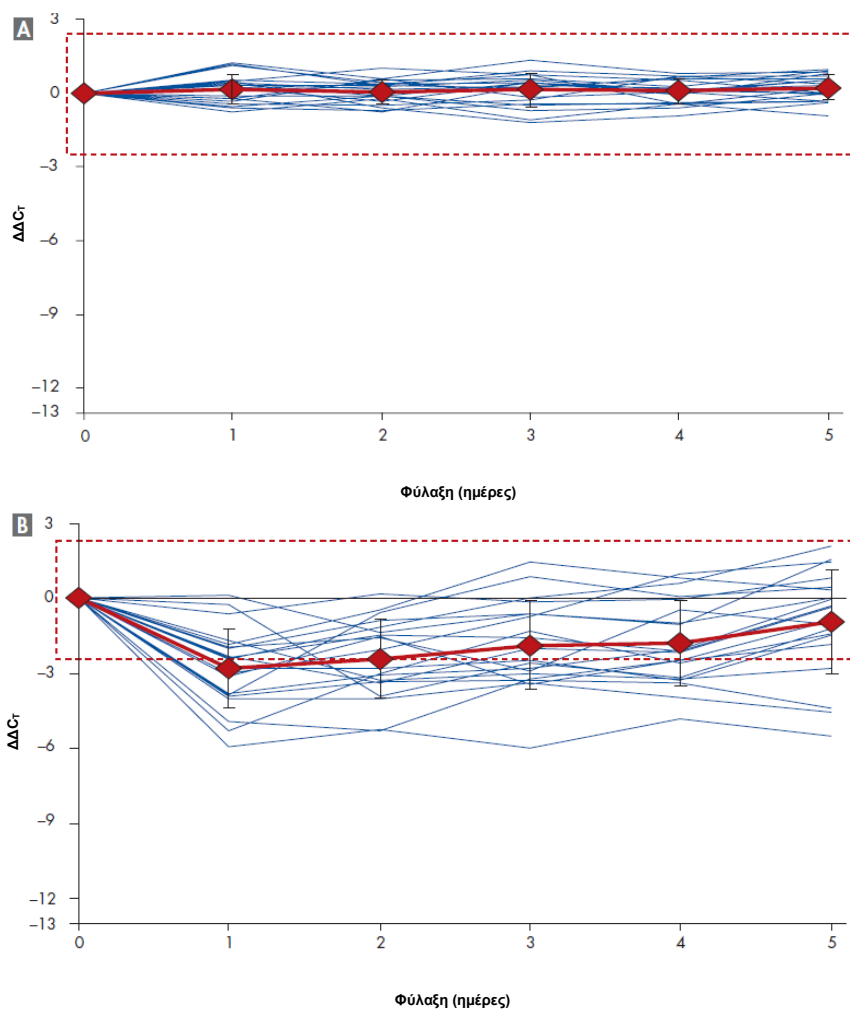
* Μια μακροχρόνια μελέτη της φύλαξης αίματος στα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes βρίσκεται σε εξέλιξη.



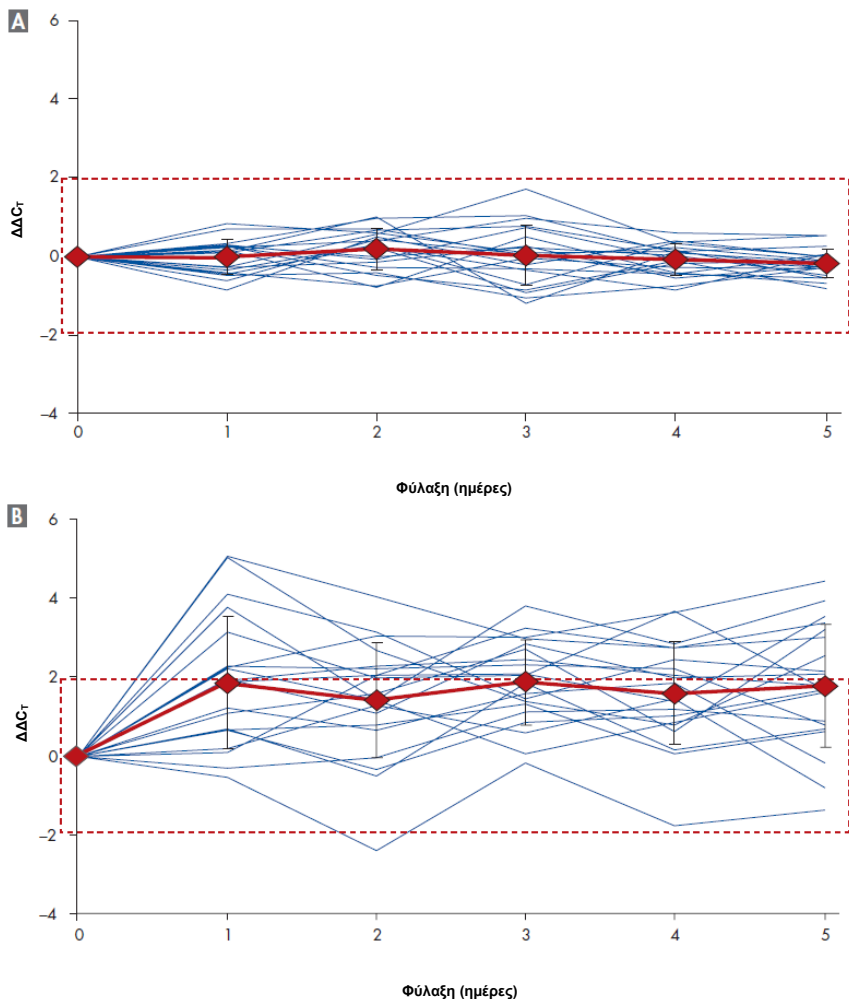
Εικόνα 1. Σταθερότητα RNA σε δείγματα αίματος στους 18–25°C: FOS. Λήψη δειγμάτων αίματος από 10 δότες, τα οποία αποθηκεύτηκαν στους 18–25°C για τον αναγραφόμενο αριθμό ημερών, πριν από την απομόνωση του συνολικού RNA· όλα τα δείγματα λήφθηκαν εις διπλούν. **[A]** Λήψη αίματος και φύλαξη σε σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), απομόνωση του συνολικού RNA με το kit PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Λήψη αίματος και φύλαξη σε τυπικά σωληνάρια λήψης αίματος με EDTA ως αντιπηκτικό, και απομόνωση του συνολικού RNA με μια τυπική μέθοδο εκχύλισης (με οργανικά μέσα) με καθαρισμό του RNA βασιζόμενο σε μεμβράνη διοξειδίου του πυριτίου. Τα σχετικά επίπεδα μεταγραφωμάτων FOS καθορίστηκαν μέσω duplex RT-PCR πραγματικού χρόνου, χρησιμοποιώντας 18S rRNA ως εσωτερικό πρότυπο. Οι τιμές όλων των δειγμάτων που αναλύθηκαν σχεδιάστηκαν με μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν την \pm 3πλάσια συνολική ακρίβεια της μεθόδου ($2,34 C_T$).



Εικόνα 2. Σταθερότητα RNA σε δείγματα αίματος στους 18–25°C: IL1B. Η λήψη αίματος και η απομόνωση του συνολικού RNA, μετά από φύλαξη στους 18–25°C, πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στην εικόνα 1. Τα σχετικά επίπεδα μεταγραφημάτων IL1B καθορίστηκαν μέσω duplex RT-PCR πραγματικού χρόνου, χρησιμοποιώντας 18S rRNA ως εσωτερικό πρότυπο. Οι τιμές όλων των δειγμάτων που αναλύθηκαν σχεδιάστηκαν με μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν την \pm 3πλάσια συνολική ακρίβεια της μεθόδου (1,93 C_T).



Εικόνα 3. Σταθερότητα RNA σε δείγματα αίματος στους 2–8°C: FOS. Λήψη δειγμάτων αίματος από 10 δότες, τα οποία αποθηκεύτηκαν στους 2–8°C για τον αναγραφόμενο αριθμό ημερών, πριν από την απομόνωση του συνολικού RNA: όλα τα δείγματα λήφθηκαν εις διπλούν. **[A]** Λήψη αίματος και φύλαξη σε σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), απομόνωση του συνολικού RNA με το kit PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Λήψη αίματος και φύλαξη σε τυπικά σωληνάρια λήψης αίματος με EDTA ως αντιπηκτικό, και απομόνωση του συνολικού RNA με μια τυπική μέθοδο εκχύλισης (με οργανικά μέσα) με καθαρισμό του RNA βασισμένο σε μεμβράνη διοξειδίου του πυριτίου. Τα σχετικά επίπεδα μεταγραφημάτων FOS καθορίστηκαν μέσω duplex RT-PCR πραγματικού χρόνου, χρησιμοποιώντας 18S rRNA ως εσωτερικό πρότυπο. Οι τιμές όλων των δειγμάτων που αναλύθηκαν σχεδιάστηκαν με μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν την \pm 3πλάσια συνολική ακρίβεια της μεθόδου (2,34 C_T).



Εικόνα 4. Σταθερότητα RNA σε δείγματα αίματος στους 2–8°C: IL1B. Η λήψη αίματος και η απομόνωση του συνολικού RNA, μετά από φύλαξη στους 2–8°C, πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στην εικόνα 3. Τα σχετικά επίπεδα μεταγραφημάτων IL1B καθορίστηκαν μέσω duplex RT-PCR πραγματικού χρόνου, χρησιμοποιώντας 18S rRNA ως εσωτερικό πρότυπο. Οι τιμές όλων των δειγμάτων που αναλύθηκαν σχεδιάστηκαν με μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν την \pm 3πλάσια συνολική ακρίβεια της μεθόδου (1,93 C_T).

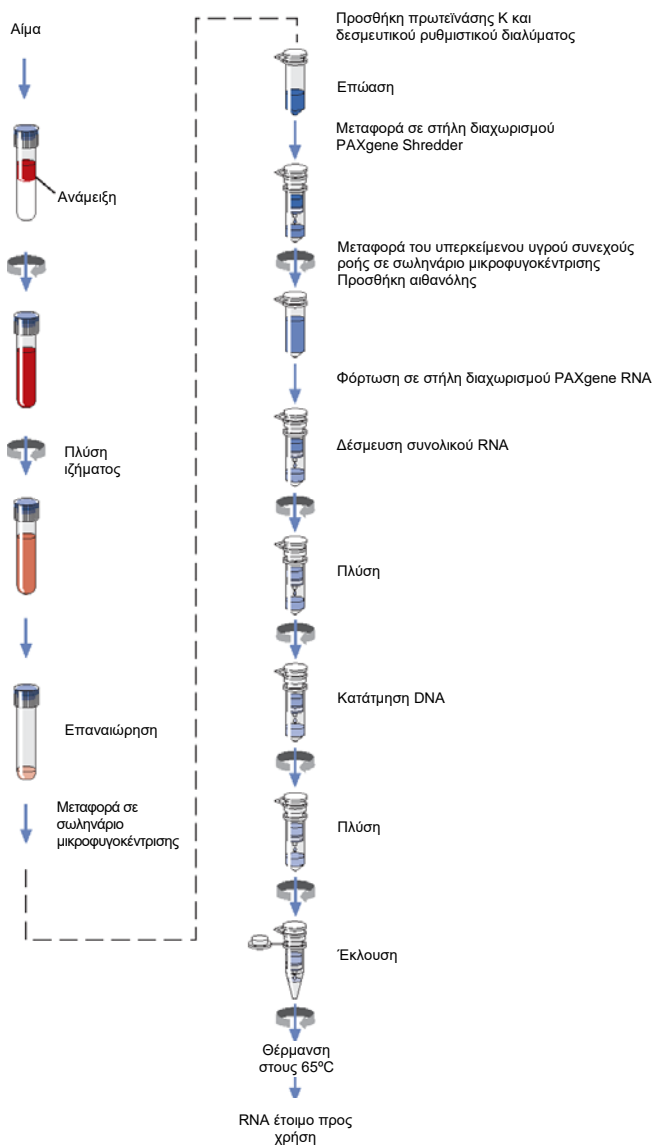
Συγκέντρωση και καθαρισμός RNA

Το kit PAXgene Blood RNA Kit προορίζεται για την απομόνωση του συνολικού RNA από 2,5 ml ανθρώπινου ολικού αίματος που συλλέγεται σε ένα σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Η διαδικασία είναι απλή και μπορεί να εκτελεσθεί με χρήση χειροκίνητων ή αυτοματοποιημένων διαδικασιών (βλ. εικόνες 5 και 10, σελίδες 21 και 31). Και στα δύο πρωτόκολλα, η απομόνωση του RNA αρχίζει με ένα στάδιο φυγοκέντρισης, για την ιζηματοποίηση των νουκλεϊκών οξέων στο σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Το ίζημα πλένεται και επαναιωρείται και ακολουθεί η χειροκίνητη ή αυτοματοποιημένη απομόνωση του RNA. Ουσιαστικά και τα δύο πρωτόκολλα ακολουθούν τα ίδια στάδια με τα ίδια συστατικά του kit.

Χειροκίνητη απομόνωση RNA

Λεπτομερέστερα, το επαναιωρημένο ίζημα επωάζεται σε βελτιστοποιημένα ρυθμιστικά διαλύματα με πρωτεΐνάση K (PK), για την κατάτμηση των πρωτεϊνών. Μία πρόσθετη φυγοκέντρωση, μέσω στήλης διαχωρισμού PAXgene Shredder (PSC), αποσκοπεί στην ομογενοποίηση του κυτταρολύματος και την απομάκρυνση των υπολειμμάτων των κατακερματισμένων κυττάρων· το υπερκείμενο υγρό του κλάσματος συνεχούς ροής μεταφέρεται σε ένα νέο σωληνάριο μικροφυγοκέντρισης. Με την αιθανόλη που προστίθεται στη συνέχεια, ρυθμίζονται κατάλληλες συνθήκες δέσμευσης και το παράγωγο λύσης εφαρμόζεται σε στήλη διαχωρισμού PAXgene RNA (PRC). Με την ακόλουθη σύντομη φυγοκέντρωση, δεσμεύεται επιλεκτικά RNA στη μεμβράνη διοξειδίου του πυριτίου PAXgene, ενώ οι ουσίες επιμόλυνσης διέρχονται μέσω αυτής. Υπολειπόμενες ουσίες επιμόλυνσης απομακρύνονται με πολλαπλά αποτελεσματικά βήματα πλύσης. Μεταξύ πρώτης και δεύτερης πλύσης, η μεμβράνη υποβάλλεται σε επεξεργασία με DNάση I (RNFD), για την απομάκρυνση τυχόν δεσμευμένων ιχνοποσοτήτων DNA. Μετά τα βήματα πλύσης, το RNA εκλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης (BR5) και μετουσιώνεται μέσω θέρμανσης.

Το συνολικό RNA που απομονώνεται με το σύστημα PAXgene Blood RNA System είναι καθαρό. Χρησιμοποιώντας το χειροκίνητο πρωτόκολλο, οι τιμές A_{260}/A_{280} είναι μεταξύ 1,8 και 2,2 ενώ $\leq 1\%$ (w/w) του γονιδιωματικού DNA είναι παρόν σε $\geq 95\%$ όλων των δειγμάτων, όπως μετρείται από την ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου μιας αλληλουχίας του γονιδίου β-ακτίνης. Τουλάχιστον 95% των δειγμάτων δεν δείχνουν αναστολή στην RT-PCR, όταν χρησιμοποιείται μέχρι 30% του εκλούσματος.

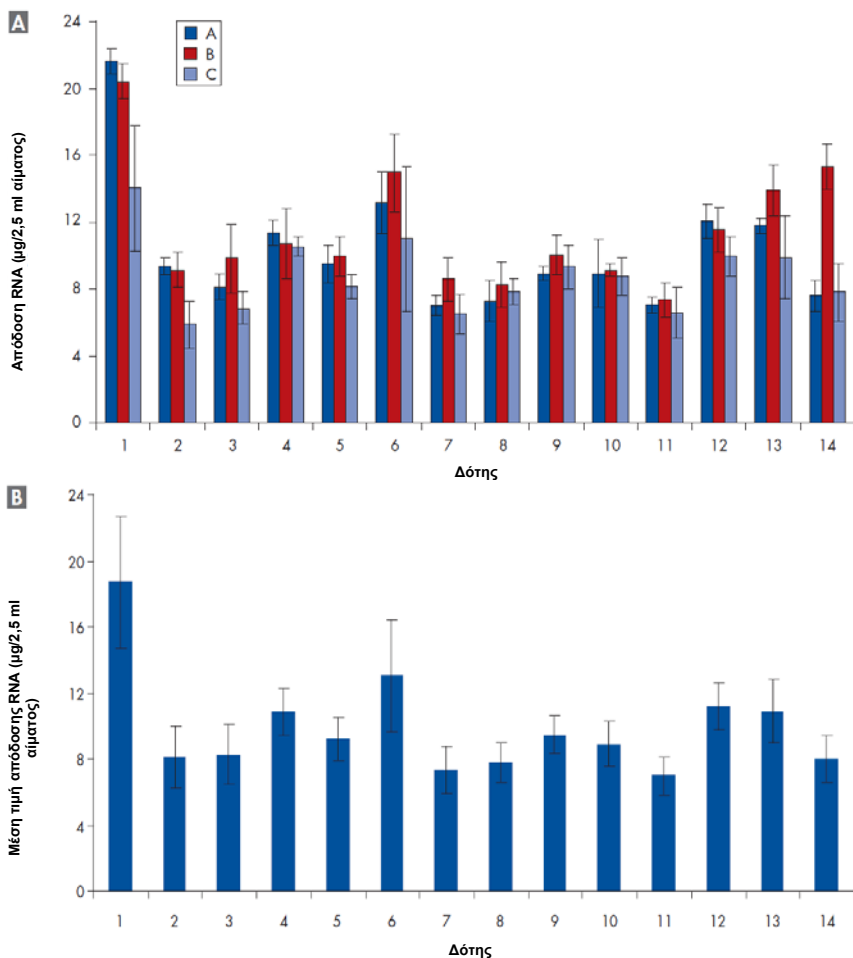


Εικόνα 5. Η χειροκίνητη διαδικασία PAXgene Blood RNA.

