

Tammikuu 2020

PAXgene[®] Blood RNA Kit -käsikirja

Versio 2

R3 **MAT** 1120409FI

IVD



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Tuottanut QIAGEN GmbH yhtiölle PreAnalytiX



50 (tuotenro 762174)

REF 762174



 **PreAnalytiX**

A QIAGEN / BD Company

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

PAXgene Blood RNA Kit -sarjoja ei ole saatavilla kaikissa maissa; kysy saatavuustietoja.

Rajoitettu lisenssisopimus

Tämän tuotteen käyttö tarkoittaa PAXgene Blood RNA Kit -sarjan ostajan tai käyttäjän suostumusta noudattaa seuraavia ehtoja:

1. PAXgene Blood RNA Kit -sarjaa saa käyttää ainoastaan *PAXgene Blood RNA Kit* -sarjan käsikirjan ohjeiden mukaisesti ja ainoastaan yhdessä sarjan sisältämien komponenttien kanssa. PreAnalytiX ei myönnä lisenssiä mihinkään aineettomaan omaisuuteensa, eikä tämän sarjan oheisia komponentteja saa käyttää tai liittää muihin komponentteihin, jotka eivät sisälly tähän sarjaan, kuten *PAXgene Blood RNA Kit* -sarjan käsikirjassa ja lisäprotokollissa mainitaan. Ne ovat saatavilla osoitteesta www.preanalytix.com.
2. PreAnalytiX ei takaa kuin nimenomaisissa lisensseissään, että tämä sarja ja/tai sen käyttäjä(t) eivät loukkaa minkään kolmannen tahon oikeuksia.
3. Tämä sarja ja sen komponentit on lisensoitu kertakäyttöön, eikä niitä saa käyttää uudelleen, kunnostaa tai myydä eteenpäin.
4. PreAnalytiX kiistää nimenomaisesti kaikki käyttöoikeudet, suorat tai epäsuorat, joita ei ole tässä nimenomaisesti ilmoitettu.
5. Sarjan ostaja ja käyttäjä suostuvat siihen, että he eivät ryhdy tai anna kenellekään toiselle lupaa ryhtyä toimenpiteisiin, jotka saattavat aiheuttaa tai edistää mitään yllä kiellettyä toimintaa.
6. PreAnalytiX voi käyttää minkä tahansa tuomioistuimen puoleen pannakseen täytäntöön tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kiellot ja saadakseen hyvityksen kaikista valmistelu- ja oikeuskuluista (asianajopalkkiot mukaan lukien), kun tarkoituksena on tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sarjaan ja/tai sen komponentteihin liittyvien immateriaalioikeuksien täytäntöönpano.

Päivitetty lisenssiehdot saa osoitteesta www.preanalytix.com.

Ehdollinen myynti

Tämän tuotteen mukana seuraa lisenssi patenttivaatimusten US-7,270,953 ja US-7,682,790 sekä EP-1820793 B1 ja näiden vierasmaalaisten vastineiden osien mukaisesti. Lisenssi koskee tuotteen käyttöä näytteenoton aikana muodostuneiden nukleiinihappokompleksien käsittelyyn PAXgene Blood RNA Tube -putkessa.

HB-0101-006 BD-8945 1120409 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, kaikki oikeudet pidätetään.

PreAnalytiX Company

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Sveitsi

www.preanalytix.com

PreAnalytiX-jälleenmyyjät

PreAnalytiX-tuotteet ovat QIAGEN- tai BD-yhtiön PreAnalytiXille valmistamia, ja niitä jälleenmyy PreAnalytiXin puolesta QIAGEN tai BD. Tuotteita ei voi tilata PreAnalytiX GmbH -yhtiöltä.

Katso viimeiseltä sivulta paikallisen PreAnalytiX-jälleenmyyjän yhteystiedot.

Sisältö

Sarjan sisältö	5
Merkinnät	7
Säilytysolosuhteet	8
Käyttötarkoitus	9
Tuotteen käytön rajoitukset	9
Laadunvalvonta	10
Tekninen apu	10
Turvallisuustiedot	10
Johdanto	14
Periaate ja toimenpide	14
Näytteen ottaminen ja stabilointi	15
RNA:n pitoisuus ja puhdistus	20
Manuaalinen RNA:n puhdistus	20
Automaattinen RNA:n puhdistus	30
Käyttäjän tarvitsemat varusteet ja reagenssit	36
Tärkeitä ilmoituksia	38
QIAcube-laitteen käyttäminen	38
QIAcube-laitteen käynnistäminen	38
Protokollien asentaminen QIAcube-laitteeseen	38
QIAcube-laitteen täyttäminen	40
Protokolla: Manuaalinen kokonais-RNA:n puhdistus ihmisen kokoverestä, joka on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkiin	49

Protokolla: Automaattinen kokonais-RNA:n puhdistus ihmisen kokoverestä, joka on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkiin	56
Ongelmien ratkaisu.....	63
Liite A: Yleisiä huomautuksia RNA:n käsittelystä	66
Liite B Kokonais-RNA:n kvantifiointi ja laadun määrittäminen	67
Liite C: PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkien käsitteleminen.....	69
Tilaustiedot.....	70
Käsikirjan muutoshistoria	72


Sarjan sisältö

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Tuotenumero			762174
Preparaatioiden määrä			50
BR1	Resuspension Buffer (Resuspensiopuskuri)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer* (Sidospuskuri)	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1* (Pesupuskuri 1*)	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) (Pesupuskuri 2) (tiiviste) [†]	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Eluutiopuskuri)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-free Water (bottle) (RNAasiton vesi [pullo])	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid) (Proteinaasi K) (vihreä korkki)	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (PAXgene RNA Spin Column -putket) (punainen)	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing tubes (2 ml) (Käsittelyputket) (2 ml)	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ -sulkimet	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (1,5 ml) (Mikrosentrifugiputket) (1,5 ml)	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilizs) (DNAasi I, RNAasiton) (kylmäkuivattu)	DNA REM	1500 Kunitz- yksikköä [‡]
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) -hajotuspuskuri (valkoinen korkki)	DNA DIG BUF	2 × 2 ml

*Ei sovellu käytettäväksi yhdessä valkaisuaineita sisältävien desinfointiaineiden kanssa. Sisältää guanidiinisuluaa. Lue turvallisuustiedot sivulta 10.

[†] Wash Buffer 2 (BR4) -pesupuskuri toimitetaan konsentraattina. Lisää ennen ensimmäistä käyttökertaa 4 tilavuutta etanolia (96–100 %, puhtausluokka p.a.) pullon merkintöjen mukaan työskentelyliuosta varten.

[‡] Kunitz-yksiköt ovat yleisesti käytettyjä yksiköitä DNAasi I:n mittaamiseen. Yksikön määritelmä on se DNAasi I:n määrä, joka aiheuttaa A₂₆₀:n nousun 0,001/minuutti/millilitra 25 °C:ssa, pH:ssa 5,0, käytettäessä erittäin polymeroitunutta DNA:ta substraattina (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 ja 363).

PAXgene Blood RNA Kit		(50)	
Tuotenumero		762174	
Preparaatioiden määrä		50	
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) -uudelleensuspensiopuskuri (putki, violetti kansi)	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (Spin Column -putket) (violetti)	PAXgene SHRED COL	5 ×10
Käsikirja	PAXgene Blood RNA Kit -sarjan käsikirja (versio 2)		1

Merkinnät



Sisältää reagensseja, jotka riittävät <N> testiin



Katso käyttöohjeet



Viimeinen käyttöpäivämäärä



Diagnostinen in vitro -lääkintälaitte



Tuotenumero



Eränumero



Materiaalinumero



Komponentit



Numero



Sterilointimenetelmä: säteily



Kunitz-yksiköt



Lisätty



Sisältö














Rekonstituoitu



Deoksiribonukleasi I



Etanoli

	Guanidiini-isotiosyanaatti
	RNase-Free DNase Set
	GTIN-numero
	Ei saa käyttää uudelleen
	Lämpötilarajoitus
	Lämpötilan yläraja
	Valmistaja
	Tärkeä ilmoitus
	Kirjoita päivämäärä etanolin lisäämisen jälkeen
	Vastaanotettaessa
	Seurauksena

Säilytysolosuhteet

PAXgene RNA spin columns (PRC) -putkia, PAXgene Shredder spin columns (PSC) -putkia, proteinaasi K (PK) -liuosta ja puskureita (BR1, BR2, BR3, BR4 ja BR5) voidaan säilyttää kuivina sarjan etiketissä ilmoitetussa lämpötilassa.

RNase-Free DNase Set -sarja, joka sisältää DNAasi I:ä (RNFD), DNA:n hajotuspuskuri (RDD) ja DNAasi-resuspensiopuskuri (DRB) kuljetetaan ympäristönlämpötilassa. RNase-Free DNase Set -sarjan kaikki osat on säilytettävä heti vastaanoton jälkeen etiketissä ilmoitetussa lämpötilassa. Kun sarjaa säilytetään ohjeiden mukaisesti, se on vakaa laatikossa mainittuun viimeiseen käyttöpäivään asti.