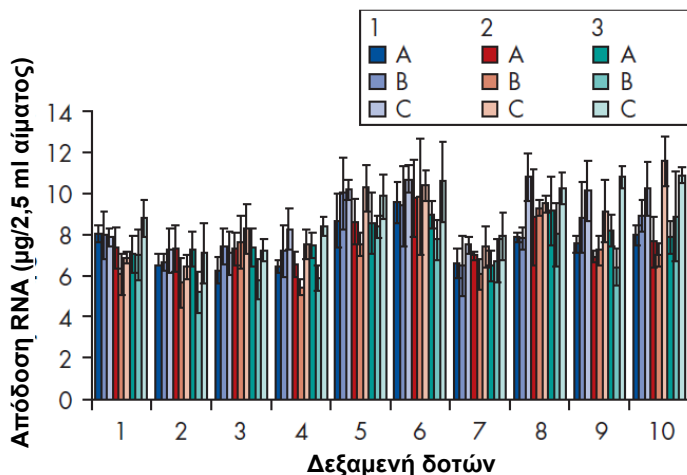
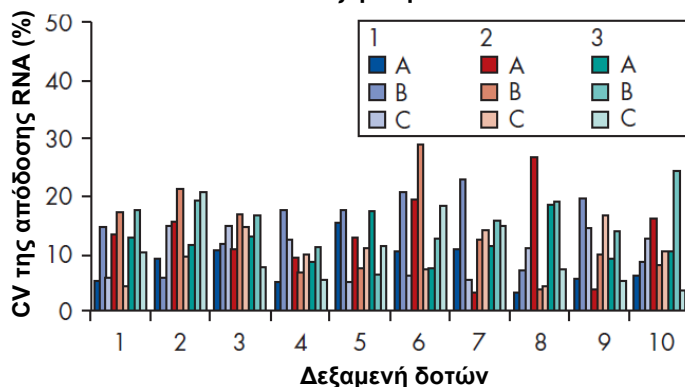
Χρησιμοποιώντας το χειροκίνητο πρωτόκολλο, ο μέσος χρόνος παρασκευής του δείγματος (με βάση τα δεδομένα από την παρασκευή 12 δειγμάτων) είναι περίπου 90 λεπτά*, ενώ ο καθαρός χρόνος χειρισμού είναι μόνο 40 λεπτά. Σε πάνω από 95% των δειγμάτων που υποβάλλονται σε επεξεργασία, επιτυγχάνεται μία απόδοση RNA ≥ 3 μ g από 2,5 ml ολικού αίματος υγιών δοτών. Καθώς οι αποδόσεις εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τους εξεταζόμενους δότες, μπορεί οι μεμονωμένες αποδόσεις να ποικίλλουν. Κατά την εξέταση μεμονωμένων ατόμων, το σύστημα PAXgene Blood RNA παρέχει σε υψηλό βαθμό αναπαραγωγίμες και επαναλήψιμες αποδόσεις (εικόνες 6 και 7, σελίδες 23 και 24) και αναπαραγωγή και επαναλήψιμη RT-PCR (εικόνες 8 και 9, σελίδες 28 και 29), γεγονός το οποίο το καθιστά εξαιρετικά αξιόπιστο για κλινικές διαγνωστικές εξετάσεις.

Η εικόνα 6 (σελίδα 23) δείχνει την αναπαραγωγιμότητα και επαναληψιμότητα του συστήματος PAXgene Blood RNA System. Σε περαιτέρω μελέτες εξετάστηκε η επίδραση διαφορετικών παρτίδων του κιτ PAXgene Blood RNA Kit καθώς και διαφορετικών χειριστών που εκτελούν τις εξετάσεις στην αναπαραγωγιμότητα της απόδοσης του RNA και στα αποτελέσματα απόδοσης της RT-PCR πραγματικού χρόνου. Επειδή για τις εξετάσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από δεξαμενή αίματος και όχι αίμα από μεμονωμένα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), τα αποτελέσματα των μελετών αυτών δεν αντανακλούν την επαναληψιμότητα του συστήματος ούτε τις διακυμάνσεις μεταξύ μεμονωμένων αιμοληψιών, αλλά απλώς και μόνο την επαναληψιμότητα της παρασκευής του δείγματος (βλ. εικόνα 7, σελίδα 24).

* Συνολικός χρόνος εκτέλεσης του πρωτοκόλλου, συμπεριλαμβανομένου του χειρισμού των σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes που προηγείται (φυγοκεντρίσεις, πλύση ιζήματος και επαναιώρηση ιζήματος).



Εικόνα 6. Αναπαραγωγή και επαναλήψιμη απομόνωση του RNA. Δείγματα αίματος εις τετραπλούν από 14 δότες υποβλήθηκαν σε χειροκίνητη επεξεργασία από καθέναν από 3 τεχνολόγους (Α, Β, C). Χρησιμοποιήθηκαν τρία σύνολα εξοπλισμού, και όλα τα δείγματα που παρασκευάστηκαν από τον κάθε τεχνολόγο υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με χρήση του ίδιου εξοπλισμού. **[Α]** Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις της απόδοσης RNA ανά επαναλαμβανόμενο δείγμα από τους ίδιους δότες και διαφορετικούς τεχνολόγους. **[Β]** Δώδεκα επαναλαμβανόμενα δείγματα αίματος από καθέναν από τους 14 δότες υποβλήθηκαν σε επεξεργασία από 3 διαφορετικούς τεχνολόγους. Παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις της απόδοσης RNA ανά δείγμα από τους ίδιους δότες και όλους τους τεχνολόγους. Για όλα τα δείγματα RNA, οι αναλογίες A_{260}/A_{280} κυμαίνονταν από 1,8 έως 2,2.

A**B**

Εικόνα 7. Επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα της απόδοσης του RNA από διαφορετικούς χειριστές και παρτίδες PAXgene Blood RNA Kit με χρήση δεξαμενοποιημένων δειγμάτων. Από 30 διαφορετικούς δότες συλλέχθηκαν δείγματα αίματος σε σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) (12 σωληνάρια ανά δότη, συνολικά 360 σωληνάρια). Το περιεχόμενο των σωληναρίων από 3 δότες δεξαμενοποιήθηκε και, στη συνέχεια, κλασματοποιήθηκε εκ νέου σε 36 δείγματα. Τα 36 αυτά δείγματα ανά δεξαμενή 3 δοτών εξετάσθηκαν χειροκίνητα από 3 διαφορετικούς χειριστές. Κάθε χειριστής χρησιμοποίησε για την εκχύλιση 3 διαφορετικές παρτίδες του kit PAXgene Blood RNA Kit και εξέτασε δείγματα εις τετραπλούν από καθεμία από τις 10 δεξαμενές δοτών. **[A]** Απόδοση RNA και τυπική απόκλιση για κάθε συνδυασμό χειριστή-παρτίδας. Δείγματα αίματος εις τετραπλούν από 10 δεξαμενές δοτών υποβλήθηκαν σε επεξεργασία από 3 διαφορετικούς χειριστές (A, B, C) με κάθε μία από τις 3 παρτίδες kit (1, 2, 3). Παρουσιάζονται οι μέσες αποδόσεις (στήλες) και οι τυπικές αποκλίσεις (ράβδοι σφαλμάτων) ανά τετραπλό δείγμα από την ίδια δεξαμενή δοτών για διαφορετικούς χειριστές και διαφορετικές παρτίδες kit. **[B]** Υπολογισμός του συντελεστή μεταβλητότητας (CV) της απόδοσης RNA ανά δεξαμενή δοτών για όλους τους συνδυασμούς χειριστή-παρτίδας (A, B, C· 1, 2, 3) από τις μέσες τιμές και τις τυπικές αποκλίσεις της απόδοσης που εμφανίζονται στην εικόνα 7A.

Πίνακας 1Α. Αναπαραγωγιμότητα εντός κάθε παρτίδας και για κάθε χρήστη για επιλεγμένες δεξαμενές δοτών (1, 6, 9, 10)

Συνδυασμός δεδομένων	Δεξαμενή δοτών 1 5,1 x 10 ⁶ κύτταρα/ml			Δεξαμενή δοτών 6 6,5 x 10 ⁶ κύτταρα/ml		
	Μέση απόδοση (μg)	SD (μg)	CV (%)	Μέση απόδοση (μg)	SD (μg)	CV (%)
Παρτίδα 1, χρήστης Α	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
Παρτίδα 1, χρήστης Β	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
Παρτίδα 1, χρήστης C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
Παρτίδα 2, χρήστης Α	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
Παρτίδα 2, χρήστης Β	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
Παρτίδα 2, χρήστης C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
Παρτίδα 3, χρήστης Α	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
Παρτίδα 3, χρήστης Β	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
Παρτίδα 3, χρήστης C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
Συνδυασμός δεδομένων	Δεξαμενή δοτών 9 8,4 x 10 ⁶ κύτταρα/ml			Δεξαμενή δοτών 10 10,2 x 10 ⁶ κύτταρα/ml		
	Μέση απόδοση (μg)	SD (μg)	CV (%)	Μέση απόδοση (μg)	SD (μg)	CV (%)
Παρτίδα 1, χρήστης Α	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
Παρτίδα 1, χρήστης Β	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Παρτίδα 1, χρήστης C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Παρτίδα 2, χρήστης Α	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Παρτίδα 2, χρήστης Β	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Παρτίδα 2, χρήστης C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Παρτίδα 3, χρήστης Α	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Παρτίδα 3, χρήστης Β	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Παρτίδα 3, χρήστης C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3

Πίνακας 1Β. Αναπαραγωγιμότητα μεταξύ όλων των παρτίδων κιτ για κάθε χρήστη για επιλεγμένες δεξαμενές δοτών (1, 6, 9, 10)

Συνδυασμός δεδομένων	Δεξαμενή δοτών 1 5,1 x 10 ⁶ κύτταρα/ml			Δεξαμενή δοτών 6 6,5 x 10 ⁶ κύτταρα/ml		
	Μέση απόδοση (μg)	SD (μg)	CV (%)	Μέση απόδοση (μg)	SD (μg)	CV (%)
Χρήστης Α, όλες οι παρτίδες	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Χρήστης Β, όλες οι παρτίδες	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Χρήστης C, όλες οι παρτίδες	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Συνδυασμός δεδομένων	Δεξαμενή δοτών 9 8,4 x 10 ⁶ κύτταρα/ml			Δεξαμενή δοτών 10 10,2 x 10 ⁶ κύτταρα/ml		
	Μέση απόδοση (μg)	SD (μg)	CV (%)	Μέση απόδοση (μg)	SD (μg)	CV (%)
Χρήστης Α, όλες οι παρτίδες	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Χρήστης Β, όλες οι παρτίδες	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Χρήστης C, όλες οι παρτίδες	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

Πίνακας 1Γ. Αναπαραγωγιμότητα εντός κάθε παρτίδας και μεταξύ όλων των χρηστών για επιλεγμένες δεξαμενές δοτών (1, 6, 9, 10)

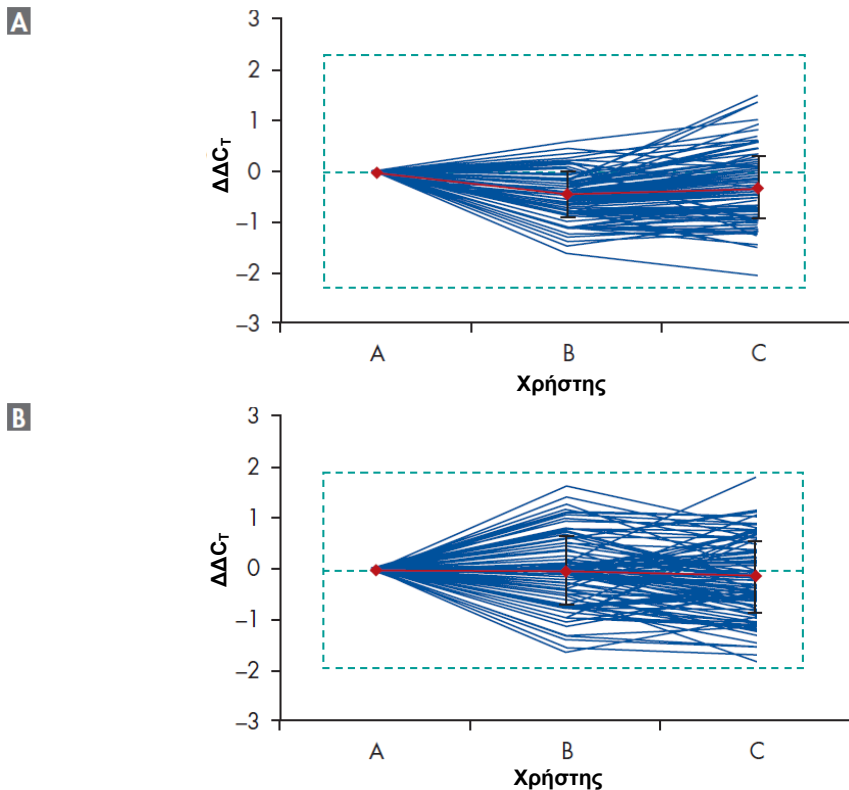
Συνδυασμός δεδομένων	Δεξαμενή δοτών 1 5,1 x 10 ⁶ κύτταρα/ml			Δεξαμενή δοτών 6 6,5 x 10 ⁶ κύτταρα/ml		
	Μέση απόδοση (μg)	SD (μg)	CV (%)	Μέση απόδοση (μg)	SD (μg)	CV (%)
Παρτίδα 1, όλοι οι χρήστες	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Παρτίδα 2, όλοι οι χρήστες	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Παρτίδα 3, όλοι οι χρήστες	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Συνδυασμός δεδομένων	Δεξαμενή δοτών 9 8,4 x 10 ⁶ κύτταρα/ml			Δεξαμενή δοτών 10 10,2 x 10 ⁶ κύτταρα/ml		
	Μέση απόδοση (μg)	SD (μg)	CV (%)	Μέση απόδοση (μg)	SD (μg)	CV (%)
Παρτίδα 1, όλοι οι χρήστες	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Παρτίδα 2, όλοι οι χρήστες	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Παρτίδα 3, όλοι οι χρήστες	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

Πίνακας 1Δ. Αναπαραγωγιμότητα μεταξύ όλων των παρτίδων και όλων των χρηστών για επιλεγμένες δεξαμενές δοτών (1, 6, 9, 10)

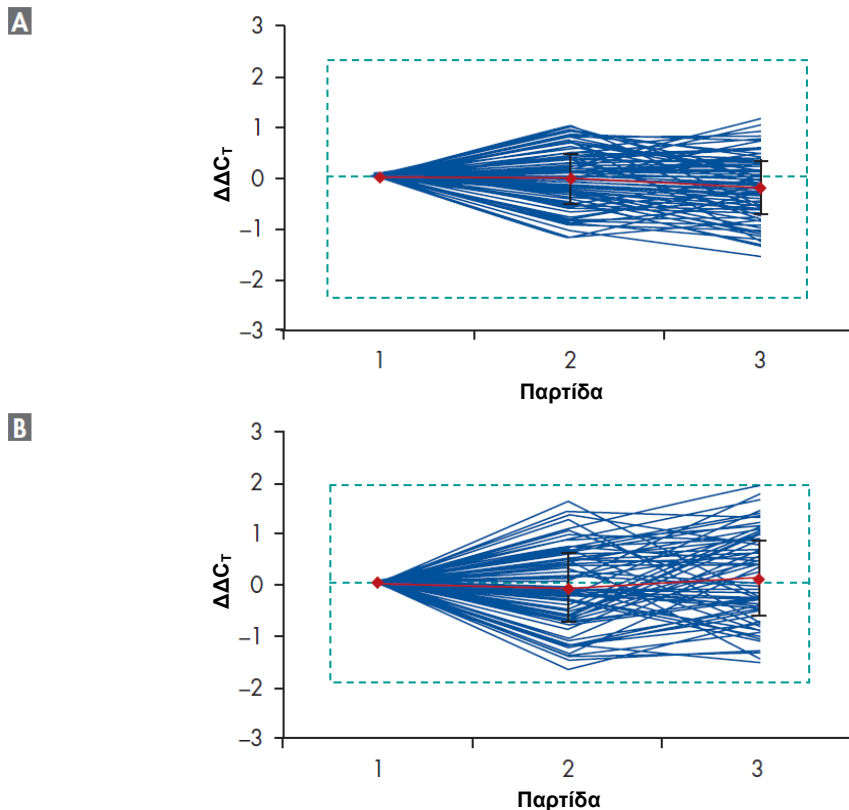
Συνδυασμός δεδομένων	Δεξαμενή δοτών 1 5,1 x 10 ⁶ κύτταρα/ml			Δεξαμενή δοτών 6 6,5 x 10 ⁶ κύτταρα/ml		
	Μέση απόδοση (μg)	SD (μg)	CV (%)	Μέση απόδοση (μg)	SD (μg)	CV (%)
Παρτίδα 1, όλοι οι χρήστες	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17

Συνδυασμός δεδομένων	Δεξαμενή δοτών 9 8,4 x 10 ⁶ κύτταρα/ml			Δεξαμενή δοτών 10 10,2 x 10 ⁶ κύτταρα/ml		
	Μέση απόδοση (μg)	SD (μg)	CV (%)	Μέση απόδοση (μg)	SD (μg)	CV (%)
Παρτίδα 1, όλοι οι χρήστες	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Λεπτομερειακή ανάλυση από 4 αντιπροσωπευτικές δεξαμενές δοτών. Οι δεξαμενές επιλέχθηκαν βάσει του αριθμού των λευκοκυττάρων τους και αντιπροσωπεύουν την ανώτατη, μέση και κατώτερη τιμή του εύρους φυσιολογικών τιμών των λευκοκυττάρων (4,8 x 10⁶ – 1,1 x 10⁷ λευκοκύτταρα/ml). Ο αριθμός των λευκοκυττάρων αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή των 3 μετρήσεων λευκοκυττάρων από τους 3 δότες ανά δεξαμενή δοτών.



Εικόνα 8. Αναπαραγωγικότητα της RT-PCR — μεταξύ χρηστών. Το απομονωμένο RNA του πειράματος που περιγράφεται στην εικόνα 7 χρησιμοποιήθηκε για την RT-PCR πραγματικού χρόνου. Τα σχετικά επίπεδα μεταγραφημάτων **[A]** FOS και **[B]** IL1B καθορίστηκαν μέσω duplex RT-PCR πραγματικού χρόνου, χρησιμοποιώντας 18S rRNA ως εσωτερικό πρότυπο. Σχεδιάστηκαν οι τιμές για όλα τα δείγματα, σε σχέση με τις τιμές για τον χρήστη 1 (10 δεξαμενές δοτών x 3 παρτίδες κιτ x 4 επαναλήψεις = 120 σύνολα δεδομένων για κάθε γονίδιο), με μέσες τιμές (κόκκινες γραμμές) και τυπικές αποκλίσεις (μαύρες ράβδοι). Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν την ± 3 πλάσια συνολική ακρίβεια των προσδιορισμών (FOS: 2,34 C_T , IL1B: 1,93 C_T).



Εικόνα 9. Αναπαραγωγιμότητα της RT-PCR – μεταξύ των παρτίδων kit. Το απομονωμένο RNA του πειράματος που περιγράφεται στην εικόνα 7 χρησιμοποιήθηκε για την RT-PCR πραγματικού χρόνου. Τα σχετικά επίπεδα μεταγραφημάτων **[A]** FOS και **[B]** IL1B καθορίστηκαν μέσω duplex RT-PCR πραγματικού χρόνου, χρησιμοποιώντας 18S rRNA ως εσωτερικό πρότυπο. Σχεδιάστηκαν οι τιμές όλων των δειγμάτων σε σχέση με τις τιμές για τον χρήστη 1 (10 δεξαμενές δοτών x 3 χρήστες x 4 επαναλήψεις = 120 σειρές δεδομένων για κάθε γονίδιο) με μέσες τιμές (κόκκινες γραμμές) και τυπικές αποκλίσεις (μαύρες ράβδοι). Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν την ± 3 πλάσση συνολική ακρίβεια των προσδιορισμών (FOS: 2,34 C_T , IL1B: 1,93 C_T).

Πίνακας 2. Σύνοψη των αποτελεσμάτων της RT-PCR από τις εικόνες 8 και 9

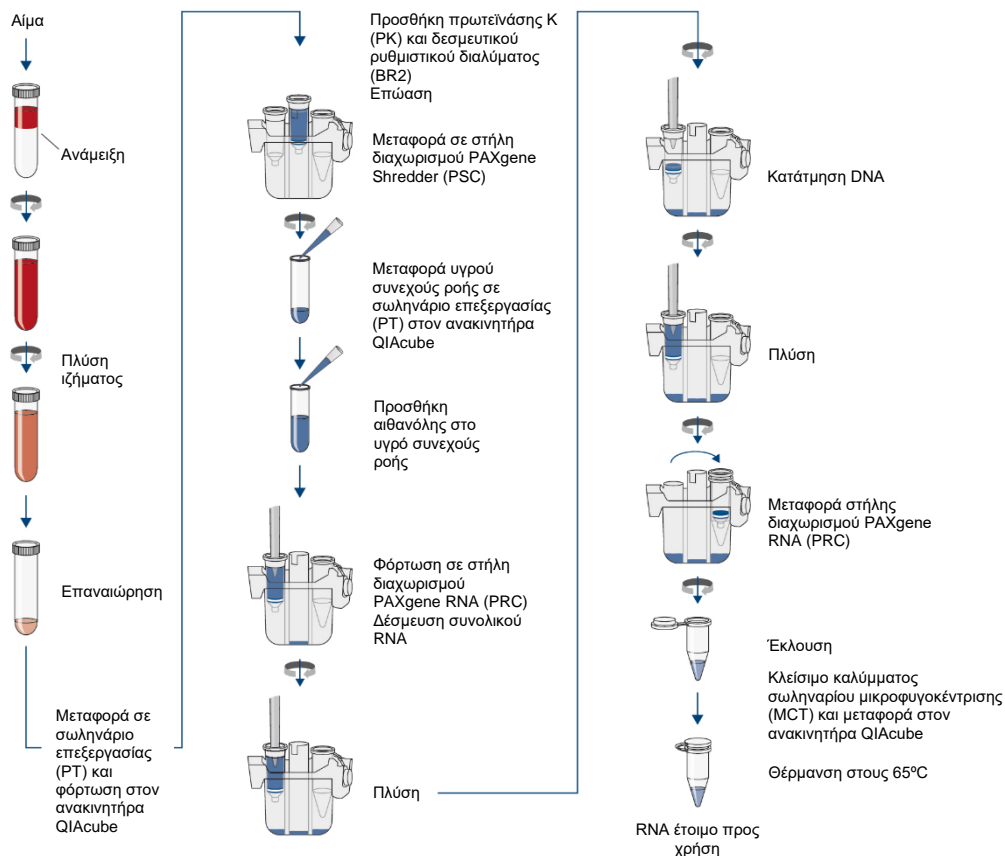
Σύστημα δοκιμασίας	Προσδιορισμός FOS/18S rRNA		Προσδιορισμός IL1B/18S rRNA	
	Μέση τιμή ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Μέση τιμή ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Αναπαραγωγικότητα μεταξύ όλων των παρτίδων κιτ για κάθε χρήστη				
Όλοι οι χρήστες, παρτίδα 1–παρτίδα 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Όλοι οι χρήστες, παρτίδα 1–παρτίδα 2	−0,03	0,48	−0,07	0,66
Όλοι οι χρήστες, παρτίδα 1–παρτίδα 3	−0,21	0,52	0,11	0,71
Αναπαραγωγικότητα μεταξύ όλων των παρτίδων κιτ για κάθε χρήστη				
Όλες οι παρτίδες, χρήστης Α–χρήστης Α	0,00	0,00	0,00	0,00
Όλες οι παρτίδες, χρήστης Α–χρήστης Β	−0,46	0,44	−0,06	0,69
Όλες οι παρτίδες, χρήστης Α–χρήστης C	−0,31	0,60	−0,15	0,71

Χρήστης: Τεχνολόγος που εκτέλεσε τη μελέτη.
Παρτίδα: Αριθμός παρτίδας του κιτ που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή.
SD: Τυπική απόκλιση.
Εμφανίζονται οι μέσες τιμές $\Delta\Delta C_T$ (N = 120) και οι τυπικές αποκλίσεις των δεδομένων που παρουσιάζονται στις εικόνες 8 και 9.

Αυτοματοποιημένη απομόνωση του RNA

Η παρασκευή δειγμάτων εκτελείται αυτοματοποιημένα με χρήση του τυπικού οργάνου QIAcube® (αρ. κατ. 9001882 [110 V], αρ. κατ. 9001293 [230 V], μη συμπεριλαμβανομένου του QIAcube Connect) και ακολουθεί τα ίδια στάδια με τη χειροκίνητη διαδικασία, δίνοντάς σας τη δυνατότητα να συνεχίσετε να χρησιμοποιείτε το κιτ PAXgene Blood RNA Kit για την απομόνωση υψηλής ποιότητας RNA. Ανατρέξτε στο *Εγχειρίδιο χρήση QIAcube (QIAcube User Manual)* και στον ιστότοπο www.qiagen.com/MyQIAcube για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με το QIAcube.

Το αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο απομόνωσης RNA αποτελείται από 2 μέρη (ή πρωτόκολλα), το «PAXgene Blood RNA Part A» και το «PAXgene Blood RNA Part B», με σύντομη χειροκίνητη παρέμβαση μεταξύ των 2 μερών (βλ. εικόνα 10, σελίδα 31).



Εικόνα 10. Η αυτοματοποιημένη διαδικασία PAXgene Blood RNA.

Το ίζημα νουκλεϊκού οξέος που έχει ήδη φυγοκεντρίστεί, πλυθεί και επαναιωρηθεί (βλ. «Συγκέντρωση και καθαρισμός RNA», σελίδα 20) μεταφέρεται από το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) σε σωληνάρια επεξεργασίας (PT), τα οποία τοποθετούνται εντός της μονάδας θερμομίκτη στο τραπέζι εργασίας του QIAcube. Ο χειριστής επιλέγει και εκκινεί το πρωτόκολλο «PAXgene Blood RNA Part A» από το μενού. Το QIAcube εκτελεί τα στάδια του πρωτοκόλλου μέχρι την έκλυση του RNA στο ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης (BR5). Ο χειριστής μεταφέρει τα σωληνάρια

μικροφυγοκέντρισης (MCT) που περιέχουν το καθαρό RNA εντός της μονάδας θερμομίκτη του QIAcube. Ο χειριστής επιλέγει και εκκινεί το πρωτόκολλο «PAXgene Blood RNA Part B» από το μενού και η μετουσίωση μέσω θέρμανσης εκτελείται από το QIAcube.

Ο μέσος χρόνος παρασκευής του δείγματος (με βάση τα δεδομένα από την παρασκευή 12 δειγμάτων) είναι 151 λεπτά*, ενώ ο καθαρός χρόνος χειρισμού είναι σημαντικά λιγότερος σε σύγκριση με το χειροκίνητο πρωτόκολλο.

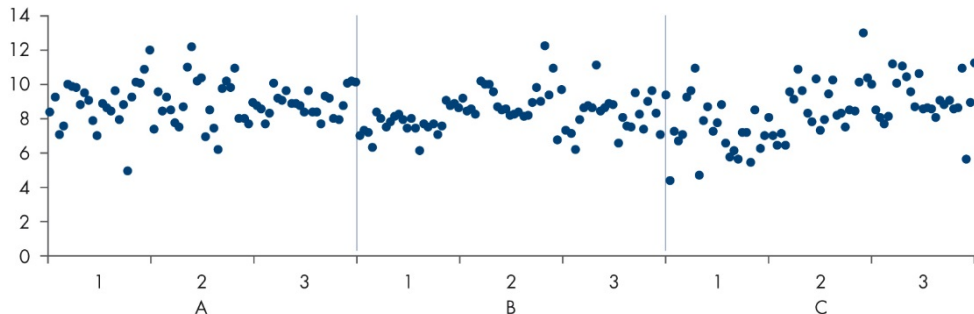
Σε πάνω από 95% των δειγμάτων που υποβάλλονται σε επεξεργασία, επιτυγχάνεται μία απόδοση RNA ≥ 3 μg από 2,5 ml ολικού αίματος υγιών δοτών. Η εικόνα 11 (σελίδα 33) δείχνει την απόδοση του RNA από ένα σύνολο 216 δειγμάτων που παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας το αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο με 3 παρτίδες kit από 3 χειριστές. Επειδή για τις μελέτες αυτές χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από δεξαμενή αίματος αντί για μεμονωμένα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), τα αποτελέσματα αυτών των μελετών δεν αντανakλούν την απόδοση RNA που αναμένεται από επιμέρους δείγματα μεμονωμένων δειγματοληψιών. Δεδομένου ότι οι αποδόσεις εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τους δότες, οι μεμονωμένες αποδόσεις μπορεί να ποικίλλουν (εικόνα 11, σελίδα 33).

Τουλάχιστον 95% των δειγμάτων δεν δείχνουν αναστολή στην RT-PCR, όταν χρησιμοποιείται μέχρι 30% του εκλούσματος. Με τη χρήση του αυτοματοποιημένου πρωτοκόλλου δεν εντοπίζεται διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των δειγμάτων, όπως μετρείται με την ποσοτική RT-PCR πραγματικού χρόνου σε αλληλουχίες της ABL1 και μεταγραφημάτων FOS σε αρνητικά δείγματα RNA (νερό) αντιστοιχισμένα με θετικά δείγματα RNA (ανθρώπινο ολικό αίμα) στην ίδια εκτέλεση.

Το RNA που απομονώνεται με το σύστημα PAXgene Blood RNA System και το αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο είναι καθαρό, όπως φαίνεται από την έλλειψη αναστολής της RT-PCR (βλ. εικόνα 11, σελίδα 33) και τις τιμές A_{260}/A_{280} μεταξύ 1,8 και 2,2. $\leq 1\%$ (w/w) του γονιδιωματικού DNA είναι παρόν σε $\geq 95\%$ όλων των δειγμάτων, όπως μετρείται με την ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου σε αλληλουχία του γονιδίου β-ακτίνης. Οι εικόνες 12 και 13 (σελίδες 33 και 34) δείχνουν τις τιμές A_{260}/A_{280} και σχετικού γονιδιωματικού DNA επί του συνόλου 216 δειγμάτων που παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας το αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο με 3 παρτίδες kit από 3 χειριστές.

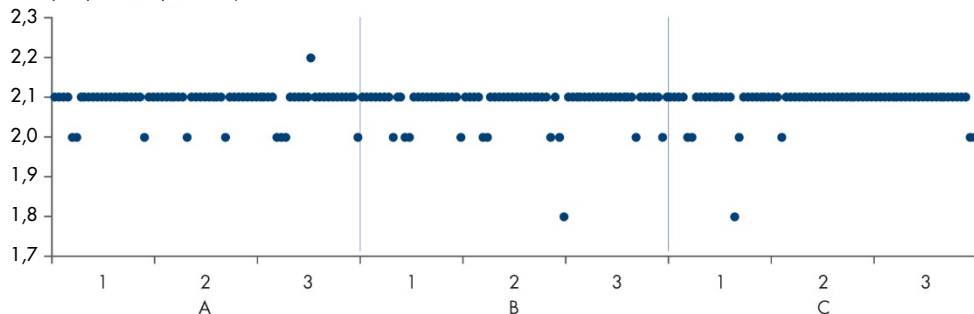
* Συνολικός χρόνος εκτέλεσης του πρωτοκόλλου, συμπεριλαμβανομένου του χειρισμού των σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes που προηγείται (φυγοκεντρίσεις, πλύση ιζήματος και επαναιώρηση ιζήματος).

Απόδοση RNA (μg/2,5 ml αίματος)

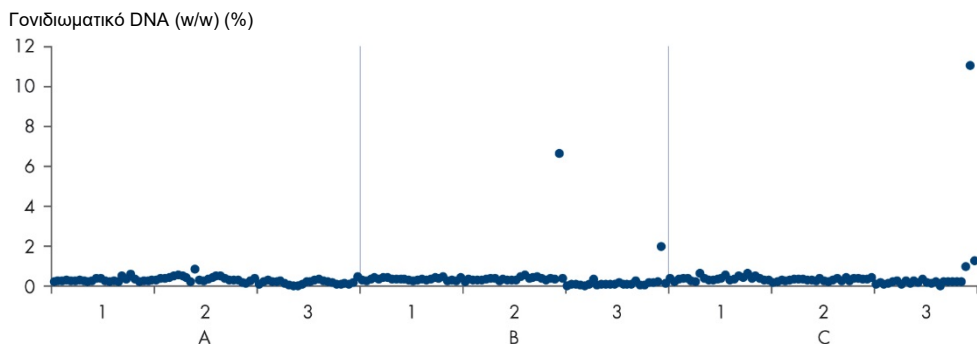


Εικόνα 11. Απόδοση RNA — αυτοματοποιημένη επεξεργασία. Από 36 διαφορετικούς δότες συλλέχθηκαν δείγματα αίματος σε σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) (6 σωληνάρια ανά δότη, συνολικά 216 σωληνάρια). Το περιεχόμενο των σωληναρίων από 6 δότες δεξαμενοποιήθηκε και, στη συνέχεια, κλασματοποιήθηκε εκ νέου σε 36 δείγματα. Τα 36 αυτά δείγματα ανά δεξαμενή 6 δοτών εξετάστηκαν από 3 διαφορετικούς χειριστές (A, B, C). Κάθε χειριστής χρησιμοποίησε για την αυτοματοποιημένη εκχύλιση 3 διαφορετικές παρτίδες (1, 2, 3) του kit PAXgene Blood RNA Kit και εξέτασε δείγματα εις τετραπλούν από κάθε μία από τις 6 δεξαμενές δοτών. Οι αποδόσεις RNA όλων των επιμέρους δειγμάτων παρουσιάζονται για κάθε συνδυασμό παρτίδας–χειριστή.

Καθαρότητα RNA (A_{260}/A_{280})

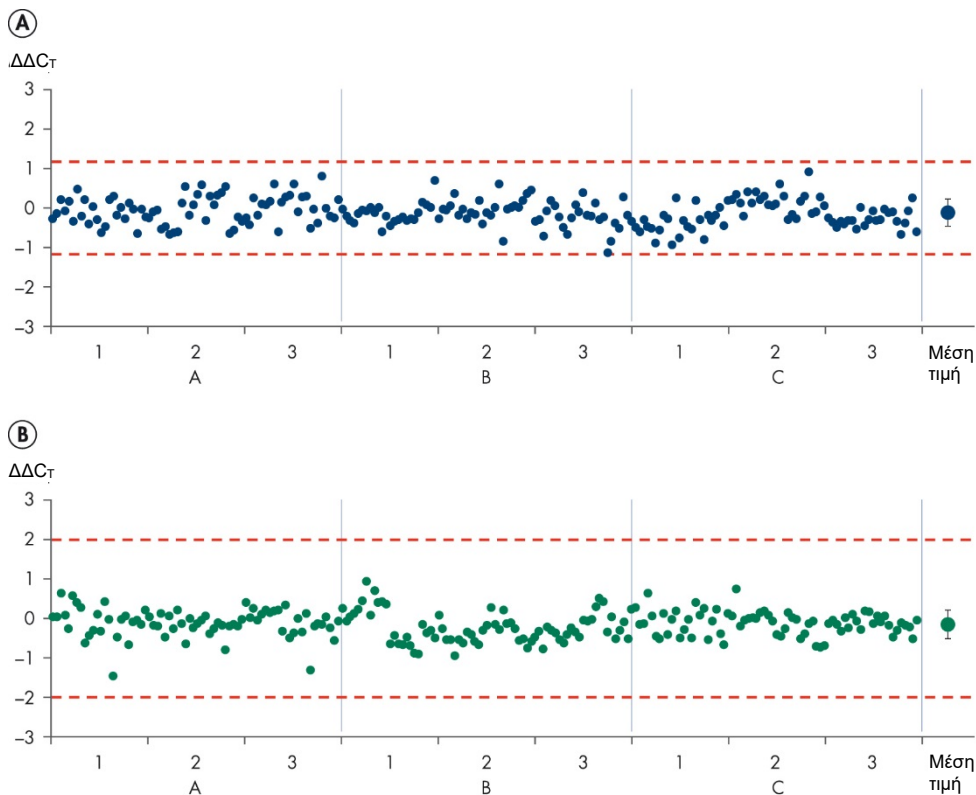


Εικόνα 12. Καθαρότητα RNA (τιμές A_{260}/A_{280}) — αυτοματοποιημένη επεξεργασία. Το RNA απομονώθηκε από 3 διαφορετικούς χειριστές (A, B, C) με χρήση 3 διαφορετικών παρτίδων (1, 2, 3) του kit PAXgene Blood RNA Kit στο πείραμα που περιγράφεται στην εικόνα 11. Οι τιμές A_{260}/A_{280} όλων των ατομικών δειγμάτων εμφανίζονται για κάθε συνδυασμό χειριστή–παρτίδας.