Käyttötarkoitus

PAXgene Blood RNA Kit -sarja on tarkoitettu solunsisäisen RNA:n puhdistamiseen kokoverestä, joka on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen. Kun sarjaa käytetään yhdessä PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putken kanssa, järjestelmä tuottaa puhdistettua solunsisäistä RNA:ta kokoverestä molekyyli diagnostiikkatesteissa käytettyä RT-PCR:ä varten. Katso *PAXgene RNA-veriputki käsikirjasta (PAXgene Blood RNA Tube Handbook)* lisätietoa PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) -putkien käytöstä.

PAXgene Blood RNA System -järjestelmän suorituskykyominaisuudet on määritetty vain FOS- ja IL1B-geenitranskriptien kanssa. Käyttäjä on vastuussa asianmukaisten PAXgene Blood RNA System -järjestelmän suorituskykyominaisuuksien määrittämisestä muille kohdetranskripteille.

Tuotteen käytön rajoitukset

PAXgene Blood RNA Kit -sarja on tarkoitettu solunsisäisen RNA:n puhdistamiseen ihmisen kokoverestä ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukosyyttiä/ml) in vitro -diagnostiikkaa varten. Sitä ei ole tarkoitettu genomisen DNA:n tai virusten nukleiinihappojen puhdistamiseen ihmisen kokoverestä. Koska stabilointimäärityksiä varten on validoitu vain muutama transkripti (FOS- ja IL1B-geenitranskriptit), suorituskykyominaisuuksia ei ole määritetty kaikille transkripteille. Laboratoriohenkilöstön on käytävä läpi valmistajan tiedot ja heidän omat tietonsa, kun he määrittävät, onko muiden transkriptien validointi tarpeen.

Tuote on tarkoitettu ammattihenkilöiden, kuten in vitro -diagnostiikkakoulutuksen saaneiden teknikoiden ja lääkäreiden käyttöön.

Laadunvalvonta

QIAGENin ISO-sertifioidun laadunhallintajärjestelmän mukaisesti jokainen PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erä testataan määritettyjen spesifikaatioiden mukaisesti tuotteiden yhdenmukaisen laadun takaamiseksi.

Tekninen apu

QIAGEN-yhtiön tarjoama tekninen tuki on huippulaatuista ja helposti saatavilla. Teknisen palvelun osastoillamme on kokeneita asiantuntijoita, joilla on laaja teoreettinen ja käytännöllinen molekyylibiologian osaaminen ja jotka hallitsevat PreAnalytiX-tuotteiden käytön. Jos sinulla on kysyttävää PAXgene Blood RNA Kit -sarjasta, ota meihin yhteyttä. Autamme mielellämme.

Teknistä tukea ja lisätietoja saa ottamalla yhteyttä QIAGENin tekniseen palvelupisteeseen.

Turvallisuustiedot

Työskennellessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja.

Infektiovaaran (esim. HIV:n tai hepatiitti B -viruksen tarttumisen) tai loukkaantumisen välttämiseksi työskennellessä biologisten ja kemiallisten materiaalien kanssa on aina käytettävä sopivaa laboratoriotakkia, kertakäyttöisiä käsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvavaroituksista. Ne ovat saatavilla kätevässä ja kompaktissa PDF-muodossa osoitteessa **www.preanalytix.com**, jossa voidaan tarkastella ja tulostaa tämän sarjan käyttöturvallisuustiedote.

HUOMIO

ÄLÄ lisää valkaisuainetta tai happamia liuoksia suoraan näytteen preparointijätteeseen.

Binding buffer (BR2) ja wash buffer 1 (BR3) sisältävät guanidiinitiosyanaattia, joka valkaisuaineeseen yhdistettynä voi muodostaa herkästi reagoivia aineita. Jos Binding buffer (BR2) tai wash buffer 1 (BR3) läikkyvät, puhdista läikynnät sopivalla laboratoriopuhdistusaineella ja vedellä. Jos läikkynyt neste sisältää mahdollisia tartunnanaiheuttajia, puhdista alue ensin laboratoriokäyttöön sopivalla puhdistusaineella ja vedellä sekä sen jälkeen 1 % (v/v) natriumhypokloriitilla.

RNA:n stabilointiliuoksen ja veren seos PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkesta voidaan desinfioida käyttämällä 1 osa valkaisuainetta (5-prosenttinen natriumhypokloriitti) kohti 9 osaa RNA:n stabilointiliuoksen ja veren seosta.

Näytteen valmistelujäte, kuten RNA:n puhdistustoimenpiteen sentrifugointivaiheen tuottamat supernatantit, on katsottava mahdollisesti tartuntavaaralliseksi. Ennen hävittämistä jäte on autoklavoitava tai poltettava tartuntavaarallisen aineen tuhoamiseksi. Hävitys on tehtävä virallisten määräysten mukaisesti.

Seuraavat varoitukset ja varotoimet koskevat PAXgene Blood RNA Kit -sarjan osia. Katso *PAXgene Blood RNA Tube -käsikirjasta* turvallisuustietoja PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkista.

BR2-puskuri



Sisältää: guanidiinitiosyanaattia. Vaara! Terveydelle haitallista nieltynä. Voi olla haitallista kosketuksissa ihoon tai hengitettynä. Aiheuttaa vakavaa silmien vahingoittumista. Haitallista vesieliöille, pitkäaikaisia haittavaikutuksia. Kosketus happoihin vapauttaa erittäin myrkyllistä kaasua. Käytä suojäkäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvonsuojainta. JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhtelee huolellisesti vedellä useiden minuuttien ajan. Poista mahdolliset piilolinssit, jos ne ovat helposti poistettavissa. Jatka huuhtelua. Soita heti MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkärille.

BR3-puskuri



Sisältää: etanolia, guanidiinitiosyanaattia. Vaara! Tulenarka neste ja höyry. Aiheuttaa vakavaa silmien vahingoittumista. Kosketus happoihin vapauttaa erittäin myrkyllistä kaasua. Pidettävä poissa lämmönlähteistä/kipinöistä/avotulesta/kuumista pinnoista. Ei tupakointia. Käytä suojäkäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvonsuojainta. JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhtelee huolellisesti vedellä useiden minuuttien ajan. Poista mahdolliset piilolinssit, jos ne ovat helposti poistettavissa. Jatka huuhtelua. Soita heti MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkärille.

DNaasi I



Sisältää: DNaasia. Vaara! Voi aiheuttaa allergisen ihoreaktion. Voi aiheuttaa hengitettynä allergia- tai astmaoireita tai hengitysvaikeuksia. Vältä pölyn/savun/kaasun/sumun/höyryn/suihkeen hengittämistä. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvonsuojainta. Käytä hengityksensuojainta. Altistumistapauksissa tai epävarmoissa tilanteissa: Ota yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkäriin. Siirrä altistunut henkilö raittiiseen ilmaan ja pidä lepoasennossa, jossa on helppo hengittää.

Proteinaasi K



Sisältää: proteinaasi K:ta. Vaara! Aiheuttaa vähäistä ihoärsytystä. Voi aiheuttaa hengitettynä allergia- tai astmaoireita tai hengitysvaikeuksia. Vältä pölyn/savun/kaasun/sumun/höyryn/suihkeen hengittämistä. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvonsuojainta. Käytä hengityksensuojainta. Altistumistapauksissa tai epävarmoissa tilanteissa: Ota yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkäriin. Siirrä altistunut henkilö raittiiseen ilmaan ja pidä lepoasennossa, jossa on helppo hengittää.

Johdanto

Kokoverinäytteen ottaminen on ensimmäinen vaihe useissa molekyyliäärityksissä, joilla tutkitaan solun RNA:ta. Suuri ongelma näissä testeissä on kuitenkin solun RNA-profiilin epävakaussa *in vitro*. PreAnalytiXin tutkimukset ovat osoittaneet, että yksittäisten mRNA-lajien kopiomäärät kokoveressä voivat vaihdella yli tuhatkertaisesti huoneenlämmössä tapahtuvan säilytyksen tai kuljetuksen aikana.* Tämän aiheuttaa sekä nopea RNA:n hajoaminen että tiettyjen geenien ekspressoituminen verinäytteen oton jälkeen. Tällaiset muutokset RNA:n ekspressioprofiilissa tekevät luotettavien geeniekspressiotutkimusten tekemisestä mahdotonta. Menetelmä, joka säilyttää RNA:n ekspressioprofiilin laskimopunktion aikana ja sen jälkeen, on siis erittäin tärkeää tarkan geeniekspression analysoimisessa ihmisen kokoverestä.

Periaate ja toimenpide

PreAnalytiX on kehittänyt uuden järjestelmän, joka mahdollistaa ihmisen kokoverinäytteiden ottamisen, stabiloinnin, säilytyksen ja kuljetuksen sekä nopean ja tehokkaan solunsisäisen RNA:n puhdistuskäytännön. Järjestelmä edellyttää PAXgene Blood RNA Tube -putkien (BRT; Yhdysvaltojen patentit 6,602,718 ja 6,617,170) käyttämistä verinäytteen ottamiseen ja RNA:n stabilointiin, minkä jälkeen RNA puhdistetaan manuaalisesti tai automaattisesti PAXgene Blood RNA Kit -sarjan avulla. Sekä manuaaliset että automaattiset protokollat mahdollistavat olennaisesti vastaavan suorituskyvyn RNA:n laadun ja tuoton osalta. Manuaalisen protokollan (sivut 23–30) ja automaattisen protokollan (sivut 33–35) suorituskykytiedot sisältyvät tähän käsikirjaan.