Εικόνα 13. Καθαρότητα RNA (% επιμόλυνσης γονιδιωματικού DNA) — αυτοματοποιημένη επεξεργασία. Το RNA απομονώθηκε από 3 διαφορετικούς χειριστές (A, B, C) με χρήση 3 διαφορετικών παρτίδων (1, 2, 3) του kit PAXgene Blood RNA Kit στο πείραμα που περιγράφεται στην εικόνα 11. Οι ποσότητες του γονιδιωματικού DNA (w/w) όλων των ατομικών δειγμάτων εμφανίζονται για κάθε συνδυασμό χειριστή-παρτίδας.

Το αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο καθαρισμού του RNA με χρήση του συστήματος PAXgene Blood RNA System παρέχει σε υψηλό βαθμό αναπαραγώγιμα και επαναλήψιμα αποτελέσματα RT-PCR, όπως φαίνεται στην εικόνα 14 (σελίδα 35), γεγονός το οποίο το καθιστά εξαιρετικά αξιόπιστο για κλινικές διαγνωστικές εξετάσεις.



Εικόνα 14. Αναπαραγωγιμότητα της RT-PCR — μεταξύ αυτοματοποιημένου και χειροκίνητου πρωτοκόλλου.

Το RNA απομονώθηκε από 3 διαφορετικούς χειριστές (A, B, C) με χρήση 3 διαφορετικών παρτίδων (1, 2, 3) του kit PAXgene Blood RNA Kit με το αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο στο πείραμα που περιγράφεται στην εικόνα 11. Παράλληλα, RNA καθαρίστηκε από τα αντίστοιχα σωληνάρια επαναλαμβανόμενων δειγμάτων με χρήση του χειροκίνητου πρωτοκόλλου. Τα σχετικά επίπεδα μεταγραφημάτων **[Α]** FOS και **[Β]** IL1B καθορίστηκαν μέσω duplex RT-PCR πραγματικού χρόνου, χρησιμοποιώντας 18S rRNA ως εσωτερικό πρότυπο. Πιθανές διαφορές επιπέδων μεταγραφημάτων μεταξύ RNA που παρασκευάστηκε από ζεύγη δειγμάτων αίματος χρησιμοποιώντας και τα δύο πρωτόκολλα εκχύλισης (αυτοματοποιημένο και χειροκίνητο πρωτόκολλο) υπολογίστηκαν με τη μέθοδο $\Delta\Delta C_T$. Μεμονωμένες τιμές $\Delta\Delta C_T$ για όλα τα ζεύγη δειγμάτων (4 επαναλήψεις x 6 δεξαμενές δοτών x 3 παρτίδες kit x 3 χειριστές = 216 ζεύγη για κάθε γονίδιο) σχεδιάστηκαν ως απλά σημεία με μέσες τιμές (μεγαλύτερες κουκκίδες) και τυπικές αποκλίσεις (μαύρες ράβδοι) για όλα τα δείγματα. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν την ± 3 πλάσια συνολική ακρίβεια των προσδιορισμών (FOS: 1,16 C_T , IL1B: 1,98 C_T , τα διαφορετικά επίπεδα ακρίβειας των προσδιορισμών σε σύγκριση με τις εικόνες 1–4, 8 και 9 οφείλονται στις διαφορετικές εκδόσεις των προσδιορισμών).

Εξοπλισμός και αντιδραστήρια που παρέχονται από τον χρήστη

Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (SDS), τα οποία διατίθενται από τον προμηθευτή του προϊόντος.

Για όλα τα πρωτόκολλα

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, αρ. κατ. 762165)
- Αιθανόλη (96–100%, βαθμός καθαρότητας p.a.)
- Πιπέτες* (10 µl – 4 ml)
- Στείρα ρύγχη πιπετών, με φραγμό αερολυμάτων, ελεύθερα RNάσης†
- Ογκομετρικός κύλινδρος‡
- Φυγόκεντρος* με δυνατότητα 3.000–5.000 x g εξοπλισμένη με ρότορα ταλάντευσης και κάδους για τη συγκράτηση των σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Αναδευτήρας vortex*
- Τεμαχισμένος πάγος
- Ανεξίτηλος μαρκαδόρος για την επισήμανση

* Διασφαλίστε ότι τα όργανα έχουν ελεγχθεί, συντηρηθεί και βαθμονομηθεί σε τακτά χρονικά διαστήματα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

† Διασφαλίστε ότι έχετε εξοικειωθεί με τις οδηγίες χειρισμού του RNA (Παράρτημα Α, σελίδα 64).

‡ Για την προσθήκη αιθανόλης στο συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα BR4.

Για το χειροκίνητο πρωτόκολλο

- Μικροφυγόκεντρος* μεταβαλλόμενης ταχύτητας με δυνατότητα εύρους τουλάχιστον 1.000–8.000 x g, παρότι εφαρμόζονται και χαμηλότερες και υψηλότερες δυνάμεις g (ανατρέξτε στα στάδια του πρωτοκόλλου για λεπτομέρειες), και εξοπλισμένη με ρότορα για σωληνάρια μικροφυγοκέντρισης των 2 ml
- Επωαστήρας με ανακινητήρα* με δυνατότητα επώασης στους 55°C και 65°C και ανακίνησης σε ≥ 400 rpm, χωρίς να υπερβαίνει τις 1.400 rpm (π.χ. Eppendorf® Thermomixer Compact ή ισοδύναμος)

Για το αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο

- QIAcube* (QIAGEN, αρ. καταλ. 9001882 [110 V], αρ. καταλ. 9001293 [230 V])
- Ψαλίδι

Αναλώσιμα υλικά του QIAcube

- Filter-Tips, 1.000 µl (1024) (QIAGEN, αρ. κατ. 990352)[†]
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, αρ. κατ. 990393)[†]
- Rotor Adapters (10 x 24) (QIAGEN, αρ. κατ. 990394)[†]

Παρελκόμενα του QIAcube

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

* Διασφαλίστε ότι τα όργανα έχουν ελεγχθεί, συντηρηθεί και βαθμονομηθεί σε τακτά χρονικά διαστήματα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

[†] Συμπεριλαμβάνεται επίσης στο Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, αρ. κατ. 990395)

Σημαντικές σημειώσεις

Χρήση του QIAcube

Διασφαλίστε ότι έχετε εξοικειωθεί με τη λειτουργία του QIAcube. Παρακαλούμε, πριν αρχίσετε με τα αυτοματοποιημένα πρωτόκολλα PAXgene Blood RNA, να διαβάσετε το *Εγχειρίδιο χρήστη QIAcube* και όλες τις πρόσθετες πληροφορίες που παρέχονται με το QIAcube, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στις πληροφορίες ασφάλειας.

Εκκίνηση του QIAcube

Κλείστε την πόρτα του QIAcube και θέστε σε λειτουργία το QIAcube με τον κεντρικό διακόπτη (βλέπε εικόνα 15, σελίδα 39).

Ακούγεται ένας ήχος βομβητή και εμφανίζεται η αρχική οθόνη. Το όργανο εκτελεί αυτόματα τεστ αρχικοποίησης.

Εγκατάσταση πρωτοκόλλων στο QIAcube

Απαιτείται μια αρχική εγκατάσταση πρωτοκόλλου πριν από την διεξαγωγή της πρώτης εκτέλεσης παρασκευής RNA στο QIAcube. Εγκαταστήστε και τα δύο πρωτόκολλα «PAXgene Blood RNA Part A» και «PAXgene Blood RNA Part B».

Πρωτόκολλα παρέχονται στην ιστοσελίδα **www.qiagen.com/MyQIAcube** και χρειάζεται μόνο να μεταφορτωθούν στη μονάδα μνήμης USB που παρέχεται μαζί με το QIAcube και να μεταφερθούν στο QIAcube μέσω της θύρας USB.

Η θύρα USB, που βρίσκεται πίσω από το προστατευτικό πλαίσιο (βλ. εικόνα 15, σελίδα 39), επιτρέπει τη σύνδεση του QIAcube σε μια μονάδα μνήμης USB (παρέχεται με το QIAcube). Αρχεία δεδομένων, όπως αρχεία καταγραφής ή αρχεία αναφορών μπορούν επίσης να μεταφερθούν μέσω της θύρας USB από το QIAcube στη μονάδα μνήμης USB.



Η θύρα USB προορίζεται για χρήση μόνο με τη μονάδα μνήμης USB που παρέχεται από την QIAGEN. Μην συνδέετε άλλες συσκευές στη θύρα αυτή.



Μην αφαιρείτε τη μονάδα μνήμης USB κατά τη διάρκεια της μεταφόρτωσης πρωτοκόλλων ή μεταφοράς αρχείων δεδομένων ή κατά την εκτέλεση πρωτοκόλλου.



Εικόνα 15. Πρόσωση του QIAcube.



Οθόνη αφής



Πόρτα



Σειριακή θύρα RS232 πίσω από προστατευτικό πλαίσιο (μόνο για χρήση από τους ειδικούς τεχνικούς σέρβις της QIAGEN)



Θύρα USB πίσω από προστατευτικό πλαίσιο



Κεντρικός διακόπτης



Συρτάρι αποβλήτων

Φόρτωση του QIAcube

Για οικονομία χρόνου, η φόρτωση μπορεί να διεξαχθεί κατά τη διάρκεια του ενός ή και των δύο δεκάλεπτων σταδίων φυγοκέντρισης (στάδια 3 και 5) στο «Πρωτόκολλο: Αυτοματοποιημένη απομόνωση του συνολικού RNA από ανθρώπινο ολικό αίμα συλλεγμένο σε σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)», σελίδα 57.

Φιάλες αντιδραστηρίων

Πριν από κάθε εκτέλεση στο QIAcube, γεμίστε προσεκτικά τις 4 φιάλες αντιδραστηρίου με τα αντιδραστήρια που παρατίθενται στον πίνακα 3 μέχρι τον μέγιστο δείκτη στάθμης ή, εάν δεν είναι δυνατόν, στη στάθμη που επιτρέπεται από τους όγκους ρυθμιστικών διαλυμάτων που παρέχονται στο kit PAXgene Blood RNA Kit. Επισημάνετε ευκρινώς τις φιάλες και τα καλύμματα με τα ονόματα των ρυθμιστικών διαλυμάτων και τοποθετήστε τις γεμάτες φιάλες στις κατάλληλες θέσεις στο στατώ φιαλών αντιδραστηρίων. Φορτώστε το στατώ στο τραπέζι εργασίας του QIAcube όπως απεικονίζεται (εικόνες 16 και 17, σελίδες 41 και 42).



Ο παρεχόμενος όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος BR2 δεν θα γεμίσει μια φιάλη αντιδραστηρίου μέχρι τον δείκτη στάθμης. Τα ρυθμιστικά διαλύματα BR3 και BR4 ενδέχεται να μη γεμίσουν τη φιάλη μέχρι τον δείκτη στάθμης μετά την επεξεργασία πολλαπλών δειγμάτων σε προηγούμενες εκτελέσεις.



Βεβαιωθείτε ότι έχετε βγάλει το κάλυμμα από τις φιάλες πριν από την τοποθέτησή τους στο τραπέζι εργασίας.

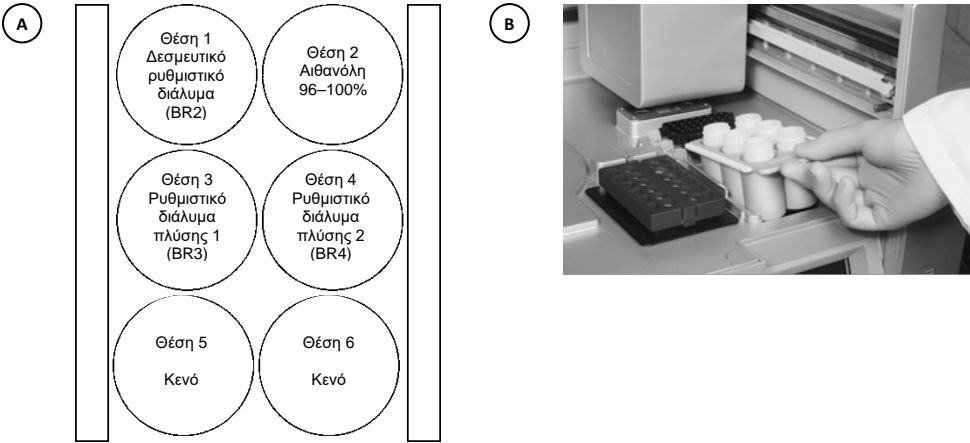


Οι ποσότητες ρυθμιστικών διαλυμάτων που παρέχονται με το kit PAXgene Blood RNA Kit (50) επαρκούν κατά το μέγιστο για 7 εκτελέσεις παρασκευής RNA στο QIAcube, με 2 έως 12 δείγματα ανά εκτέλεση. Γενικά, εκτελέσεις με μικρότερο αριθμό δειγμάτων θα πρέπει να αποφεύγονται ώστε να υποβάλλονται σε επεξεργασία συνολικά 50 δείγματα ανά kit με το πολύ 7 εκτελέσεις παρασκευής RNA. Περισσότερες από 7 εκτελέσεις παρασκευής RNA μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα μη επαρκείς όγκους ρυθμιστικών διαλυμάτων για την επεξεργασία των τελευταίων δειγμάτων.

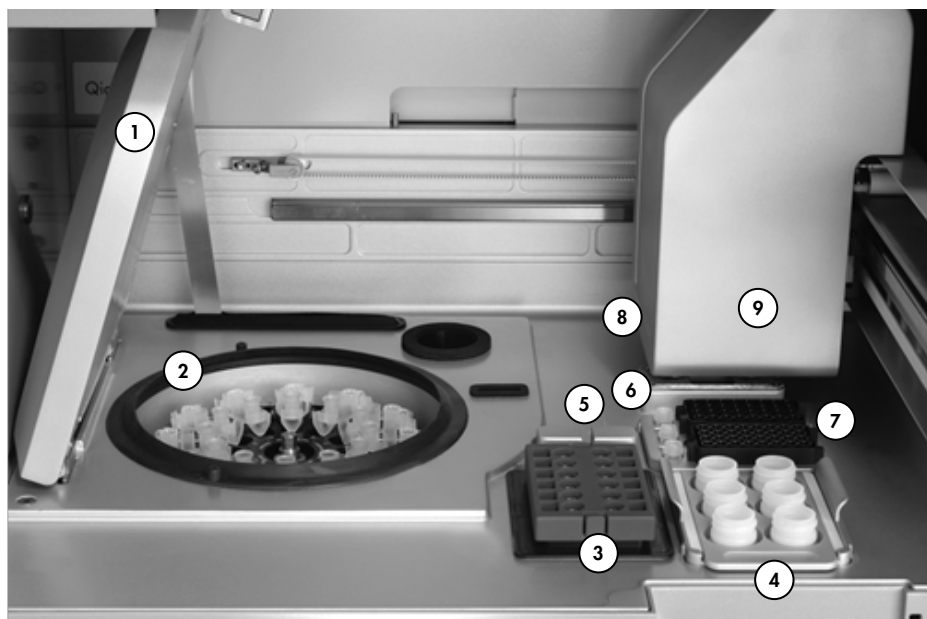
Πίνακας 3. Θέσεις στο στατώ φιαλών αντιδραστηρίων

Θέση	Αντιδραστήριο
1	Δεσμευτικό ρυθμιστικό διάλυμα (BR2)
2	Αιθανόλη 96–100%
3	Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 1 (BR3)
4	Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2 (BR4)*
5	– (αφήνεται κενό)
6	– (αφήνεται κενό)

* Το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2 (BR4) παρέχεται σε συμπυκνωμένη μορφή. Πριν από την πρώτη χρήση, προσθέστε στη φιάλη 4 όγκους αιθανόλης (96–100% βαθμός καθαρότητας p.a.) όπως υποδεικνύεται στη φιάλη για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας.



Εικόνα 16. Φόρτωση του στατώ φιαλών αντιδραστηρίων. [A] Σχηματική αναπαράσταση των θέσεων και του περιεχομένου των φιαλών στο στατώ φιαλών αντιδραστηρίων. [B] Φόρτωση του στατώ στο QIAcube.



Εικόνα 17. Εσωτερική όψη του QIAcube.

- | | | | |
|---|-----------------------------|---|---|
| 1 | Κάλυμμα φυγόκεντρου | 6 | Υποδοχές σωληναρίων μικροφυγοκέντρισης |
| 2 | Φυγόκεντρος | 7 | Θήκες ρυγχών |
| 3 | Ανακινήτης | 8 | Υποδοχές απόρριψης για ρύγχη και στήλες |
| 4 | Στατώ φιαλών αντιδραστηρίων | 9 | Ρομποτικός βραχίονας |
| 5 | Αισθητήρας ρύγχους | | |

Στήλες διαχωρισμού (PRC, PSC), σωληνάρια μικροφυγοκέντρισης (MCT) και πλαστικά είδη QIAcube

Τοποθετήστε 2 θήκες ρυγχών γεμάτες με ρύγχη Filter-Tips 1.000 μl στο QIAcube (βλ. εικόνα 17, σελίδα 42). Επαναπληρώστε τις θήκες με ρύγχη όταν είναι απαραίτητο.



Χρησιμοποιείτε μόνο ρύγχη φίλτρου 1.000 μl που είναι σχεδιασμένα για χρήση με το QIAcube.

Επιστημάνετε τους προσαρμογείς ρότορα και τα σωληνάρια μικροφυγοκέντρισης (MCT) για κάθε δείγμα χρησιμοποιώντας ανεξίτηλο μαρκαδόρο. Ανοίξτε τις στήλες διαχωρισμού PAXgene Shredder (PSC) που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν και κόψτε τα καλύμματα τελείως χρησιμοποιώντας ψαλίδι (βλ. εικόνα 18, σελίδα 44).