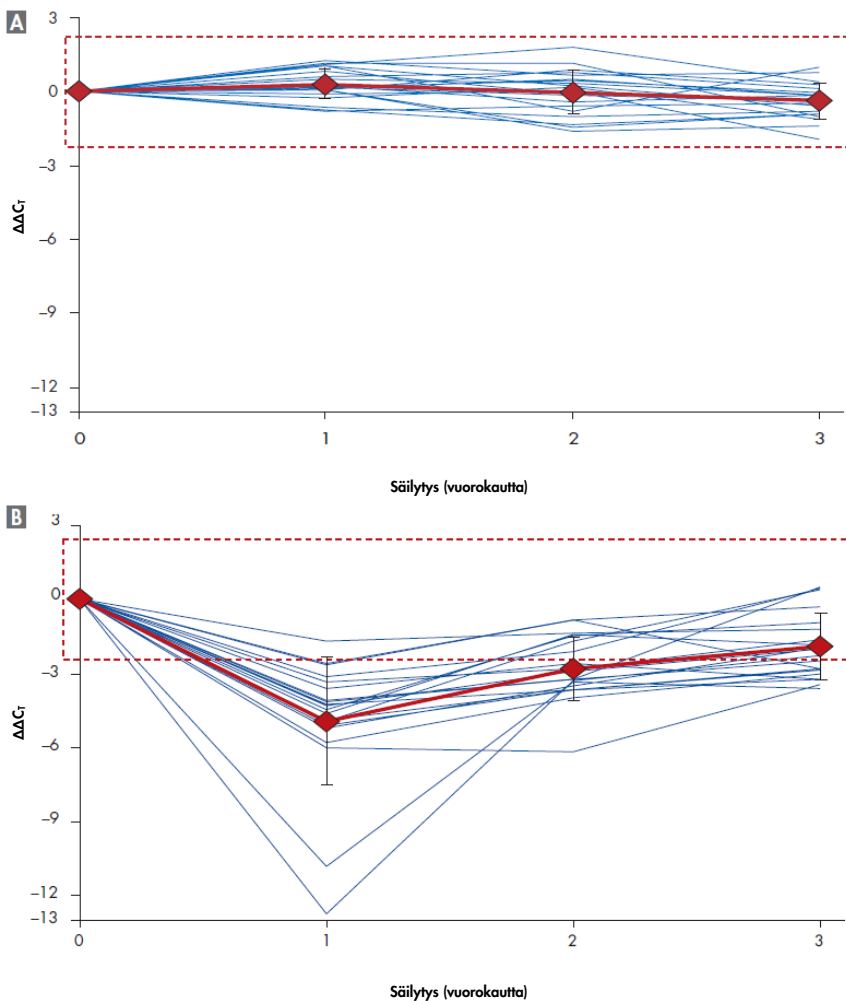
* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

Näytteen ottaminen ja stabilointi

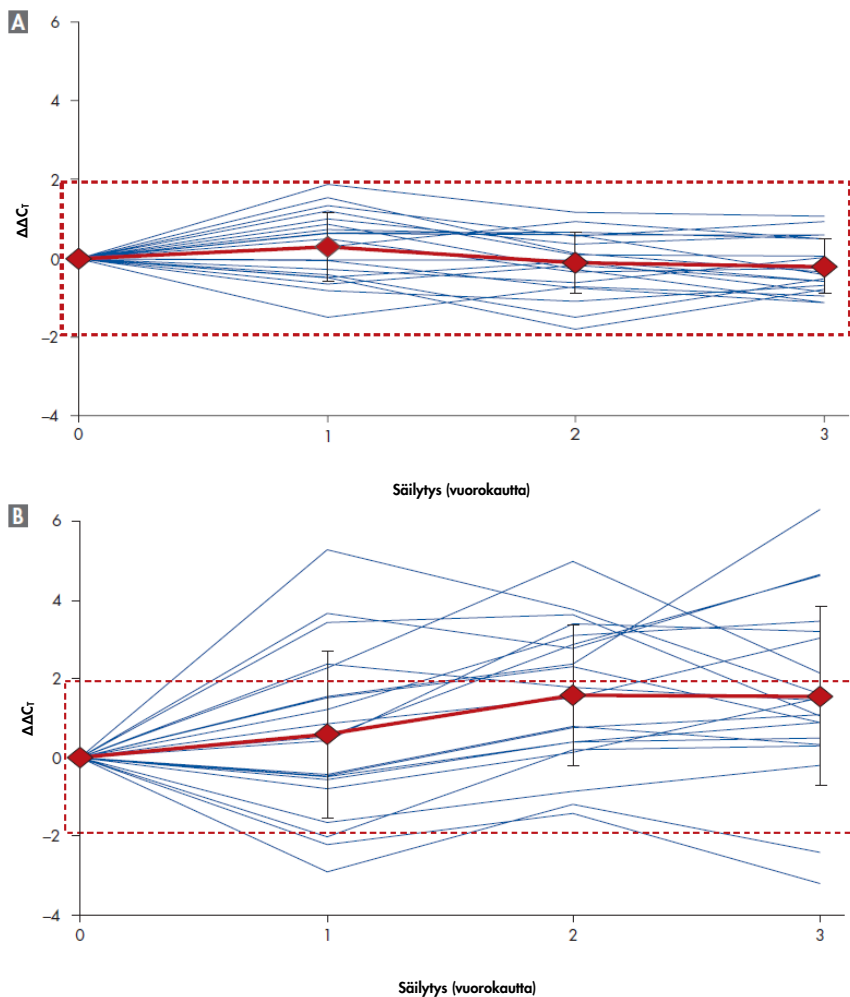
PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkissa on tekijänoikeudella suojattua reagenssiseosta, joka perustuu patentoituun RNA:n stabilointiteknikkaan. Tämä reagenssiseos suojaa RNA-molekyylejä RNAasin hajottavalta vaikutukselta ja minimoi geeniekspression muutokset *ex vivo*. PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putket on tarkoitettu ihmisen kokoverinäytteiden ottamiseen ja solun RNA:n stabiloimiseen enintään kolmen (3) vuorokauden ajan 18–25 °C:ssa (kuvat 1 ja 2, sivut 16 ja 17) tai enintään viiden (5) vuorokauden ajan 2–8 °C:ssa (kuvat 3 ja 4, sivut 18 ja 19). Saatavilla olevat tiedot osoittavat, että solujen RNA pysyy stabiilina vähintään 11 vuotta –20 tai –70 °C:ssa*. Lisätietoja meneillään olevista tutkimuksista, joissa arvioidaan stabiiliutta pidemmällä ajanjaksoilla, saat ottamalla yhteyden QIAGENin tekniseen palveluun.

RNA:n stabiiliuden todellinen kesto voi vaihdella solun RNA:n lajin ja käytetyn myöhemmän sovelluksen mukaan. Koska stabilointimääryiksiä varten on validoitu vain muutama transkripti (FOS- ja IL1B-geenitranskriptit), suorituskykyominaisuuksia ei ole määritetty kaikille transkripteille. Laboratorihenkilöstön on käytävä läpi valmistajan tiedot ja heidän omat tietonsa, kun he määrittävät, onko muiden transkriptien validointi tarpeen.

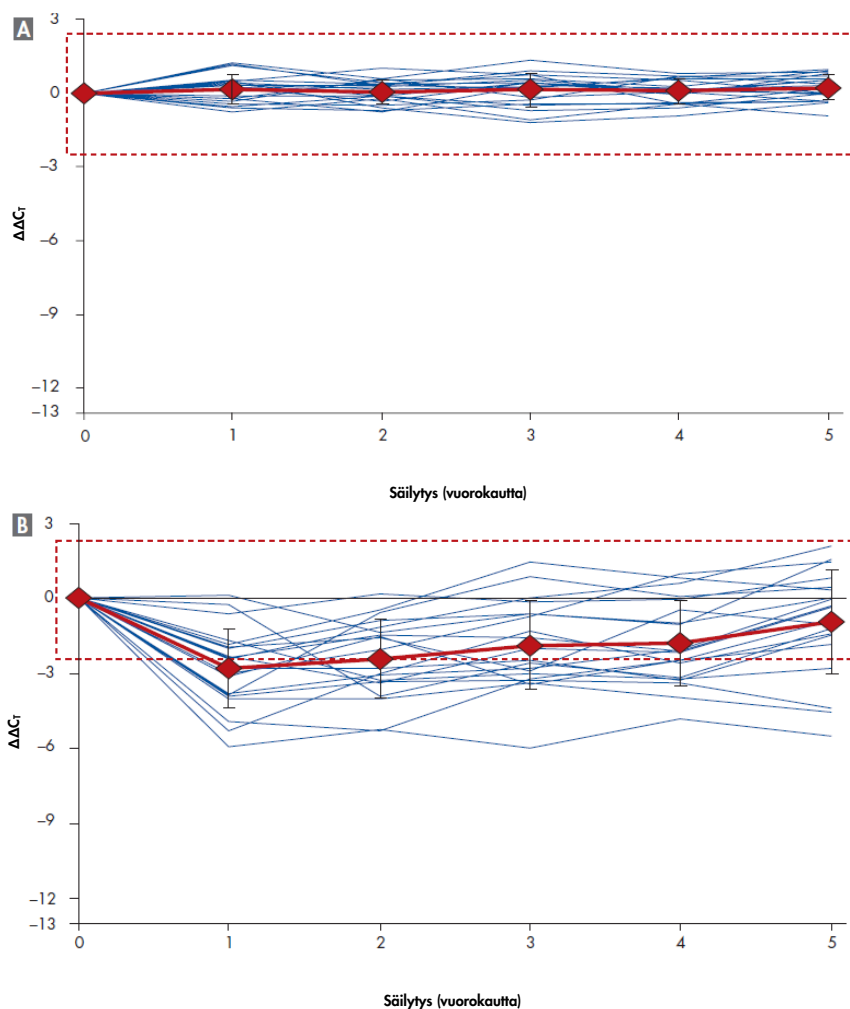
* Käynnissä on pitkäkestoinen tutkimus veren säilyttämisestä PAXgene Blood RNA Tube -putkissa.



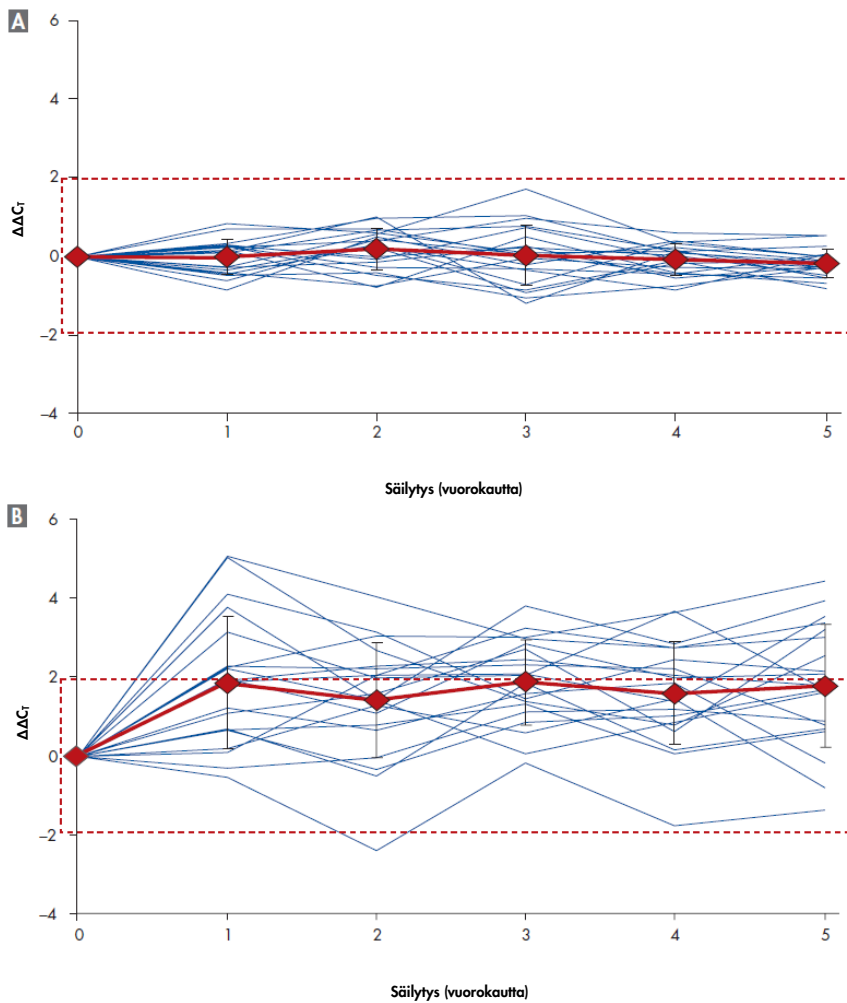
Kuva 1. RNA:n stabiilius verinäytteissä 18–25 °C:ssa: FOS. Verta otettiin 10 luovuttajalta tuplanäytteinä, ja sitä säilytettiin 18–25 °C:ssa ilmoitettu määrä päiviä, minkä jälkeen tehtiin kokonais-RNA:n puhdistus. **[A]** Verinäytteet otettiin ja säilytettiin PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkissa ja kokonais-RNA puhdistettiin PAXgene Blood RNA Kit -sarjan avulla. **[B]** Verinäytteet otettiin ja säilytettiin standardeissa verinäyteputkissa, joissa oli EDTA:a antikoagulanttina, ja kokonais-RNA puhdistettiin käyttämällä standardia orgaanista erotusmenetelmää ja piioksidikalvopohjaista RNA:n puhdistusta. Suhteelliset FOS-transkriptitasot määritettiin reaaliaikaisesti duplex-RT-PCR:llä käyttämällä 18S rRNA:ta sisäisenä standardina. Kaikkien näytteiden arvot on otettu mukaan kaavioon, kuten myös keskiarvot ja keskihajonnat kaikista näytteistä. Katkoviivat osoittavat määrittelyn $\pm 3\times$ kokonaistarkkuuden (2,34 C_t).



Kuva 2. RNA:n stabiilius verinäytteissä 18–25 °C:ssa: IL1B. Verinäyte otettiin ja kokonais-RNA puhdistettiin 18–25 °C:ssa säilyttämisen jälkeen, kuten kuvassa 1 on kuvattu. IL1B-transkriptin suhteelliset tasot määritettiin reaaliajassa duplex-RT-PCR:llä käyttämällä 18S rRNA:ta sisäisenä standardina. Kaikkien näytteiden arvot on otettu mukaan kaavioon, kuten myös keskiarvot ja keskihajonnat kaikista näytteistä. Katkoviivat osoittavat määrittelyn ± 3 kokonaistarkkuuden ($1,93 C_T$).



Kuva 3. RNA:n stabiilius verinäytteissä 2-8°C:ssa: FOS. Verta otettiin 10 luovuttajalta tuplanäytteinä, ja sitä säilytettiin 2-8°C:ssa ilmoitettu määrä päiviä, minkä jälkeen tehtiin kokonais-RNA:n puhdistus. **[A]** Verinäytteet otettiin ja säilytettiin PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkissa ja kokonais-RNA puhdistettiin PAXgene Blood RNA Kit -sarjan avulla. **[B]** Verinäytteet otettiin ja säilytettiin standardeissa verinäyteputkissa, joissa oli EDTA:a antikoagulanttina, ja kokonais-RNA puhdistettiin käyttämällä standardia orgaanista eristysmenetelmää ja piioksidikalvopohjaista RNA:n puhdistusta. Suhteelliset FOS-transkriptitasot määritettiin reaaliaikaisesti duplex-RT-PCR:llä käyttämällä 18S rRNA:ta sisäisenä standardina. Kaikkien näytteiden arvot on otettu mukaan kaavioon, kuten myös keskiarvot ja keskihajonnat kaikista näytteistä. Katkoviivat osoittavat määrityksen $\pm 3x$ kokonaistarkkuuden (2,34 C_t).



Kuva 4. RNA:n stabiilius verinäytteissä 2-8°C:ssa: IL1B. Verinäyte otettiin ja kokonais-RNA puhdistettiin 2-8°C:ssa säilyttämisen jälkeen, kuten kuvassa 3 on kuvattu. IL1B-transkriptin suhteelliset tasot määritettiin reaaliajassa duplex-RT-PCR:llä käyttämällä 18S rRNA:ta sisäisenä standardina. Kaikkien näytteiden arvot on otettu mukaan kaavioon, kuten myös keskiarvot ja keskihajonnat kaikista näytteistä. Katkoviivat osoittavat määrittelyn $\pm 3 \times$ kokonaistarkkuuden (1,93 C_T).