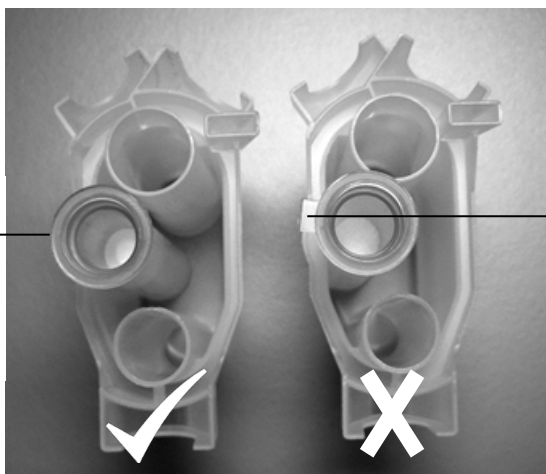
Για τη σωστή λειτουργία της ρομποτικής αρπάγης του QIAcube, απομακρύνετε τελείως (αποκόψτε) τα καλύμματα και όλα τα πλαστικά μέρη που συνδέουν το κάλυμμα με τις στήλες διαχωρισμού PAXgene Shredder (PSC, βλ. εικόνα 16). Διαφορετικά, η ρομποτική αρπάγη δεν μπορεί να πιάσει τις στήλες διαχωρισμού (PSC, PRC) σωστά.

Τοποθετήστε τις στήλες διαχωρισμού PAXgene RNA (PRC), τη στήλη διαχωρισμού PAXgene Shredder (PSC, χωρίς κάλυμμα) και το επισημασμένο σωληνάριο μικροφυγοκέντρισης (MCT) στις κατάλληλες θέσεις σε κάθε επισημασμένο προσαρμογέα ρότορα όπως φαίνεται στον πίνακα 4 και στην εικόνα 19 (σελίδα 44).



Βεβαιωθείτε ότι τα καλύμματα της στήλης διαχωρισμού (PRC) και του σωληναρίου μικροφυγοκέντρισης (MCT) ωθούνται στον πυθμένα των υποδοχών στην άκρη του προσαρμογέα ρότορα, διαφορετικά κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρισης τα καλύμματα θα σπάσουν.

Κάλυμμα στήλης που έχει απομακρυνθεί σωστά



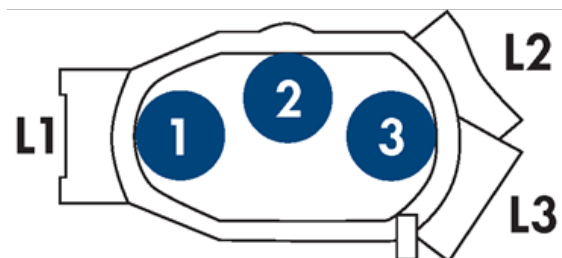
Κάλυμμα στήλης που έχει απομακρυνθεί εσφαλμένα – μέρος του καλύμματος παραμένει προσαρτημένο

Εικόνα 18. Φόρτωση στήλης διαχωρισμού PAXgene Shredder (PSC). Η στήλη διαχωρισμού PAXgene Shredder (PSC) φορτώνεται στη μεσαία θέση του προσαρμογέα ρότορα. Κόψτε το κάλυμμα πριν από την τοποθέτηση της στήλης (PSC).

Πίνακας 4. Εργαστηριακά είδη στον προσαρμογέα ρότορα

Θέση	Αντιδραστήριο	Θέση καλύμματος
1	Στήλη διαχωρισμού PAXgene RNA (κόκκινη, PRC)	L1
2	Στήλη διαχωρισμού PAXgene Shredder (μωβ, PSC) (αποκόψτε το κάλυμμα πριν από την τοποθέτηση στον προσαρμογέα ρότορα)	–
3	Σωληνάριο μικροφυγοκέντρισης (MCT)*	L3

* Χρησιμοποιείτε τα σωληνάρια μικροφυγοκέντρισης (1,5 ml) που περιλαμβάνονται στο kit PAXgene Blood RNA Kit.



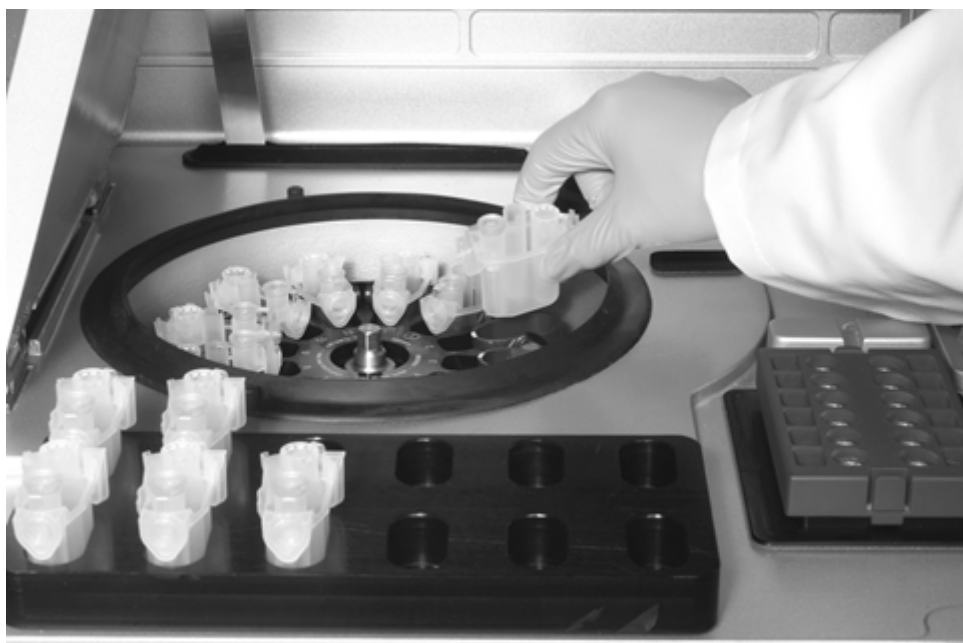
Εικόνα 19. Θέσεις στον προσαρμογέα ρότορα. Ο προσαρμογέας ρότορα έχει τρεις θέσεις σωληναρίων (1–3) και τρεις θέσεις καλυμμάτων (L1–L3).

Φόρτωση της φυγόκεντρου

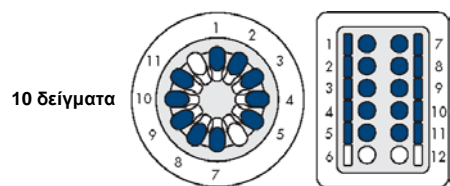
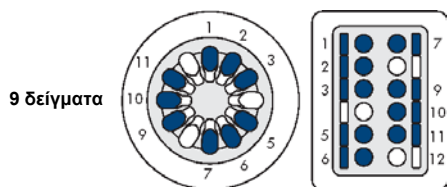
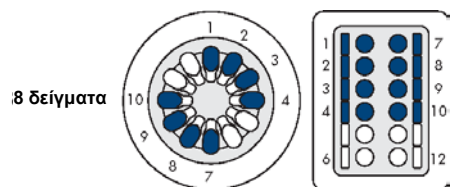
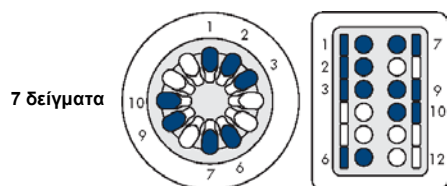
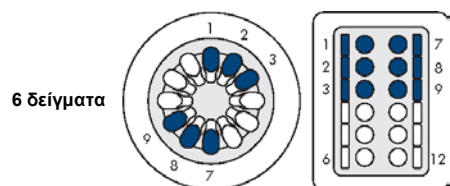
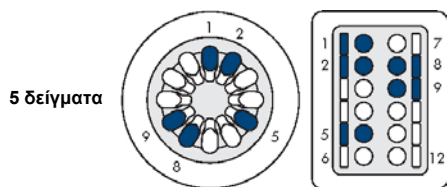
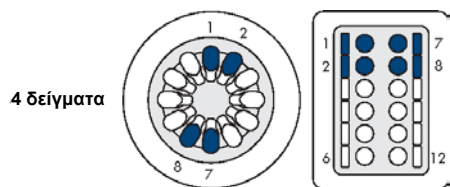
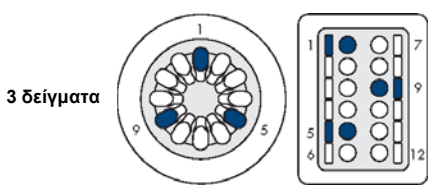
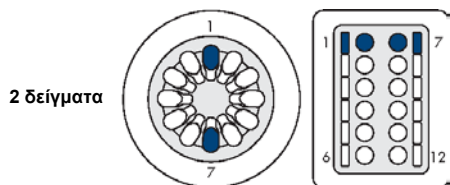
Τοποθετήστε τους συναρμολογημένους προσαρμογείς ρότορα εντός των κάδων της φυγόκεντρου όπως φαίνεται στην εικόνα 20 παρακάτω.



Εάν επεξεργάζεστε λιγότερα από 12 δείγματα, βεβαιωθείτε ότι φορτώνετε τον ρότορα της φυγόκεντρου ισορροπημένα ακτινωτά (βλέπε εικόνα 21, σελίδα 46). Πριν από την εκκίνηση της εκτέλεσης ενός πρωτοκόλλου, πρέπει να εγκατασταθούν όλοι οι κάδοι της φυγόκεντρου ακόμα και όταν πρόκειται να υποβληθούν σε επεξεργασία λιγότερα από 12 δείγματα. Δεν είναι δυνατή η επεξεργασία μεμονωμένου (ενός) δείγματος ή 11 δειγμάτων.



Εικόνα 20. Φόρτωση της φυγόκεντρου. Φορτώστε τους συναρμολογημένους προσαρμογείς ρότορα εντός των κάδων της φυγόκεντρου.



Εικόνα 21. Φόρτωση της φυγόκεντρο και του ανακινητήρα. Εμφανίζονται οι θέσεις στη φυγόκεντρο και στον ανακινητήρα για την επεξεργασία από δύο (2 δείγματα) μέχρι δέκα (10 δείγματα) δείγματα. Δεν είναι δυνατή η επεξεργασία ενός ή 11 δειγμάτων.

Σωληνάρια επεξεργασίας (PT)

Αφαιρέστε κάθε σωληνάριο επεξεργασίας (PT) που έχει απομείνει εντός των υποδοχών σωληναρίων μικροφυγοκέντρισης από προηγούμενες εκτελέσεις (βλέπε εικόνα 17, σελίδα 42). Γεμίστε 3 σωληνάρια επεξεργασίας (PT) με την ποσότητα αντιδραστηρίων που αναφέρεται στον πίνακα 5, σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων στην εκτέλεση.

Για μείγμα επώασης DNάσης I, μεταφέρετε με πιπέτα τον υποδεικνυόμενο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος κατάτμησης DNA (RDD) στο σωληνάριο επεξεργασίας (PT) και προσθέστε τον υποδεικνυόμενο όγκο αρχικού διαλύματος DNάσης I (RNFD). Αναμείξτε προσεκτικά με ρύγχος πιπέτας των 1.000 μl το ολικό μείγμα 3 φορές.

Χρησιμοποιείτε τα σωληνάρια επεξεργασίας (PT) 2 ml που περιλαμβάνονται στο κιτ PAXgene Blood RNA Kit. Επισημάνετε τα σωληνάρια (PT) ευκρινώς με τα ονόματα των αντιδραστηρίων και τοποθετήστε τα στη σωστή θέση εντός των υποδοχών των σωληναρίων μικροφυγοκέντρισης, όπως αναφέρεται στον πίνακα 6 (σελίδα 48).



Η DNάση I (RNFD) είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στη φυσική μετουσίωση. Αναμείξτε μόνο με πιπέτα, χρησιμοποιώντας ρύγχη πιπέτας μεγάλης διαμέτρου για να μειώσετε τη διάτμηση. Μη χρησιμοποιείτε αναδευτήρα vortex για την ανάμειξη.



Διασφαλίστε ότι μεταφέρετε με πιπέτα μόνο τον απαιτούμενο όγκο όπως αναφέρεται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. Όγκος αντιδραστηρίων που απαιτείται εντός των σωληναρίων επεξεργασίας για τις υποδοχές των σωληναρίων μικροφυγοκέντρισης

Αριθμός δειγμάτων	Όγκος αντιδραστηρίων για τον υποδεικνυόμενο αριθμό δειγμάτων (μl)		Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5)
	Πρωτεΐνωση Κ (PK)	Μείγμα επώασης DNάσης Ι	
2	126	187 (23 DNάση Ι + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNάση Ι + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNάση Ι + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNάση Ι + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNάση Ι + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNάση Ι + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNάση Ι + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNάση Ι + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNάση Ι + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNάση Ι + 806 Buffer RDD)	1177

Πίνακας 6. Υποδοχές σωληναρίων μικροφυγοκέντρισης

	Θέση		
	A	B	Γ
Περιεχόμενο	Πρωτεΐνωση Κ (PK)	Μείγμα επώασης DNάσης Ι	Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5)
Δοχείο	Σωληνάριο επεξεργασίας (PT)*	Σωληνάριο επεξεργασίας (PT)*	Σωληνάριο επεξεργασίας (PT)*

* Χρησιμοποιείτε τα σωληνάρια επεξεργασίας (PT) 2 ml που περιλαμβάνονται στο κιτ PAXgene Blood RNA Kit.

Πρωτόκολλο: Χειροκίνητη απομόνωση του συνολικού RNA από ανθρώπινο ολικό αίμα συλλεγμένο σε σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Σημαντικές υποδείξεις πριν από την εκκίνηση

- Βεβαιωθείτε ότι το κουτί του κιτ είναι άθικτο και χωρίς ζημιές, και ότι κανένα από τα ρυθμιστικά διαλύματα δεν παρουσιάζει διαρροές. Μη χρησιμοποιείτε κανένα κιτ που παρουσιάζει ζημιές.
- Κατά τη χρήση πιπέτας, βεβαιωθείτε για τη ρύθμιση του σωστού όγκου και ότι το υγρό αναρροφάται και διανέμεται προσεκτικά και πλήρως.
- Για να αποφύγετε τη μεταφορά δείγματος σε λανθασμένο σωληνάριο ή λανθασμένη στήλη διαχωρισμού, διασφαλίστε ότι όλα τα σωληνάρια και οι στήλες διαχωρισμού έχουν επισημανθεί σωστά με ανεξίτηλο μαρκαδόρο. Επισημάνετε το κάλυμμα και το σώμα κάθε σωληναρίου (PT, MCT). Στις στήλες διαχωρισμού, επισημάνετε το σώμα του σωληναρίου επεξεργασίας (PT). Κλείστε κάθε σωληνάριο ή στήλη διαχωρισμού μετά τη μεταφορά υγρού.
- Το πιπίλισμα δειγμάτων ή ρυθμιστικών διαλυμάτων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μπορεί να μειώσει την απόδοση και καθαρότητα του RNA.
- Εάν δεν υποδεικνύεται διαφορετικά, όλα τα στάδια του πρωτοκόλλου, συμπεριλαμβανομένων και αυτών της φυγοκέντρησης, πρέπει να εκτελεστούν σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C).

Εξαιτίας της υψηλής ευαισθησίας των μεθόδων ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων, κατά τον χειρισμό των δειγμάτων είναι απαραίτητες οι ακόλουθες προφυλάξεις για την αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης:

- Μεταφέρετε προσεκτικά με πιπέτα το δείγμα στη στήλη διαχωρισμού (PRC, PSC) χωρίς να υγρανθεί το χείλος της στήλης.

- Αλλάζετε πάντα τα ρύγχη πιπιτών μετά από κάθε μεταφορά υγρού. Χρησιμοποιείτε ρύγχη πιπιτών με φραγμό αερολυμάτων.
- Αποφύγετε την επαφή του ρύγχους της πιπέτας με τη μεμβράνη της στήλης διαχωρισμού (PRC, PSC).
- Μετά την ανάδευση σε vortex ή τη θέρμανση ενός σωληναρίου μικροφυγοκέντρισης (MCT), φυγοκεντρίστε σύντομα για την απομάκρυνση σταγονιδίων από το εσωτερικό του καλύμματος.
- Φοράτε γάντια σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Αντικαταστήστε αμέσως τα γάντια, εάν έλθουν σε επαφή με το δείγμα.
- Κλείστε τη στήλη διαχωρισμού (PRC, PSC) πριν την τοποθετήσετε στη μικροφυγόκεντρο. Φυγοκεντρίστε όπως περιγράφεται στη διαδικασία.
- Ανοίγετε μόνο μία στήλη διαχωρισμού (PRC, PSC) κάθε φορά και αποφεύγετε τον σχηματισμό αερολυμάτων.
- Για αποτελεσματική παράλληλη επεξεργασία πολλαπλών δειγμάτων, γεμίστε ένα στατώ με σωληνάρια επεξεργασίας (PT) στα οποία μπορούν να μεταφερθούν οι στήλες διαχωρισμού (PRC, PSC) μετά τη φυγοκέντρωση. Απορρίψτε τα χρησιμοποιημένα σωληνάρια επεξεργασίας (PT) που περιέχουν το υγρό συνεχούς ροής και τοποθετήστε τα νέα σωληνάρια επεξεργασίας (PT) που περιέχουν τις στήλες διαχωρισμού (PRC, PSC) απευθείας στη μικροφυγόκεντρο.

Ενέργειες πριν από την έναρξη

- Το αίμα πρέπει να συλλέγεται εντός των σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) σύμφωνα με τις οδηγίες που αναφέρονται στο *Εγχειρίδιο σωληναρίου PAXgene Blood RNA Tube*. Εάν είναι απαραίτητο, στο Παράρτημα Γ (σελίδα 69) μπορείτε να βρείτε υποδείξεις σχετικά με τον χειρισμό των σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Διασφαλίστε ότι τα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) επωάζονται το λιγότερο για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου μετά τη λήψη αίματος, για να εξασφαλίσετε την πλήρη λύση των κυττάρων του αίματος. Επώαση του σωληναρίου PAXgene Blood RNA Tube (BRT) κατά τη διάρκεια της νύχτας μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερες αποδόσεις. Εάν ένα σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) μετά τη λήψη αίματος έχει αποθηκευθεί στους 2–8°C, –20°C ή –70°C, αφήστε πρώτα το σωληνάριο να εξισορροπηθεί σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν φυλάξτε το για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου πριν αρχίσετε τη διαδικασία.

- Διαβάστε τις πληροφορίες ασφάλειας στη σελίδα 11.
- Διαβάστε τις οδηγίες σχετικά με τον χειρισμό του RNA (Παράρτημα Α, σελίδα 66).
- Διασφαλίστε ότι όλα τα όργανα, όπως οι πιπέτες και ο επωαστήρας με ανακινητήρα, ελέγχονται και βαθμονομούνται τακτικά σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή.
- Ένας επωαστήρας με ανακινητήρα απαιτείται για τα στάδια 5 και 20. Ρυθμίστε τη θερμοκρασία του επωαστήρα με ανακινητήρα στους 55°C.
- Το δεσμευτικό ρυθμιστικό διάλυμα (BR2) μπορεί κατά την αποθήκευση να σχηματίσει ίζημα. Εάν είναι αναγκαίο, μπορείτε να το διαλύσετε με θέρμανση στους 37°C.
- Το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2 (BR4) παρέχεται σε συμπυκνωμένη μορφή. Πριν από την πρώτη χρήση, προσθέστε στη φιάλη 4 όγκους αιθανόλης (96–100% βαθμός καθαρότητας p.a.) όπως υποδεικνύεται στη φιάλη για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας.
- Πριν από την πρώτη χρήση του RNase-Free DNase Set, παρασκευάστε ένα αρχικό διάλυμα DNάσης I. Διαλύστε τη στερεή DNάση I (RNFD; 1.500 μονάδες Kunitz)* σε 550 μl ρυθμιστικού διαλύματος επαναιώρησης DNάσης (DRB), το οποίο παρέχεται με το σετ. Προσέξτε ώστε κατά το άνοιγμα του φιαλιδίου να μη χαθεί καμία ποσότητα DNάσης I (RNFD). Η ανασυσταμένη DNάση I (RNFD) δεν επιτρέπεται να αναδευτεί σε συσκευή vortex. Η DNάση I είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στη φυσική μετουσίωση. Αναμείξτε προσεκτικά μόνο με ήπια αναστροφή του σωληναρίου.
- Τα τρέχοντα δεδομένα δείχνουν ότι η ανασυσταμένη DNάση I (RNFD) μπορεί να αποθηκευθεί στους 2–8°C για έως 6 εβδομάδες. Για μακροχρόνια φύλαξη της DNάσης I (RNFD), αφαιρέστε το αρχικό διάλυμα από το γυάλινο φιαλίδιο, διαιρέστε το σε υποπολλαπλάσια μίας χρήσης (χρησιμοποιήστε τα σωληνάρια μικροφυγοκέντρησης 1,5 ml [MCT] που περιλαμβάνονται στο kit, τα οποία αρκούν για 5 υποπολλαπλάσια) και φυλάξτε στους –20°C για μέχρι 9 μήνες. Υποπολλαπλάσια που έχουν αποψυχθεί μπορούν να διατηρηθούν στους 2–8°C για μέχρι 6 εβδομάδες. Μην καταψύχετε εκ νέου τις ήδη αποψυγμένες ποσότητες.
- Κατά την ανασύσταση και διαίρεση σε υποπολλαπλάσια του διαλύματος DNάσης I (RNFD), λάβετε υπόψη τις οδηγίες σχετικά με τον χειρισμό του RNA (Παράρτημα Α, σελίδα 66).

* Οι μονάδες Kunitz είναι η κοινή μονάδα μέτρησης της DNάσης I, οριζόμενη ως η ποσότητα DNάσης I που προκαλεί αύξηση της A_{260} κατά 0,001 ανά λεπτό ανά χιλιοστόλιτρο στους 25°C, pH 5,0, με υψηλά πολυμερισμένο DNA ως υπόστρωμα (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 και 363).

Διαδικασία

1. Φυγοκεντρίστε το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) για 10 λεπτά σε 3.000–5.000 x g με έναν ρότορα ταλάντευσης.



Διασφαλίστε ότι το δείγμα αίματος επώασθηκε στο σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) το λιγότερο για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C), για να επιτύχετε πλήρη λύση των κυττάρων του αίματος.



Ο ρότορας πρέπει να περιέχει προσαρμογείς σωληναρίου για σωληνάρια με κοίλο πυθμένα. Εάν χρησιμοποιηθούν άλλοι τύποι προσαρμογέα σωληναρίου, είναι δυνατόν τα σωληνάρια να σπάσουν κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρισης.

2. Απομακρύνετε το υπερκείμενο υγρό με έκχυση ή με πιπέτα. Προσθέστε στο ίζημα 4 ml νερό ελεύθερο RNάσης (RNFW) και κλείστε το σωληνάριο με ένα νέο δευτερεύον κλείστρο BD Hemogard (περιέχεται στο kit).

Κατά την έκχυση του υπερκείμενου υγρού, προσέξτε ώστε το ίζημα να παραμείνει άθικτο και σκουπίστε το χείλος του σωληναρίου με ένα καθαρό χαρτομάντιλο.

3. Διαλύστε το ίζημα με ανάδευση σε vortex και φυγοκεντρίστε για 10 λεπτά σε 3.000–5.000 x g σε έναν ρότορα ταλάντευσης. Αφαιρέστε και απορρίψτε όλο το υπερκείμενο υγρό.

Μικρά κατακερματισμένα κύτταρα που παραμένουν στο υπερκείμενο υγρό μετά την ανάδευση σε vortex αλλά πριν τη φυγοκέντρωση δεν επηρεάζουν τη διαδικασία.



Η ελλιπής απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού θα αναχαιτίσει τη λύση και θα αραιώσει το παράγωγο της λύσης, επηρεάζοντας έτσι τις συνθήκες για τη δέσμευση του RNA στη μεμβράνη PAXgene.

4. Προσθέστε 350 μl ρυθμιστικού διαλύματος επαναιώρησης (BR1) και αναδεύστε σε vortex, μέχρις ότου το ίζημα να διαλυθεί ορατά.
5. Μεταφέρετε το δείγμα με πιπέτα σε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης 1,5 ml (MCT). Προσθέστε 300 μl δεσμευτικού ρυθμιστικού διαλύματος (BR2) και 40 μl πρωτεΐνης K (PK). Αναμείξτε για 5 δευτερόλεπτα με ανάδευση σε vortex και επώαστε για 10 λεπτά στους 55°C σε έναν επωαστήρα με ανακινήτηρα σε 400–1.400 rpm. Μετά την επώαση, ρυθμίστε τη θερμοκρασία του επωαστήρα με ανακινήτηρα στους 65°C (για το στάδιο 20).



Μην αναμειγνύετε το δεσμευτικό ρυθμιστικό διάλυμα (BR2) μαζί με την πρωτεΐνη K (PK) πριν από την προσθήκη τους στο δείγμα.

6. Μεταφέρετε με πιπέτα το παράγωγο λύσης απευθείας σε μια στήλη διαχωρισμού PAXgene Shredder (PSC, μοβ) τοποθετημένη μέσα σε σωληνάριο επεξεργασίας 2 ml (PT) και φυγοκεντρίστε για 3 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα (η οποία δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 20.000 x g).



Μεταφέρετε προσεκτικά με πιπέτα το παράγωγο λύσης στη στήλη διαχωρισμού (PSC) και ελέγξτε οπτικά την πλήρη μεταφορά του παραγώγου λύσης στη στήλη διαχωρισμού (PSC).

Για να αποφύγετε τυχόν ζημιές στις στήλες διαχωρισμού (PSC) και στα σωληνάρια (PT), μην υπερβαίνετε την ταχύτητα των 20.000 x g.



Μερικά δείγματα μπορεί να διαρρέουν διαμέσου της στήλης διαχωρισμού PAXgene Shredder (PSC) χωρίς φυγοκέντρωση. Αυτό οφείλεται στο χαμηλό ιξώδες ορισμένων δειγμάτων και δεν πρέπει να εκλαμβάνεται ως ένδειξη αστοχίας του προϊόντος.

7. Μεταφέρετε προσεκτικά όλο το υπερκείμενο υγρό του κλάσματος συνεχούς ροής σε ένα νέο σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης 1,5 ml (MCT) χωρίς διατάραξη του ιζήματος στο σωληνάριο επεξεργασίας.
8. Προσθέστε 350 μl αιθανόλης (96–100%, βαθμός καθαρότητας p.a.). Αναμείξτε με ανάδευση σε vortex και φυγοκεντρίστε για μικρό χρονικό διάστημα (1–2 δευτερόλεπτα σε 500–1.000 x g), για την απομάκρυνση σταγονιδίων από το εσωτερικό του καλύμματος του σωληναρίου.



Η διάρκεια της φυγοκέντρωσης δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 1–2 δευτερόλεπτα, καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ιζηματοποίηση των νουκλεϊκών οξέων και έτσι σε μειωμένη απόδοση του συνολικού RNA.

9. Μεταφέρετε με πιπέτα 700 μl του δείγματος σε μια στήλη διαχωρισμού PAXgene RNA (PRC, κόκκινη), την οποία προηγουμένως έχετε τοποθετήσει μέσα σε ένα σωληνάριο επεξεργασίας 2 ml (PT) και φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό σε 8.000–20.000 x g. Τοποθετήστε τη στήλη διαχωρισμού (PRC) σε ένα νέο σωληνάριο επεξεργασίας 2 ml (PT) και απορρίψτε το ήδη χρησιμοποιημένο σωληνάριο επεξεργασίας (PT) που περιέχει το υγρό συνεχούς ροής.
10. Μεταφέρετε με πιπέτα το εναπομείναν δείγμα στη στήλη διαχωρισμού PAXgene RNA (PRC) και φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό σε 8.000–20.000 x g. Τοποθετήστε τη στήλη

διαχωρισμού (PRC) σε ένα νέο σωληνάριο επεξεργασίας 2 ml (PT) και απορρίψτε το ήδη χρησιμοποιημένο σωληνάριο επεξεργασίας (PT) που περιέχει το υγρό συνεχούς ροής.



Μεταφέρετε προσεκτικά με πιπέτα το δείγμα στη στήλη διαχωρισμού (PRC) και ελέγξτε οπτικά την πλήρη μεταφορά του δείγματος στη στήλη διαχωρισμού (PRC).

11. Προσθέστε 350 µl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 1 (BR3) στη στήλη διαχωρισμού PAXgene RNA (PRC). Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό σε 8.000–20.000 x g. Τοποθετήστε τη στήλη διαχωρισμού (PRC) σε ένα νέο σωληνάριο επεξεργασίας 2 ml (PT) και απορρίψτε το ήδη χρησιμοποιημένο σωληνάριο επεξεργασίας (PT) που περιέχει το υγρό συνεχούς ροής.
12. Προσθέστε 10 µl αρχικού διαλύματος DNάσης I (RNFD) σε 70 µl ρυθμιστικού διαλύματος κατάτμησης DNA (RDD) σε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρισης 1,5 ml (MCT). Αναμείξτε με ελαφρά χτυπήματα του σωληναρίου με τα δάκτυλα και φυγοκεντρίστε για μικρό χρονικό διάστημα για τη συλλογή του υπολειπόμενου υγρού από τα τοιχώματα του σωληναρίου.

Για την επεξεργασία, για παράδειγμα, 10 δειγμάτων μεταφέρετε με πιπέτα 100 µl αρχικού διαλύματος DNάσης I (RNFD) σε 700 µl ρυθμιστικού διαλύματος κατάτμησης DNA (RDD). Χρησιμοποιήστε τα σωληνάρια μικροφυγοκέντρισης 1,5 ml (MCT) που περιέχονται στο kit.



Η DNάση I είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στη φυσική μετουσίωση. Αναμείξτε προσεκτικά το διάλυμα με ελαφρά χτυπήματα του σωληναρίου. Μη χρησιμοποιείτε αναδευτήρα vortex για την ανάμειξη.

13. Μεταφέρετε με πιπέτα το μείγμα επώασης της DNάσης I (RNFD) (80 µl) απευθείας στη μεμβράνη της στήλης διαχωρισμού PAXgene RNA (PRC) και τοποθετήστε στον πάγκο για 15 λεπτά στους 20–30°C.



Προσέξτε ώστε το μείγμα επώασης της DNάσης I (RNFD) να τοποθετηθεί απευθείας επάνω στη μεμβράνη. Η κατάτμηση με DNάση δεν θα ολοκληρωθεί αν ένα μέρος του μείγματος προσκολληθεί και παραμένει στα τοιχώματα ή στον δακτύλιο O της στήλης διαχωρισμού (PRC).

14. Μεταφέρετε με πιπέτα 350 µl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 1 (BR3) στη στήλη διαχωρισμού PAXgene RNA (PRC) και φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό σε 8.000–20.000 x

g. Τοποθετήστε τη στήλη διαχωρισμού (PRC) σε ένα νέο σωληνάριο επεξεργασίας 2 ml (PT) και απορρίψτε το ήδη χρησιμοποιημένο σωληνάριο επεξεργασίας (PT) που περιέχει το υγρό συνεχούς ροής.

15. Μεταφέρετε με πιπέτα 500 µl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 2 (BR4) στη στήλη διαχωρισμού PAXgene RNA (PRC) και φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό σε 8.000–20.000 x g. Τοποθετήστε τη στήλη διαχωρισμού (PRC) σε ένα νέο σωληνάριο επεξεργασίας 2 ml (PT) και απορρίψτε το ήδη χρησιμοποιημένο σωληνάριο επεξεργασίας (PT) που περιέχει το υγρό συνεχούς ροής.



Το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2 (BR4) παρέχεται σε συμπυκνωμένη μορφή. Διασφαλίστε ότι πριν από τη χρήση έχει προστεθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2 (BR4) αιθανόλη (βλέπε «Ενέργειες πριν από την έναρξη» στη σελίδα 50).

16. Προσθέστε και άλλα 500 µl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 2 (BR4) στη στήλη διαχωρισμού PAXgene RNA (PRC). Φυγοκεντρίστε για 3 λεπτά σε 8.000–20.000 x g.
17. Απορρίψτε το σωληνάριο επεξεργασίας (PT) που περιέχει το υγρό συνεχούς ροής και τοποθετήστε τη στήλη διαχωρισμού PAXgene RNA (PRC) σε ένα νέο σωληνάριο επεξεργασίας (PT) 2 ml. Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό σε 8.000–20.000 x g.
18. Απορρίψτε το σωληνάριο επεξεργασίας (PT) που περιέχει το υγρό συνεχούς ροής. Τοποθετήστε τη στήλη διαχωρισμού PAXgene RNA (PRC) σε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρισης (MCT) 1,5 ml και μεταφέρετε με πιπέτα 40 µl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (BR5) απευθείας στη μεμβράνη της στήλης διαχωρισμού PAXgene RNA (PRC). Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό σε 8.000–20.000 x g, για την έκλουση του RNA. Για να επιτύχετε έκλουση με μέγιστη αποτελεσματικότητα, είναι σημαντική η ύγρανση ολόκληρης της μεμβράνης με το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5).
19. Επαναλάβετε το στάδιο έκλουσης (στάδιο 18) όπως περιγράφεται, με 40 µl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (BR5) και το ίδιο σωληνάριο μικροφυγοκέντρισης (MCT).
20. Επωάστε το έκλουσμα για 5 λεπτά στους 65°C σε έναν επωαστήρα με ανακινητήρα (βλέπε στάδιο 5), χωρίς ανακίνηση. Ακολουθώς ψύξτε τα δείγματα αμέσως σε πάγο. Με την επώαση αυτή στους 65°C επιτυγχάνεται μετουσίωση του RNA για καθοδικές (downstream) εφαρμογές. Μην υπερβαίνετε τη διάρκεια ή τη θερμοκρασία επώασης.

21. Εάν τα δείγματα RNA δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν αμέσως, φυλάξτε τα στους -20°C ή -70°C .

Επειδή το RNA παραμένει μετουσιωμένο ακόμα και μετά από πολλαπλές καταψύξεις και αποψύξεις, δεν απαιτείται επανάληψη της επώασης στους 65°C . Εάν πρόκειται να χρησιμοποιήσετε τα δείγματα RNA για μια διαγνωστική ανάλυση, ακολουθήστε τις υποδείξεις του κατασκευαστή.

Για τον ακριβή και αξιόπιστο ποσοτικό προσδιορισμό του RNA, μέσω της μέτρησης της απορρόφησης στα 260 nm, συνιστούμε την αραιώση των δειγμάτων με 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Μια αραιώση του δείγματος με νερό ελεύθερο RNάσης μπορεί να οδηγήσει σε ανακριβείς χαμηλές τιμές.

Μηδενίστε το φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιώντας ένα τυφλό δείγμα που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) και ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl στην ίδια αναλογία με τα δείγματα που ελέγχονται. Το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) έχει υψηλή απορρόφηση στα 220 nm, που οδηγεί σε υψηλές τιμές απορρόφησης υποβάθρου εάν το φασματοφωτόμετρο δεν μηδενιστεί σωστά.

Σημείωση: Για τον ποσοτικό προσδιορισμό στο ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, χρησιμοποιήστε τη σχέση

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Βλέπε Παράρτημα Β, σελίδα 67.

* Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (SDS), τα οποία διατίθενται από τον προμηθευτή του προϊόντος.