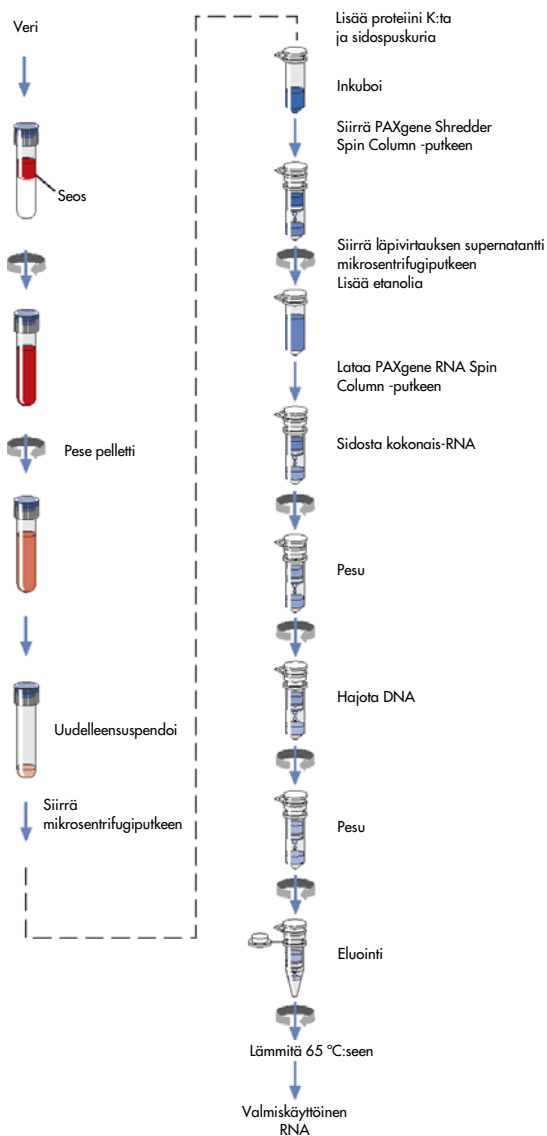
RNA:n pitoisuus ja puhdistus

PAXgene Blood RNA Kit -sarja on tarkoitettu kokonais-RNA:n puhdistamiseen 2,5 ml:sta ihmisen kokoverta, joka on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen. Toimenpide on yksinkertainen ja voidaan tehdä manuaalisesti tai automaattisesti (katso kuvat 5 ja 10, sivuilla 21 ja 31). Molemmissa protokollissa puhdistus alkaa sentrifugoinnilla, jolla pelletoidaan nukleiinihapot PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkissa. Pelletti pestään ja uudelleensuspendoidaan, minkä jälkeen tehdään manuaalinen tai automaattinen RNA:n puhdistus. Periaatteessa molemmissa protokollissa on samat vaiheet ja niissä käytetään samoja sarjan osia.

Manuaalinen RNA:n puhdistus

Tarkemmin sanottuna uudelleensuspendoitu pelletti inkuboidaan optimoiduissa puskureissa yhdessä proteinaasi K:n (PK) kanssa, jotta saadaan aikaan proteiinin hajoaminen. Lisäsentrifugointi PAXgene Shredder spin column (PSC) -putkella homogenoi solulysaatin ja irrottaa jääneen soluaineksen, ja läpivirtausfraktion supernatantti siirretään uuteen mikrosentrifugiputkeen. Sidontaolosuhteita säädetään lisäämällä etanolia ja lysaatti siirretään PAXgene RNA spin column (PRC) -putkeen. Lyhyen sentrifugoinnin aikana RNA sitoutuu selektiivisesti PAXgene-piiksidikalvoon, kun kontaminantit kulkevat sen läpi. Loput kontaminantit poistetaan useilla tehokkailla pesuvaiheilla. Ensimmäisen ja toisen pesuvaiheen välissä kalvoa käsitellään DNAasi I:llä (RNFD), jotta pienet sitoutuneen DNA:n hiukkaset saadaan poistettua. Pesuvaiheiden jälkeen RNA eluoidaan eluutiopuskuriin (BR5) ja denaturoidaan lämmöllä.

PAXgene Blood RNA System -järjestelmällä puhdistettu kokonais-RNA on puhdasta. Käytettäessä manuaalista käytäntöä A_{260}/A_{280} -arvot ovat välillä 1,8–2,2 ja $\leq 1\%$:n (w/w) genomista DNA:ta on läsnä $\geq 95\%$:ssa kaikista näytteistä mitattuna beeta-aktiininigeenisekvenssin kvantitatiivisella reaaliaikaisella PCR:llä. Vähintään 95% :ssa näytteistä ei näy inhibitiota RT-PCR:ssä, kun käytetään enintään 30% eluaatista.

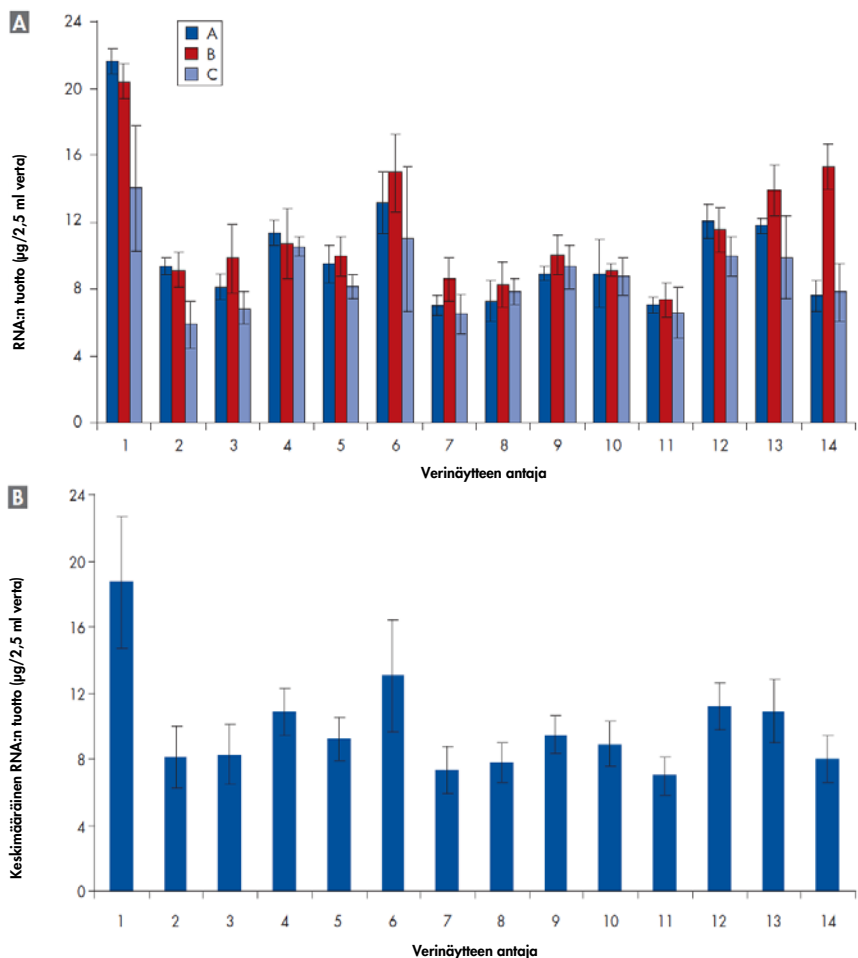


Kuva 5. Manuaalinen PAXgene Blood RNA -käytäntö.

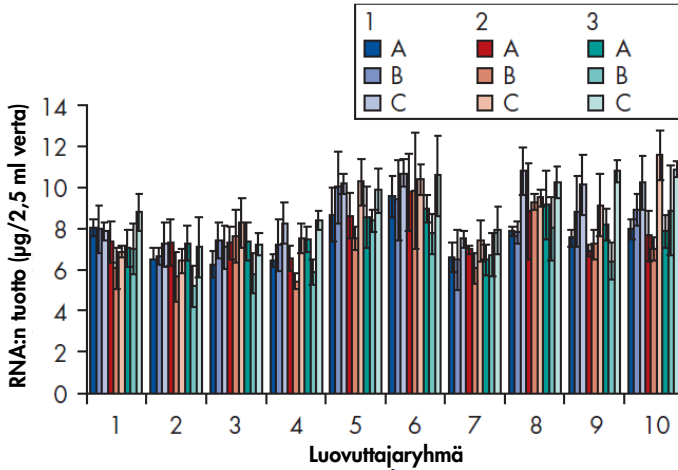
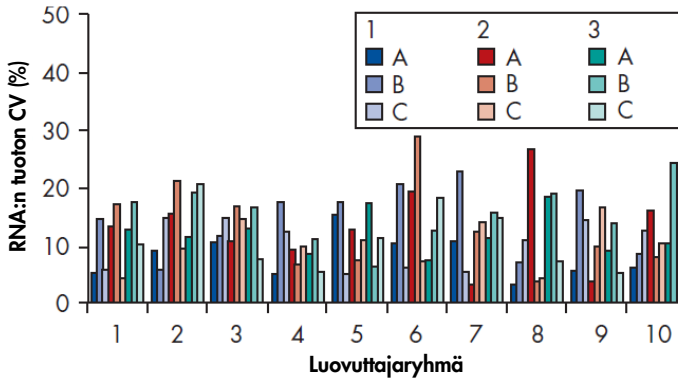
Käytettäessä manuaalista protokollaa näytteen valmistelu-aika (12 näytteen valmisteluajoista kerättyjen tietojen perusteella) on keskimäärin noin 90 minuuttia*, joista vain 40 minuuttia on ihmisen toimia edellyttävää aikaa. RNA:n tuotto 2,5 ml:sta tervettä ihmisen kokoverta on $\geq 3 \mu\text{g} \geq 95\%$:ssa käsitellyistä näytteistä. Koska tuotto on näytteen antajasta riippuvaista, yksilölliset tuotot voivat vaihdella. Yksittäisten näytteen antajien osalta PAXgene Blood RNA system -järjestelmä tuottaa erittäin uusittavia ja toistettavia tuottoja (kuvat 6 ja 7, sivuilla 23 ja 24) ja uusittavia ja toistettavia RT-PCR-tuloksia (kuvat 8 ja 9, sivuilla 28 ja 29), mikä tekee järjestelmästä luotettavan kliinisessä diagnostiikkakäytössä.

Kuva 6 (sivu 23) esittää PAXgene Blood RNA System -järjestelmän yleisen uusittavuuden ja toistettavuuden. Lisätutkimuksilla pyrittiin osoittamaan eri PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erien ja eri käyttäjien vaikutus RNA-tuoton toistettavuuteen ja reaaliaikaisen RT-PCR:n toimintaan. Koska näissä tutkimuksissa käytettiin yhdistettyjä verinäytteitä yksittäisten PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkien sijaan, tulokset eivät osoita järjestelmän toistettavuutta, kuten vaihtelua yksittäisten verinäytteen ottojen välillä, vaan ainoastaan näytteen valmistelun toistettavuuden (katso kuva 7, sivu 24).

* Protokollan kokonaisaika, mukaan lukien edeltävä PAXgene Blood RNA Tube -putkien käsittely (sentrifugointi, pelletin pesu ja pelletin uudelleensuspendointi).



Kuva 6. Uusittava ja toistettava RNA:n puhdistus. 14 verinäytteen antajan nelinkertaiset verinäytteet käsitelti manuaalisesti kolme (3) teknikkaa (A, B, C). Käytössä oli kolme laitesarjaa, ja kaikki saman teknikon valmistelemat näytteet käsiteltiin samalla laitteella. **[A]** RNA:n tuoton keskiarvot ja keskihajonnat näyttereplikaattia kohti esitetään samoilta luovuttajilta ja eri tekniikoilta. **[B]** Kolme (3) teknikkaa käsitelti 12 verinäyttereplikaattia kultakin 14 luovuttajalta. RNA:n tuoton keskiarvot ja keskihajonnat näytettä kohti esitetään samoilta luovuttajilta ja kaikilta tekniikoilta. Kaikkien RNA-näytteiden osalta A_{260}/A_{280} -suhteet olivat välillä 1,8–2,2.

A**B**

Kuva 7. RNA:n tuoton uusittavuus ja toistettavuus eri käyttäjien PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erien osalta käytettäessä yhdistettyjä verinäytteitä. 30 eri luovuttajan verinäytteet kerättiin PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkiin (12 putkea per luovuttaja, yhteensä 360 putkea). Kolmen luovuttajan putkien sisältö yhdistettiin ja sen jälkeen ne jaettiin 36 näytteeksi. Nämä 36 näytettä kolmen luovuttajan sarjasta käsiteltiin manuaalisesti kolmen (3) eri käyttäjän toimesta. Kukin käyttäjä käytti kolmea (3) eri PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erää eristämässä ja käsitteli nelinkertaiset näytteet kustakin 10 näyteryhmästä. **[A]** RNA:n tuotto ja keskihajonta jokaisen käyttäjä-erä-yhdistelmän osalta. Kolme (3) eri käyttäjää (A, B, C) käsittelivät nelinkertaiset verinäytteet 10 luovuttajaryhmältä kullakin kolmella sarjan erällä (1, 2, 3). Keskimääräiset tuotot (pylväät) ja keskihajonnat (virhepalkit) nelinkertaista näytettä kohti esitetään samasta luovuttajaryhmästä eri käyttäjiä ja sarjan eri erä kohti. **[B]** RNA:n tuoton CV luovuttajaryhmää kohti kaikkien käyttäjä-erä-yhdistelmien (A, B, C; 1, 2, 3) osalta laskettuna keskimääräisestä tuotosta ja tuoton keskihajonnasta on esitetty kuvassa 7A.

Taulukko 1A. Toistettavuus erän sisällä ja käyttäjäkohtaisesti valittujen luovuttajaryhmien osalta (1, 6, 9, 10)

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

Taulukko 1B. Käyttäjakohtainen ja kaikkien erien välinen toistettavuus valittujen luovuttajaryhmien osalta (1, 6, 9, 10).

Tietojen yhdistys	Luovuttajaryhmä 1 5,1 x 10 ⁶ solua/ml			Luovuttajaryhmä 6 6,5 x 10 ⁶ solua/ml		
	Keskimääräinen tuotto (µg)	SD (µg)	CV (%)	Keskimääräinen tuotto (µg)	SD (µg)	CV (%)
Käyttäjä A, kaikki erät	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Käyttäjä B, kaikki erät	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Käyttäjä C, kaikki erät	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Tietojen yhdistys	Luovuttajaryhmä 9 8,4 x 10 ⁶ solua/ml			Luovuttajaryhmä 10 10,2 x 10 ⁶ solua/ml		
	Keskimääräinen tuotto (µg)	SD (µg)	CV (%)	Keskimääräinen tuotto (µg)	SD (µg)	CV (%)
Käyttäjä A, kaikki erät	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Käyttäjä B, kaikki erät	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Käyttäjä C, kaikki erät	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

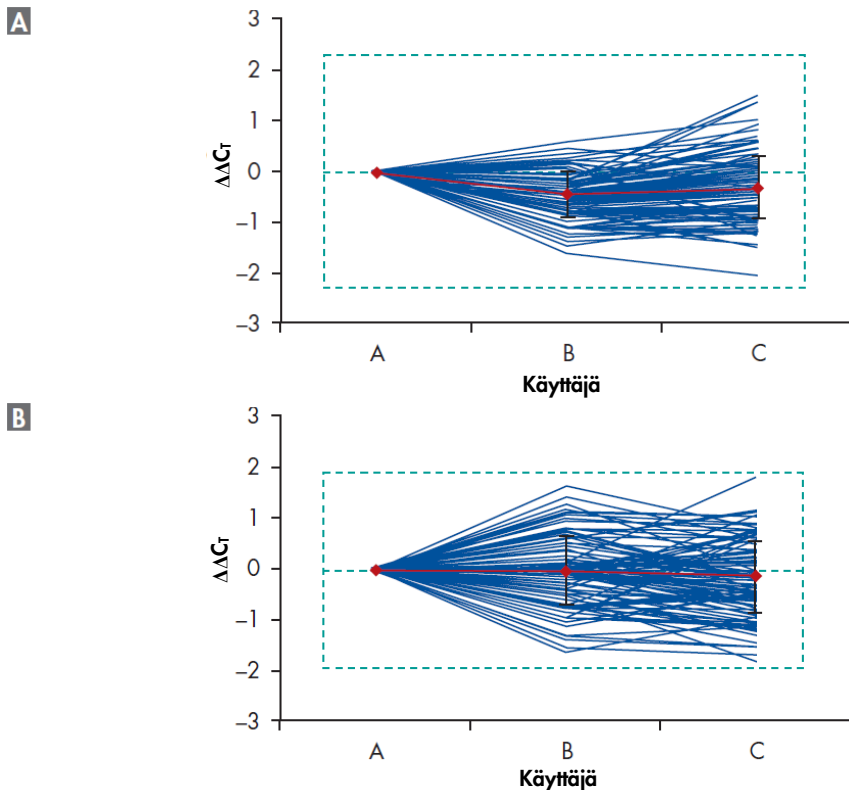
Taulukko 1C. Erän sisäinen ja kaikkien käyttäjien välinen toistettavuus valittujen luovuttajaryhmien osalta (1, 6, 9, 10).

Tietojen yhdistys	Luovuttajaryhmä 1 5,1 x 10 ⁶ solua/ml			Luovuttajaryhmä 6 6,5 x 10 ⁶ solua/ml		
	Keskimääräinen tuotto (µg)	SD (µg)	CV (%)	Keskimääräinen tuotto (µg)	SD (µg)	CV (%)
Erä 1, kaikki käyttäjät	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Erä 2, kaikki käyttäjät	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Erä 3, kaikki käyttäjät	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Tietojen yhdistys	Luovuttajaryhmä 9 8,4 x 10 ⁶ solua/ml			Luovuttajaryhmä 10 10,2 x 10 ⁶ solua/ml		
	Keskimääräinen tuotto (µg)	SD (µg)	CV (%)	Keskimääräinen tuotto (µg)	SD (µg)	CV (%)
Erä 1, kaikki käyttäjät	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Erä 2, kaikki käyttäjät	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Erä 3, kaikki käyttäjät	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

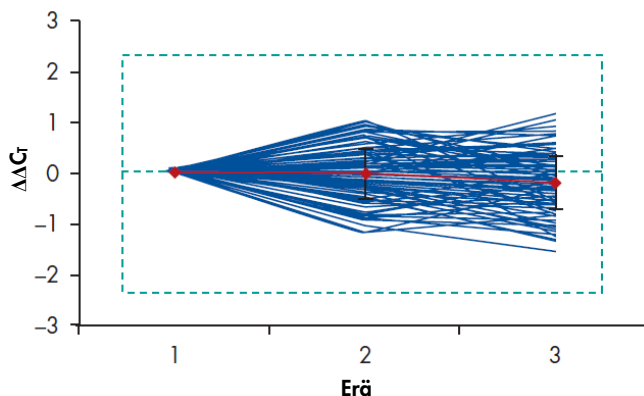
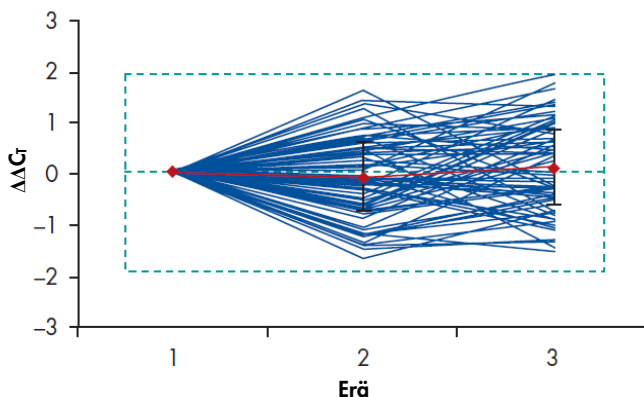
Taulukko 1D. Kaikkien erien ja kaikkien käyttäjien välinen toistettavuus valittujen luovuttajaryhmien osalta (1, 6, 9, 10).