Πρωτόκολλο: Αυτοματοποιημένη απομόνωση του συνολικού RNA από ανθρώπινο ολικό αίμα συλλεγμένο σε σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Σημαντικές υποδείξεις πριν από την εκκίνηση

- Βεβαιωθείτε ότι το κουτί του κιτ είναι άθικτο και χωρίς ζημιές, και ότι κανένα από τα ρυθμιστικά διαλύματα δεν παρουσιάζει διαρροές. Μη χρησιμοποιείτε κανένα κιτ που παρουσιάζει ζημιές.
- Κατά τη χρήση πιπέτας, βεβαιωθείτε για τη ρύθμιση του σωστού όγκου και ότι το υγρό αναρροφάται και διανέμεται προσεκτικά και πλήρως.
- Για να αποφύγετε τη μεταφορά δείγματος σε λανθασμένα σωληνάρια και πλαστικά αναλώσιμα, διασφαλίστε ότι όλα τα σωληνάρια επεξεργασίας (PT), τα σωληνάρια μικροφυγοκέντρισης (MCT) και οι προσαρμογείς ρότορα έχουν επισημανθεί κατάλληλα με ανεξίτηλο μαρκαδόρο. Επισημάνετε το κάλυμμα και το σώμα κάθε σωληναρίου μικροφυγοκέντρισης (MCT), το σώμα κάθε σωληναρίου επεξεργασίας (PT) και το εξωτερικό τοίχωμα κάθε προσαρμογέα ρότορα.
- Το πιστίλισμα δειγμάτων ή ρυθμιστικών διαλυμάτων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μπορεί να μειώσει την απόδοση και καθαρότητα του RNA.
- Εάν δεν υποδεικνύεται διαφορετικά, όλα τα στάδια του πρωτοκόλλου, συμπεριλαμβανομένων και αυτών της φυγοκέντρισης, πρέπει να εκτελεστούν σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C).

Εξαιτίας της υψηλής ευαισθησίας των μεθόδων ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων, κατά τον χειρισμό των δειγμάτων είναι απαραίτητες οι ακόλουθες προφυλάξεις για την αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης:

- Μεταφέρετε προσεκτικά με πιπέτα το δείγμα στο σωληνάριο επεξεργασίας (PT), στον πυθμένα του σωληναρίου, χωρίς να υγρανθεί το χείλος του σωληναρίου.

- Αλλάζετε πάντα τα ρύγχη πιπετών μετά από κάθε μεταφορά υγρού. Χρησιμοποιείτε ρύγχη πιπετών με φραγμό αερολυμάτων.
- Αποφύγετε την επαφή του ρύγχους της πιπέτας με τη μεμβράνη της στήλης διαχωρισμού (PRC, PSC).
- Μετά την ανάδευση σε vortex ή τη θέρμανση ενός σωληναρίου μικροφυγοκέντρισης (MCT), φυγοκεντρίστε σύντομα για την απομάκρυνση σταγονιδίων από το εσωτερικό του καλύμματος.
- Φοράτε γάντια σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Αντικαταστήστε αμέσως τα γάντια, εάν έλθουν σε επαφή με το δείγμα.

Ενέργειες πριν από την έναρξη

- Το αίμα πρέπει να συλλέγεται εντός των σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) σύμφωνα με τις οδηγίες που αναφέρονται στο *Εγχειρίδιο σωληναρίου PAXgene Blood RNA Tube*. Εάν είναι απαραίτητο, στο Παράρτημα Γ (σελίδα 69) μπορείτε να βρείτε υποδείξεις σχετικά με τον χειρισμό των σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Διασφαλίστε ότι τα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) επωάζονται το λιγότερο για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου μετά τη λήψη αίματος, για να εξασφαλίσετε την πλήρη λύση των κυττάρων του αίματος. Επώαση του σωληναρίου PAXgene Blood RNA Tube (BRT) κατά τη διάρκεια της νύχτας μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερες αποδόσεις. Εάν ένα σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) μετά τη λήψη αίματος έχει αποθηκευθεί στους 2–8°C, –20°C ή –70°C, αφήστε πρώτα το σωληνάριο να εξισορροπηθεί σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν φυλάξτε το για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου πριν αρχίσετε τη διαδικασία.
- Διαβάστε τις πληροφορίες ασφάλειας στη σελίδα 11.
- Διαβάστε τις «Σημαντικές σημειώσεις», σελίδα 38.
- Διαβάστε τις οδηγίες σχετικά με τον χειρισμό του RNA (Παράρτημα Α, σελίδα 66).
- Διαβάστε το *Εγχειρίδιο χρήστη QIAcube* και οποιεσδήποτε πρόσθετες πληροφορίες που παρέχονται μαζί με το QIAcube, προσέχοντας ιδιαίτερα τις πληροφορίες ασφάλειας.
- Διασφαλίστε ότι όλα τα όργανα, όπως οι πιπέτες και το QIAcube, ελέγχονται και βαθμονομούνται τακτικά σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή.
- Το δεσμευτικό ρυθμιστικό διάλυμα (BR2) μπορεί κατά την αποθήκευση να σχηματίζει ίζημα. Εάν είναι αναγκαίο, μπορείτε να το διαλύσετε με θέρμανση στους 37°C.

- Το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2 (BR4) παρέχεται σε συμπυκνωμένη μορφή. Πριν από την πρώτη χρήση, προσθέστε στη φιάλη 4 όγκους αιθανόλης (96–100% βαθμός καθαρότητας p.a.) όπως υποδεικνύεται στη φιάλη για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας.
- Πριν από την πρώτη χρήση του RNase-Free DNase Set, παρασκευάστε ένα αρχικό διάλυμα DNάσης I. Διαλύστε τη στερεή DNάση I (RNFD; 1.500 μονάδες Kunitz)* σε 550 μl ρυθμιστικού διαλύματος επαναιώρησης DNάσης (DRB), το οποίο παρέχεται με το σετ. Προσέξτε ώστε κατά το άνοιγμα του φιαλιδίου να μη χαθεί καμία ποσότητα DNάσης I (RNFD). Η ανασυσταμένη DNάση I (RNFD) δεν επιτρέπεται να αναδευτεί σε συσκευή vortex. Η DNάση I είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στη φυσική μετουσίωση. Αναμείξτε προσεκτικά μόνο με ήπια αναστροφή του σωληναρίου.
- Τα τρέχοντα δεδομένα δείχνουν ότι η ανασυσταμένη DNάση I (RNFD) μπορεί να αποθηκευθεί στους 2–8°C για έως 6 εβδομάδες. Για μακροχρόνια φύλαξη της DNάσης I (RNFD), αφαιρέστε το αρχικό διάλυμα από το γυάλινο φιαλίδιο, διαιρέστε το σε υποπολλαπλάσια μίας χρήσης (χρησιμοποιήστε τα σωληνάρια μικροφυγοκέντρησης 1,5 ml [MCT] που περιλαμβάνονται στο kit, τα οποία αρκούν για 5 υποπολλαπλάσια) και φυλάξτε στους –20°C για μέχρι 9 μήνες. Υποπολλαπλάσια που έχουν αποψυχθεί μπορούν να διατηρηθούν στους 2–8°C για μέχρι 6 εβδομάδες. Μην καταψύχετε εκ νέου τις ήδη αποψυχμένες ποσότητες.
- Κατά την ανασύσταση και διαίρεση σε υποπολλαπλάσια του διαλύματος DNάσης I (RNFD), λάβετε υπόψη τις οδηγίες σχετικά με τον χειρισμό του RNA (Παράρτημα Α, σελίδα 66).
- Εγκαταστήστε τον σωστό προσαρμογέα ανακινήτηρα (συμπεριλαμβάνεται στο QIAcube, χρησιμοποιήστε τον προσαρμογέα για σωληνάρια 2 ml με κλείστρο ασφαλείας, σημειωμένα με «2»), και τοποθετήστε το στατώ ανακινήτηρα στο επάνω μέρος του προσαρμογέα.
- Ελέγξτε το συρτάρι αποβλήτων και εάν είναι απαραίτητο αδειάστε το.
- Εγκαταστήστε τα πρωτόκολλα εάν δεν το έχετε ήδη κάνει για προηγούμενες εκτελέσεις. Εγκαταστήστε και τα δύο πρωτόκολλα «PAXgene Blood RNA Part A» και «PAXgene Blood RNA Part B». Βλέπε «Εγκατάσταση πρωτοκόλλων στο QIAcube», σελίδα 38.

* Οι μονάδες Kunitz είναι η κοινή μονάδα μέτρησης της DNάσης I, οριζόμενη ως η ποσότητα DNάσης I που προκαλεί αύξηση της A_{260} κατά 0,001 ανά λεπτό ανά χιλιοστόλιτρο στους 25°C, pH 5,0, με υψηλά πολυμερισμένο DNA ως υπόστρωμα (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 και 363).

Διαδικασία

1. Κλείστε την πόρτα του QIAcube και θέστε σε λειτουργία το QIAcube με τον κεντρικό διακόπτη (βλέπε εικόνα 15, σελίδα 39).
Ακούγεται ένας ήχος βομβητή και εμφανίζεται η αρχική οθόνη. Το όργανο εκτελεί αυτόματα τεστ αρχικοποίησης.
2. Ανοίξτε την πόρτα του QIAcube και τοποθετήστε τα απαραίτητα αντιδραστήρια και πλαστικά είδη μέσα στο QIAcube. Βλέπε «Φόρτωση του QIAcube», σελίδα 40.
Για οικονομία χρόνου, η φόρτωση μπορεί να διεξαχθεί κατά τη διάρκεια του ενός ή και των δύο ακόλουθων δεκάλεπτων σταδίων φυγοκέντρισης (στάδια 3 και 5).
3. Φυγοκεντρίστε το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) για 10 λεπτά σε 3.000–5.000 x g με έναν ρότορα ταλάντευσης.



Διασφαλίστε ότι το δείγμα αίματος επώασθηκε στο σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) το λιγότερο για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C), για να επιτύχετε πλήρη λύση των κυττάρων του αίματος.



Ο ρότορας πρέπει να περιέχει προσαρμογείς σωληναρίου για σωληνάρια με κοίλο πυθμένα. Εάν χρησιμοποιηθούν άλλοι τύποι προσαρμογέα σωληναρίου, είναι δυνατόν τα σωληνάρια να σπάσουν κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρισης.

4. Απομακρύνετε το υπερκείμενο υγρό με έκχυση ή με πιπέτα. Προσθέστε στο ίζημα 4 ml νερό ελεύθερο RNάσης (RNFW) και κλείστε το σωληνάριο με ένα νέο δευτερεύον κλείστρο BD Hemogard (περιέχεται στο kit).

Κατά την έκχυση του υπερκείμενου υγρού, προσέξτε ώστε το ίζημα να παραμείνει άθικτο και σκουπίστε το χείλος του σωληναρίου με ένα καθαρό χαρτομάντιλο.

5. Διαλύστε το ίζημα με ανάδευση σε vortex και φυγοκεντρίστε για 10 λεπτά σε 3.000–5.000 x g σε έναν ρότορα ταλάντευσης. Αφαιρέστε και απορρίψτε όλο το υπερκείμενο υγρό.

Μικρά κατακερματισμένα κύτταρα που παραμένουν στο υπερκείμενο υγρό μετά την ανάδευση σε vortex αλλά πριν τη φυγοκέντριση δεν επηρεάζουν τη διαδικασία.



Η ελλιπής απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού θα αναχαιτίσει τη λύση και θα αραιώσει το παράγωγο της λύσης, επηρεάζοντας έτσι τις συνθήκες για τη δέσμευση του RNA στη μεμβράνη PAXgene.

6. Προσθέστε 350 μl ρυθμιστικού διαλύματος επαναϊώρησης (BR1) και αναδεύστε σε vortex, μέχρις ότου το ίζημα να διαλυθεί ορατά.

7. Μεταφέρετε το δείγμα με πιπέτα σε σωληνάριο επεξεργασίας των 2 ml (PT).



Χρησιμοποιείτε τα σωληνάρια επεξεργασίας (PT) 2 ml που περιλαμβάνονται στο κιτ PAXgene Blood RNA Kit.

8. Φορτώστε τα ανοικτά σωληνάρια επεξεργασίας (PT) που περιέχουν το δείγμα στον ανακινητήρα QIAcube (βλέπε εικόνα 17, σελίδα 42). Οι θέσεις των δειγμάτων είναι αριθμημένες για εύκολη φόρτωση. Τοποθετήστε τα βύσματα του στατώ ανακινητήρα (συμπεριλαμβάνονται στο QIAcube) στις υποδοχές στην άκρη του στατώ ανακινητήρα δίπλα σε κάθε σωληνάριο επεξεργασίας. Αυτό καθιστά δυνατή την ανίχνευση των δειγμάτων κατά τη διάρκεια του ελέγχου φόρτωσης.



Βεβαιωθείτε ότι έχει εγκατασταθεί ο σωστός προσαρμογέας ανακινητήρα (Shaker Adapter, 2 ml, σωληνάρια με κλείστρο ασφαλείας, επισημασμένα με «2», που περιλαμβάνονται στο QIAcube).



Εάν επεξεργάζεστε λιγότερα από 12 δείγματα, βεβαιωθείτε ότι φορτώνετε το στατώ ανακινητήρα όπως φαίνεται στην εικόνα 21, σελίδα 46. Δεν είναι δυνατή η επεξεργασία ενός ή 11 δειγμάτων.

9. Κλείστε την πόρτα του οργάνου QIAcube (βλέπε εικόνα 15, σελίδα 39).

10. Επιλέξτε το πρωτόκολλο «PAXgene Blood RNA Part A» και εκκινήστε το.

Ακολουθήστε τις οδηγίες που δίνονται στην οθόνη αφής του QIAcube.



Βεβαιωθείτε ότι και τα δύο μέρη του προγράμματος (μέρος A και μέρος B) είναι εγκατεστημένα στο QIAcube (βλ. «Εγκατάσταση πρωτοκόλλων στο QIAcube», σελίδα 38).



Το QIAcube εκτελεί ελέγχους φόρτωσης για δείγματα, ρύγχη, προσαρμογείς ρότορα και φιάλες αντιδραστηρίων.

11. Μετά το τέλος του πρωτοκόλλου «PAXgene Blood RNA Part A», ανοίξτε την πόρτα του οργάνου QIAcube (βλέπε εικόνα 15, σελίδα 39). Απομακρύνετε και απορρίψτε τις στήλες διαχωρισμού PAXgene RNA (PRC) από τους προσαρμογείς ρότορα και τα άδεια σωληνάρια επεξεργασίας (PT) από τον ανακινητήρα.



Κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης, οι στήλες διαχωρισμού μεταφέρονται από τη θέση 1 του προσαρμογέα ρότορα (θέση καλύμματος L1) στη θέση 3 του προσαρμογέα ρότορα (θέση καλύμματος L2) από το όργανο (βλέπε εικόνα 19, σελίδα 44).

12. Κλείστε τα καλύμματα όλων των σωληναρίων μικροφυγοκέντρισης (MCT) 1,5 ml που περιέχουν το απομονωμένο RNA στους προσαρμογείς ρότορα (θέση 3, θέση καλύμματος L3, βλέπε εικόνα 19, σελίδα 44). Μεταφέρετε τα σωληνάρια μικροφυγοκέντρισης (MCT) 1,5 ml στον προσαρμογέα ανακινήτρια QIAcube (βλέπε εικόνα 17, σελίδα 42).

13. Κλείστε την πόρτα του οργάνου QIAcube (βλέπε εικόνα 15, σελίδα 39).

14. Επιλέξτε το πρωτόκολλο «PAXgene Blood RNA Part B» και εκκινήστε το.

Ακολουθήστε τις οδηγίες που δίνονται στην οθόνη αφής του QIAcube.



Το πρόγραμμα αυτό επωάζει τα δείγματα στους 65°C και μετουσιώνει το RNA για τις καθοδικές (downstream) εφαρμογές. Ακόμα και εάν η καθοδική (downstream) εφαρμογή συμπεριλαμβάνει ένα στάδιο θερμικής μετουσίωσης, μην παραλείπετε το στάδιο αυτό. Επαρκής μετουσίωση RNA είναι απαραίτητη για μέγιστη αποδοτικότητα στις καθοδικές (downstream) εφαρμογές.

15. Μετά το τέλος του προγράμματος «PAXgene Blood RNA Part B», ανοίξτε την πόρτα του οργάνου QIAcube (βλέπε εικόνα 15, σελίδα 39). Αμέσως τοποθετήστε τα σωληνάρια μικροφυγοκέντρισης (MCT) που περιέχουν το απομονωμένο RNA σε πάγο.



ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ: Θερμή επιφάνεια. Ο ανακινήτριας μπορεί να φθάσει σε θερμοκρασίες μέχρι 70°C. Μην τον αγγίζετε όταν είναι θερμός.



Μην αφήνετε το απομονωμένο RNA στο QIAcube. Δεδομένου ότι τα δείγματα δεν ψύχονται, το απομονωμένο RNA μπορεί να αποδομηθεί. Για το λόγο αυτό, εκτελέσεις παρασκευών δειγμάτων κατά τη διάρκεια της νύχτας χωρίς επιτήρηση δεν συνιστώνται.

16. Εάν τα δείγματα RNA δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν αμέσως, φυλάξτε τα στους – 20°C ή –70°C.

Επειδή το RNA παραμένει μετουσιωμένο μετά από επαναλαμβανόμενη ψύξη και απόψυξη, δεν είναι απαραίτητο να επαναλάβετε το πρωτόκολλο θερμικής επώασης («PAXgene Blood RNA Part B»). Εάν πρόκειται να χρησιμοποιήσετε τα δείγματα RNA για μια διαγνωστική ανάλυση, ακολουθήστε τις υποδείξεις του κατασκευαστή.

Για τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό του RNA, μέσω της μέτρησης της απορρόφησης στα 260 nm, συνιστούμε την αραιώση των δειγμάτων σε 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Μια αραιώση του δείγματος με νερό ελεύθερο RNάσης μπορεί να οδηγήσει σε ανακριβείς χαμηλές τιμές.

Μηδενίστε το φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιώντας ένα τυφλό δείγμα που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) και ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl στην ίδια αναλογία με τα δείγματα που ελέγχονται. Το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) έχει υψηλή απορρόφηση στα 220 nm, που οδηγεί σε υψηλές τιμές απορρόφησης υποβάθρου εάν το φασματοφωτόμετρο δεν μηδενιστεί σωστά.



Για τον ποσοτικό προσδιορισμό στο ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, χρησιμοποιήστε τη σχέση

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Βλέπε Παράρτημα Β, σελίδα 67.