Tietojen yhdistys	Luovuttajaryhmä 1 5,1 x 10 ⁶ solua/ml			Luovuttajaryhmä 6 6,5 x 10 ⁶ solua/ml		
	Keskimääräinen tuotto (µg)	SD (µg)	CV (%)	Keskimääräinen tuotto (µg)	SD (µg)	CV (%)
Erä 1, kaikki käyttäjät	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
Tietojen yhdistys	Luovuttajaryhmä 9 8,4 x 10 ⁶ solua/ml			Luovuttajaryhmä 10 10,2 x 10 ⁶ solua/ml		
	Keskimääräinen tuotto (µg)	SD (µg)	CV (%)	Keskimääräinen tuotto (µg)	SD (µg)	CV (%)
Erä 1, kaikki käyttäjät	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Tarkempi analyysi neljästä (4) edustavasta luovuttajaryhmästä. Ryhmät valittiin valkosolumäärän mukaan, ja ne heijastavat valkosolumäärän normaalin vaihteluvälin ylä-, keski- ja ala-arvoja ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukosyyttiä/ml). Valkosolumäärä edustaa kolmen (3) valkosolumäärän keskiarvoa kolmelta luovuttajalta per luovuttajaryhmä.



Kuva 8. RT-PCR:n toistettavuus – käyttäjien välillä. Kuvassa 7 kuvatussa kokeessa puhdistettua RNA:ta käytettiin reaaliaikaisessa RT-PCR:ssä. **[A]** FOS:n ja **[B]** IL1B:n suhteelliset transkriptitasot määritettiin reaaliaikaisella duplex-RT-PCR:llä käyttämällä 18S rRNA:ta sisäisenä standardina. Kaikkien näytteiden arvot on otettu mukaan kaavioon suhteessa käyttäjän 1 arvoihin (10 luovuttajaryhmää x 3 sarjan erää x 4 replikaattia = 120 tietojoukkoa kustakin geenistä), samoin kuin keskiarvot (punaiset viivat) ja keskihajonnat (mustat palkit) kaikista näytteistä. Katkoviivat osoittavat määrittelyn $\pm 3\times$ kokonaistarkkuuden (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

A**B**

Kuva 9. RT-PCR:n toistettavuus – sarjan erien välillä. Kuvassa 7 kuvatussa kokeessa puhdistettua RNA:ta käytettiin reaaliaikaisessa RT-PCR:ssä. **[A]** FOS:n ja **[B]** IL1B:n suhteelliset transkriptitasot määritettiin reaaliaikaisella duplex-RT-PCR:llä käyttämällä 18S rRNA:ta sisäisenä standardina. Kaikkien näytteiden arvot on otettu mukaan kaavioon suhteessa sarjan erän 1 arvoihin (10 luovuttajaryhmää x 3 käyttäjää x 4 replikaattia = 120 tietojoukkoa kustakin geenistä), samoin kuin keskiarvot (punaiset viivat) ja keskihajonnat (mustat palkit) kaikista näytteistä. Katkoviivat osoittavat määrittelyn $\pm 3\times$ kokonaistarkkuuden (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

Taulukko 2. Yhteenveto kuvien 8 ja 9 RT-PCR-tiedoista

Testijärjestelmä	FOS/18S rRNA -määritys		IL1B/18S rRNA -määritys	
	Keskiarvo ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Keskiarvo ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Käyttäjakohtainen ja kaikkien erien välinen toistettavuus				
Kaikki käyttäjät, erä 1 – erä 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Kaikki käyttäjät, erä 1 – erä 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Kaikki käyttäjät, erä 1 – erä 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Käyttäjakohtainen ja kaikkien erien välinen toistettavuus				
Kaikki erät, käyttäjä A – käyttäjä A	0,00	0,00	0,00	0,00
Kaikki erät, käyttäjä A – käyttäjä B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Kaikki erät, käyttäjä A – käyttäjä C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Käyttäjä: Teknikko, teki tutkimuksen.

Erä: Tässä tutkimuksessa käytetyn sarjan erän numero.

SD: Keskihajonta.

$\Delta\Delta C_T$ -keskiarvot (N = 120) ja keskihajonnat on esitetty kuvissa 8 ja 9 esitetyistä tiedoista.

Automaattinen RNA:n puhdistus

Näytteen valmistelu on automatisoitu QIAcube®-laitteella (tuotenro 9001882 [110 V], tuotenro 9001293 [230 V]; ei sisällä QIAcube Connect -vaihtoehtoa) ja se noudattaa samoja vaiheita kuin manuaalinen käytäntö, joten PAXgene Blood RNA Kit -sarjan käyttöä korkealaatuisen RNA:n puhdistamiseen voidaan jatkaa. Katso *QIAcube User Manual - käyttöoppaasta* ja osoitteesta www.qiagen.com/MyQIAcube lisätietoa QIAcube-tuotteesta.

Automaattinen RNA:n puhdistusprotokolla sisältää kaksi osaa (tai protokollaa): PAXgene Blood RNA Part A -osan ja PAXgene Blood RNA Part B -osan, ja näiden kahden osan välissä on lyhyt manuaalinen toimenpide (katso kuva 10, sivu 31).

mikrosentrifugiputket (MCT) QIAcube-laitteen lämpöravistinyksikköön. Käyttäjä valitsee ja käynnistää PAXgene Blood RNA Part B -protokollan valikosta, ja QIAcube tekee lämpödenaturoinnin.

Keskimääräinen näytteen valmistelu-aika (12 näytteen valmisteluajon tietojen perusteella) on 151 minuuttia*, mihin sisältyy merkittävästi vähemmän ihmiseltä edellytettäviä toimia kuin manuaalisessa protokollassa.

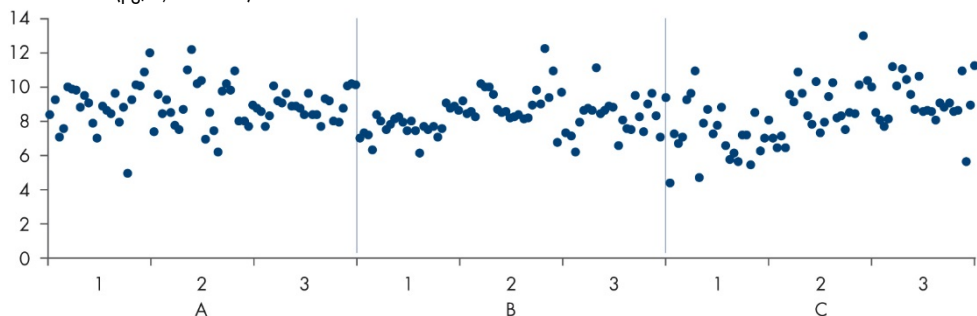
RNA:n tuotto 2,5 ml:sta tervettä ihmisen kokoverta on $\geq 3 \mu\text{g}$ $\geq 95\%$:ssa käsitellyistä näytteistä. Kuvassa 11 (sivu 33) on esitetty RNA:n tuotot yhteensä 216 näytteestä, jotka on valmistettu automaattisesti käyttämällä kolmea (3) sarjan erää ja kolmea (3) käyttäjää. Koska näissä tutkimuksissa käytettiin yhdistettyjä verinäytteitä eikä yksittäisiä PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkia, tulokset eivät heijasta yksittäisten verinäytteiden osalta odotettua RNA-tuottoa. Koska tuotto on näytteen antajasta riippuvaista, yksilölliset tuotot voivat vaihdella (kuva 11, sivu 33).

Vähintään 95 %:ssa näytteistä ei näy inhibitiota RT-PCR:ssä, kun käytetään enintään 30 % eluaattista. Käytettäessä automaattista protokollaa, näytteiden välistä ristikontaminaatiota ei havaita mitattuna ABL1- ja FOS-transkriptisekvenssien kvantitatiivisella reaaliaikaisella RT-PCR:llä RNA-negatiivisista näytteistä (vesi), jotka on paritettu RNA-positiivisten näytteiden (ihmisen kokoveri) kanssa samassa ajossa.