17. Απομακρύνετε το στατώ φιαλών αντιδραστηρίων από το τραπέζι εργασίας του QIAcube (βλέπε εικόνα 17, σελίδα 42) και κλείστε όλες τις φιάλες με τα κατάλληλα επισημασμένα καλύμματα. Ρυθμιστικά διαλύματα σε φιάλες μπορούν να φυλαχθούν σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) για έως 3 μήνες. Απομακρύνετε και απορρίψτε τα αντιδραστήρια που παραμένουν στα σωληνάρια επεξεργασίας (PT) εντός των υποδοχών των σωληναρίων μικροφυγοκέντρισης QIAcube (βλέπε εικόνα 17, σελίδα 42). Απομακρύνετε και απορρίψτε τους προσαρμογείς ρότορα από τη φυγόκεντρο (βλέπε εικόνα 17, σελίδα 42). Αδειάστε το συρτάρι αποβλήτων QIAcube (βλέπε εικόνα 15, σελίδα 39). Κλείστε την πόρτα του οργάνου και θέστε εκτός λειτουργίας το όργανο με τον κεντρικό διακόπτη (βλέπε εικόνα 15, σελίδα 39).

* Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (SDS), τα οποία διατίθενται από τον προμηθευτή του προϊόντος.

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση ενδεχόμενων προβλημάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε και στη σελίδα Frequently Asked Questions (Συχνές ερωτήσεις) του κέντρου τεχνικής υποστήριξης της εταιρείας μας: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Οι επιστήμονες του τμήματος τεχνικής εξυπηρέτησης της QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι να απαντήσουν σε τυχόν ερωτήσεις σχετικά με τις πληροφορίες και τα πρωτόκολλα που περιέχονται στο παρόν εγχειρίδιο ή τις τεχνολογίες παρασκευής δειγμάτων και ανάλυσης (για πληροφορίες επικοινωνίας, ανατρέξτε στο οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε τον ιστότοπο www.qiagen.com).

Παρατηρήσεις και προτάσεις

Αποδόμηση του RNA

Επιμόλυνση RNάσης



Προσέχετε να μην προστεθεί RNάση στα αντιδραστήρια κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ή του μεταγενέστερου χειρισμού (βλ. Παράρτημα Α, σελίδα 66).

Χαμηλή απόδοση RNA

a) Λιγότερο από 2,5 ml αίματος συλλέχθηκαν στο σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



Βεβαιωθείτε ότι 2,5 ml αίματος συλλέγονται στο σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT, βλ. *Εγχειρίδιο σωληναρίου PAXgene Blood RNA Tube*).

b) Μέτρηση συγκέντρωσης RNA στο νερό



Το RNA πρέπει να αραιώνεται σε 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* για ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό (βλ. Παράρτημα Β, σελίδα 67).

c) Μεταφορά κατακερματισμένων κυττάρων στη στήλη διαχωρισμού PAXgene RNA (PRC) στα στάδια 9 και 10 του χειροκίνητου πρωτοκόλλου



Αποφύγετε τη μεταφορά μεγάλων σωματιδίων όταν μεταφέρετε με πιπέτα το υπερκείμενο υγρό στο στάδιο 7 του χειροκίνητου πρωτοκόλλου (μεταφορά μικρών σωματιδίων δεν θα επηρεάσει τη διαδικασία).

* Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (SDS), τα οποία διατίθενται από τον προμηθευτή του προϊόντος.

Παρατηρήσεις και προτάσεις

- d) Μη ολοκληρωτική απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού στο στάδιο 3



Βεβαιωθείτε ότι το υπερκείμενο υγρό απομακρύνθηκε πλήρως. Κατά την έκχυση του υπερκείμενου υγρού, απομακρύνετε τα σταγονίδια από το χείλος του σωληναρίου PAXgene Blood RNA Tube (BRT) με ένα χαρτομάντιλο. Λάβετε προφυλάξεις για την αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης.

- e) Μετά τη συλλογή στο σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT), το αίμα επωάστηκε για λιγότερο από 2 ώρες



Μετά τη συλλογή στο σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT), επώαστε το αίμα τουλάχιστον για 2 ώρες.

Χαμηλή τιμή A_{260}/A_{280}

- a) Χρησιμοποιήθηκε νερό για την αραίωση του RNA για τη μέτρηση A_{260}/A_{280}



Χρησιμοποιήστε 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, για την αραίωση του RNA πριν από τη μέτρηση της καθαρότητας* (βλ. Παράρτημα B, σελίδα 67).

- b) Το φασματοφωτόμετρο δεν μηδενίστηκε σωστά



Μηδενίστε το φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιώντας ένα τυφλό δείγμα που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) και 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, στην ίδια αναλογία με τα δείγματα που ελέγχονται. Το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) έχει υψηλή απορρόφηση στα 220 nm, που οδηγεί σε υψηλές τιμές απορρόφησης υποβάθρου εάν το φασματοφωτόμετρο δεν μηδενιστεί σωστά.

Δυσλειτουργία του οργάνου

Το QIAcube δεν λειτούργησε σωστά

Διαβάστε το *Εγχειρίδιο χρήση QIAcube* δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στην ενότητα αντιμετώπισης προβλημάτων. Διασφαλίστε ότι το QIAcube συντηρείται σωστά, όπως περιγράφεται στο *Εγχειρίδιο χρήση QIAcube*.

* 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.

Παράρτημα Α: Γενικές υποδείξεις για τον χειρισμό του RNA

Χειρισμός RNA



Οι ριβονουκλεάσες (RNάσες) είναι ιδιαίτερα σταθερά και ενεργά ένζυμα τα οποία γενικά δεν χρειάζονται συμπαράγοντες για να λειτουργήσουν. Επειδή οι RNάσες αδρανοποιούνται δύσκολα και ακόμα και μικρές ποσότητες επαρκούν για την αποδόμηση του RNA, δεν πρέπει να χρησιμοποιείτε γυάλινα ή πλαστικά υλικά εργαστηρίου τα οποία δεν είναι απαλλαγμένα από κάθε πρόσμιξη με RNάση. Θα πρέπει να είστε ιδιαίτεροι προσεκτικοί και να αποφεύγετε την ακούσια προσθήκη RNάσων στο δείγμα RNA κατά τη διάρκεια ή μετά τη διαδικασία καθαρισμού. Για τη δημιουργία και διατήρηση ενός πεδίου ελεύθερου RNάσης, πρέπει όσο εργάζεστε με RNA να τηρείτε τα ακόλουθα μέτρα προστασίας κατά την προκαταρκτική επεξεργασία και τη χρήση των δοχείων και διαλυμάτων μίας χρήσης και πολλαπλών χρήσεων.

Γενικός χειρισμός



Κατά την εργασία με RNA πρέπει πάντοτε να εφαρμόζονται οι κατάλληλες μικροβιολογικές τεχνικές ασηψίας. Τα χέρια και τα σωματίδια σκόνης μεταφέρουν βακτήρια και μύκητες που αποτελούν τις συχνότερες αιτίες επιμόλυνσης με RNάση. Για το λόγο αυτό, φοράτε πάντοτε γάντια από λατέξ ή βινύλιο όταν εργάζεστε με αντιδραστήρια και δείγματα RNA, για να αποφύγετε την επιμόλυνση με RNάση από την επιφάνεια του δέρματος ή από σκονισμένα όργανα του εργαστηρίου. Αλλάζετε γάντια συχνά και διατηρείτε τα σωληνάρια κλειστά όποτε είναι δυνατόν. Διατηρείτε το καθαρό RNA σε πάγο όταν υποπολλαπλάσια μεταφέρονται με πιπέτα για τις καθοδικές (downstream) εφαρμογές.

Πρωτόκολλα για την απομάκρυνση προσμίξεων RNάσης από γυάλινα υλικά και διαλύματα μπορείτε να βρείτε σε γενικούς οδηγούς μοριακής βιολογίας, όπως π.χ. στο Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Παράρτημα Β: Ποσοτικοποίηση και προσδιορισμός της ποιότητας του συνολικού RNA

Ποσοτικοποίηση RNA

Η συγκέντρωση του RNA θα πρέπει να προσδιορίζεται με τη μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm (A_{260}) στο φασματοφωτόμετρο. Για τη διασφάλιση της σημαντικότητας, οι τιμές πρέπει να εμπίπτουν στο γραμμικό εύρος του φασματοφωτομέτρου. Η απορρόφηση 1 μονάδας στα 260 nm αντιστοιχεί σε 44 µg RNA ανά ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$). Η σχέση αυτή ισχύει μόνο για μετρήσεις σε 10 mM Tris-HCl,* pH 7,5. Για το λόγο αυτό, εάν είναι απαραίτητο να αραιωθεί το δείγμα RNA, αυτό θα πρέπει να γίνει σε 10 mM Tris-HCl. Όπως περιγράφεται παρακάτω (βλέπε «Καθαρότητα του RNA» στη σελίδα 68), η αναλογία των τιμών απορρόφησης στα 260 nm και 280 nm δίνει μια εκτίμηση της καθαρότητας του RNA. Κατά τη μέτρηση των δειγμάτων RNA, βεβαιωθείτε ότι οι κυβέτες είναι ελεύθερες RNάσης. Μηδενίστε το φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιώντας ένα τυφλό δείγμα που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) και ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl στην ίδια αναλογία με τα δείγματα που ελέγχονται. Το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) έχει υψηλή απορρόφηση στα 220 nm, που οδηγεί σε υψηλές τιμές απορρόφησης υποβάθρου εάν το φασματοφωτόμετρο δεν μηδενιστεί σωστά. Ένα παράδειγμα για τον υπολογισμό του ποσοτικού προσδιορισμού του RNA δίνεται παρακάτω.

* Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (SDS), τα οποία διατίθενται από τον προμηθευτή του προϊόντος.

Όγκος δείγματος RNA	=	80 μ l
Αραίωση (1/15)	=	10 μ l δείγματος RNA + 140 μ l 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Μέτρηση απορρόφησης του αραιωμένου δείγματος σε κυβέτα (ελεύθερη RNάσης).		
A_{260}	=	0,3
Συγκέντρωση δείγματος	=	$44 \times A_{260} \times \text{συντελεστής αραίωσης}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 μ g/ml
Συνολική απόδοση	=	συγκέντρωση \times όγκος δείγματος σε ml
	=	$198 \mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml}$
	=	15,8 μ g RNA

Καθαρότητα του RNA

Η αναλογία των τιμών στα 260 nm και 280 nm (A_{260}/A_{280}) παρέχει μια εκτίμηση της καθαρότητας του RNA όσον αφορά τις ουσίες επιμόλυνσης που απορροφούν το υπεριώδες (UV) φως, όπως η πρωτεΐνη. Ωστόσο, η αναλογία A_{260}/A_{280} εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την τιμή του pH. Χαμηλό pH έχει ως αποτέλεσμα χαμηλή αναλογία A_{260}/A_{280} και μειωμένη ευαισθησία έναντι επιμολύνσεων με πρωτεΐνη.* Για ακριβείς τιμές, προτείνουμε τη μέτρηση της απορρόφησης σε 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Το καθαρό RNA έχει αναλογία A_{260}/A_{280} 1,8–2,2 σε 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Μηδενίστε το φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιώντας ένα τυφλό δείγμα που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) και ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl στην ίδια αναλογία με τα δείγματα που ελέγχονται. Το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (BR5) έχει υψηλή απορρόφηση στα 220 nm, που οδηγεί σε υψηλές τιμές απορρόφησης υποβάθρου εάν το φασματοφωτόμετρο δεν μηδενιστεί σωστά.

* 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.

Παράρτημα Γ: Χειρισμός των σωληναρίων PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Οι ακόλουθες συστάσεις από την BD μπορεί να είναι χρήσιμες όταν χειρίζεστε σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Βλ. το *Εγχειρίδιο σωληναρίου PAXgene Blood RNA Tube* για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Οδηγίες για την αφαίρεση του κλείστρου BD Hemogard

1. Πιάστε με το ένα χέρι το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT), τοποθετώντας τον αντίχειρα κάτω από το κλείστρο BD Hemogard. (Για επιπλέον σταθερότητα, στηρίξτε τον βραχίονά σας σε μια σταθερή επιφάνεια.) Γυρίστε με το άλλο χέρι το κλείστρο BD Hemogard, ενώ συγχρόνως πιέζετε με τον αντίχειρα το κλείστρο προς τα επάνω ΜΕΧΡΙ ΝΑ ΧΑΛΑΡΩΣΕΙ ΤΟ ΠΩΜΑ ΕΙΣΧΩΡΗΣΗΣ ΤΟΥ ΣΩΛΗΝΑΡΙΟΥ.
2. Απομακρύνετε τον αντίχειρα πριν την αφαίρεση του κλείστρου. ΜΗΝ πιέζετε το κλείστρο για να το αφαιρέσετε από το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) με τον αντίχειρα. Προσοχή: Εάν το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) περιέχει αίμα, υπάρχει κίνδυνος έκθεσης σε μολυσματικές ουσίες. Για την αποφυγή τραυματισμού κατά την αφαίρεση του κλείστρου, είναι σημαντικό να απομακρύνετε τον αντίχειρα με τον οποίο πιέζετε το κλείστρο προς τα επάνω από το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) αμέσως μόλις χαλαρώσει το κλείστρο BD Hemogard.
3. Απομακρύνετε το κλείστρο από το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Στην απίθανη περίπτωση που το πλαστικό προστατευτικό κάλυμμα αποχωριστεί από το ελαστικό πώμα εισχώρησης, ΜΗΝ ΠΡΟΣΠΑΘΗΣΕΤΕ ΝΑ ΕΠΑΝΑΣΥΝΑΡΜΟΛΟΓΗΣΕΤΕ ΤΟ ΚΛΕΙΣΤΡΟ. Αφαιρέστε προσεκτικά το ελαστικό πώμα εισχώρησης από το σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Οδηγίες για την εισαγωγή του δευτερεύοντος κλείστρου BD Hemogard

1. Τοποθετήστε ξανά το κλείστρο στο σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Περιστρέψτε και ωθήστε προς τα κάτω το πώμα εισχώρησης μέχρι να επανεισαχθεί πλήρως. Το πώμα εισχώρησης πρέπει να επανεισαχθεί πλήρως προκειμένου το κλείστρο να παραμείνει σταθερά στη θέση του στο σωληνάριο PAXgene Blood RNA Tube (BRT) κατά τον χειρισμό.

Πληροφορίες παραγγελίας

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 στήλες διαχωρισμού PAXgene, 50 στήλες διαχωρισμού ομογενοποίησης, σωληνάρια επεξεργασίας, DNάση I ελεύθερη RNάσης, αντιδραστήρια και ρυθμιστικά διαλύματα ελεύθερα RNάσης. Για χρήση σε συνδυασμό με τα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 σωληνάρια λήψης αίματος	762165
Σχετικά προϊόντα που μπορούν να παραγγελθούν από την QIAGEN		
Starter Pack, QIAcube	Το πακέτο περιλαμβάνει: στατώ φιαλών αντιδραστηρίων (3), ταινίες επισήμανσης στατώ (8), ρύγχη με φίλτρο 200 µl (1.024), ρύγχη με φίλτρο 1.000 µl (1.024), ρύγχη με φίλτρο 1.000 µl μεγάλης διαμέτρου (1.024), φιάλες αντιδραστηρίων 30 ml (18), προσαρμογείς ρότορα (240), στήριγμα προσαρμογέα ρότορα	990395
Filter-Tips, 1.000 µl (1024)	Στείρα, αναλώσιμα ρύγχη πιπετών με φίλτρο, σε θήκες	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Φιάλες αντιδραστηρίων (30 ml) με καλύμματα, συσκευασία των 6, για χρήση με το στατώ φιαλών αντιδραστηρίων QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	Για 240 παρασκευές: 240 προσαρμογείς ρότορα μίας χρήσης, για χρήση με το QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Στατώ για τη συγκράτηση φιαλών αντιδραστηρίων 6 x 30 ml στο τραπέζι εργασίας QIAcube	990390

Rotor Adapter Holder	Στήριγμα για 12 αναλώσιμους προσαρμογείς ρότορα, για χρήση με το QIAcube	990392
----------------------	--	--------

Σχετικά προϊόντα που μπορούν να παραγγελθούν από την BD*

Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: Βελόνες 21G, 0,75 ιντσών (0,8 x 19 mm), σωλήνας 12 ιντσών (305 mm) με προσαρμογέα luer, 50 ανά κουτί, 200 ανά κιβώτιο.	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Περιβλήμα μόνο για διάμετρο 13 mm και 16 mm, 1.000/κιβώτιο	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm, αναρρόφηση 4,0 ml, με κόκκινο κλείστρο BD Hemogard και χάρτινη ετικέτα, 100/κουτί, 1.000/ανά κιβώτιο	368975

* Τα αναφερόμενα παρελκόμενα για τη λήψη αίματος αποτελούν συνήθη προϊόντα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν με τα σωληνάρια PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με αυτά τα παρελκόμενα, καθώς και για πληροφορίες παραγγελίας, επισκεφτείτε τη διεύθυνση www.preanalytix.com.

Για τις τρέχουσες πληροφορίες άδειας χρήσης και αποποιήσεις σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο αντίστοιχο εγχειρίδιο ή στις οδηγίες χρήσης του κιτ PreAnalytiX ή QIAGEN. Τα εγχειρίδια και οι οδηγίες χρήσης των κιτ της PreAnalytiX και της QIAGEN διατίθενται στους ιστοτόπους www.preanalytix.com και www.qiagen.com ή μπορείτε να τα ζητήσετε από το τμήμα τεχνικής εξυπηρέτησης της PreAnalytiX.

Ιστορικό αναθεώρησης εγχειριδίου

Έγγραφο και αναθεώρηση	Αλλαγές	Ημερομηνία
HB-0101-004, R2	Αλλαγές για συμμόρφωση με τους κανονισμούς του GHS (Globally Harmonised System) σε ολόκληρο το έγγραφο	Ιούνιος 2015
HB-0101-005, R3	Νέο πρότυπο, αναθεωρήσεις στο αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο και στα δεδομένα απόδοσης, ενημέρωση των πληροφοριών ασφάλειας για συμμόρφωση με τους κανονισμούς του GHS, αλλαγές στα στοιχεία του οργάνου και στη δήλωση των περιορισμών χρήσης του προϊόντος.	Φεβρουάριος 2019
HB-0101-006, R3	Διόρθωση του ονόματος του κιτ στον πίνακα με τα περιεχόμενα του κιτ στη σελίδα 5.	Ιανουάριος 2020

PreAnalytiX Worldwide

Τα προϊόντα PreAnalytiX διανέμονται από τις εταιρείες QIAGEN και BD

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

www.qiagen.com

www.PreAnalytiX.com

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

www.bd.com

www.PreAnalytiX.com