PAXgene Blood RNA System -järjestelmällä ja automaattisella protokollalla puhdistettu RNA on puhdasta, minkä osoittavat RT-PCR:n inhibition puute (katso kuva 11, sivu 33) ja A_{260}/A_{280} -arvot välillä 1,8–2,2. Genomista DNA:ta on läsnä $\leq 1\%$ (w/w) $\geq 95\%$:ssa kaikista näytteistä mitattuna beeta-aktiinigeenisekvenssin kvantitatiivisella reaaliaikaisella PCR:llä. Kuvissa 12 ja 13 (sivuilla 33 ja 34) on esitetty A_{260}/A_{280} -arvot ja suhteellinen genomisen DNA yhteensä 216 näytteestä, jotka valmistettiin automaattisella protokollalla käyttämällä kolmea (3) sarjan erää ja kolmea käyttäjää.

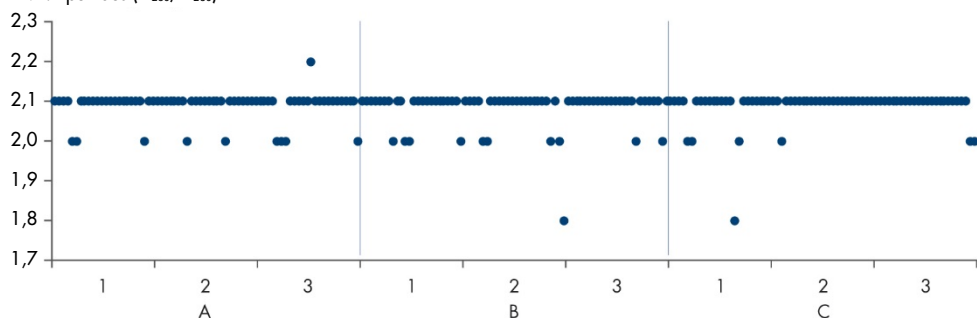
* Protokollan kokonaisaika, mukaan lukien edeltävä PAXgene Blood RNA Tube -putkien käsittely (sentrifugointi, pelletin pesu ja pelletin uudelleensuspentointi).

RNA:n tuotto (µg/2,5 ml verta)



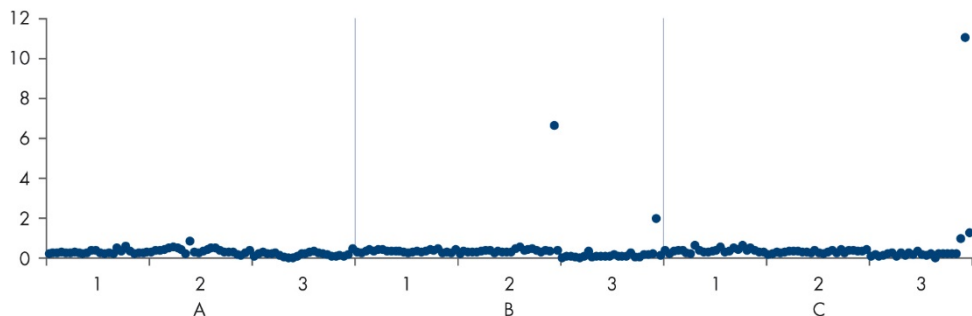
Kuva 11. RNA:n tuotto – automaattinen käsittely. 36 eri luovuttajan verinäytteet kerättiin PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkiin (6 putkea per luovuttaja, yhteensä 216 putkea). Kuuden (6) luovuttajan putkien sisältö yhdistettiin ja sen jälkeen ne jaettiin 36 näytteeksi. Nämä 36 näytettä kuuden luovuttajan sarjasta käsiteltiin manuaalisesti kolmen (3) eri käyttäjän (A, B, C) toimesta. Kukin käyttäjä käytti kolmea (3) eri PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erää (1, 2, 3) automaattisessa eristämässä ja käsiteli nelinkertaiset näytteet kustakin 6 näyteryhmästä. Kaikkien yksittäisten näytteiden RNA:n tuotot on esitetty jokaisen käyttäjä-erä-yhdistelmän osalta.

RNA:n puhtaus (A_{260}/A_{280})



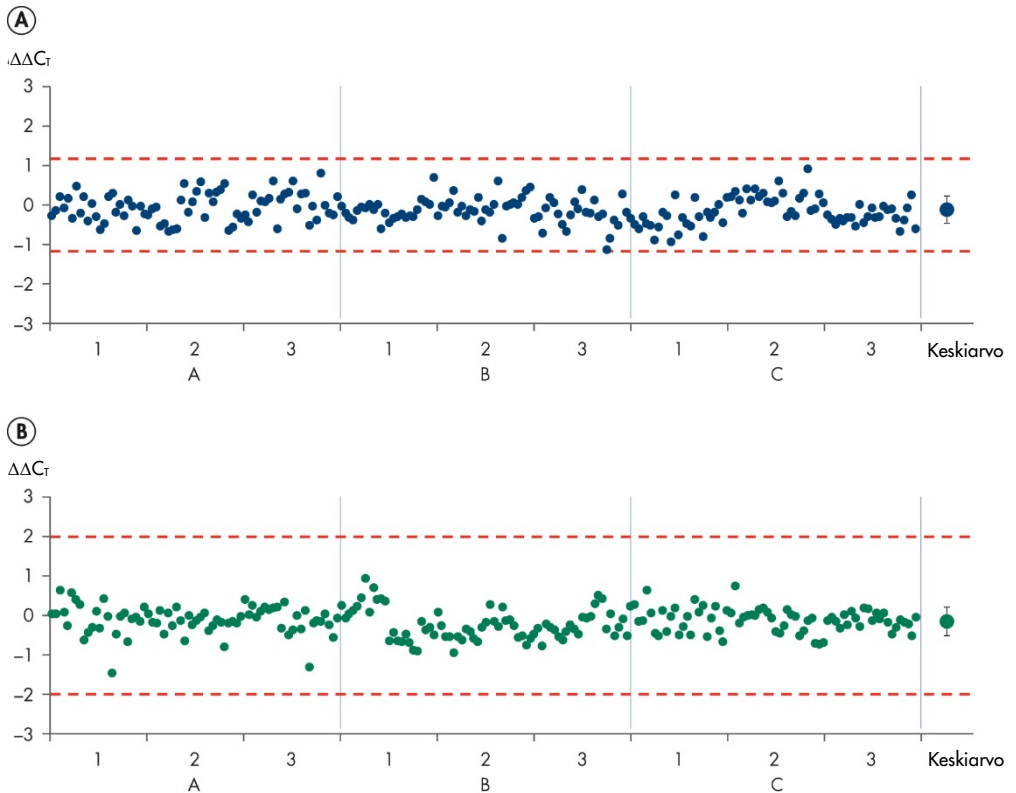
Kuva 12. RNA:n puhtaus (A_{260}/A_{280} -arvot) – automaattinen käsittely. Kuvassa 11 kuvatussa kokeessa kolme (3) eri käyttäjää (A, B, C) puhdisti RNA:n käyttämällä kolmea eri PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erää (1, 2, 3). Kaikkien yksittäisten näytteiden A_{260}/A_{280} -arvot on esitetty jokaisen käyttäjä-erä-yhdistelmän osalta.

Genominen DNA (w/w) (%)



Kuva 13. RNA:n puhtaus (% genomisen DNA:n kontaminaatio) – automaattinen käsittely. Kuvassa 11 kuvatussa kokeessa kolme (3) eri käyttäjää (A, B, C) puhdisti RNA:n käyttämällä kolmea eri PAXgene Blood RNA Kit -sarjan erää (1, 2, 3). Kaikkien yksittäisten näytteiden genomisen DNA:n määrä (w/w) on esitetty jokaisen käyttäjä-erä-yhdistelmän osalta.

RNA:n puhdistuksen automaattinen protokolla PAXgene Blood RNA System -järjestelmällä tuottaa erittäin uusittavia ja toistettavia RT-PCR-tuloksia, kuten kuvassa 14 (sivu 35) on esitetty, mikä tekee siitä erittäin hyvän kliiniseen diagnostiikkaan.



Kuva 14. RT-PCR:n toistettavuus automaattisen ja manuaalisen käytännön välillä. Kuvassa 11 kuvatussa kokeessa kolme (3) eri käyttäjää (A, B, C) puhdisti RNA:n käyttämällä kolmea eri PAXgene Blood RNA Kit-sarjan erää (1, 2, 3) ja automaattista protokollaa. Samanaikaisesti RNA puhdistettiin vastaavista replikaattiputkista manuaalisella protokollalla. **[A]** FOS:n ja **[B]** IL1B:n suhteelliset transkriptitasot määritettiin reaaliaikaisella duplex-RT-PCR:llä käyttämällä 18S rRNA:ta sisäisenä standardina. Paritetuista verinäytteistä kummallakin eristysprotokollalla (automaattisella ja manuaalisella) valmistellun RNA:n mahdollisia transkriptitasojen eroja laskettiin $\Delta\Delta C_T$ -menetelmällä. Kaikkien näyteparien (4 replikaattia x 6 luovuttajaryhmää x 3 sarjan erää x 3 käyttäjää = 216 paria jokaisen geenin osalta) yksittäiset $\Delta\Delta C_T$ -arvot on esitetty yksittäisinä pisteinä yhdessä keskiarvojen (suuremmat pisteet) ja keskihajontojen (mustat palkit) kanssa kaikista näytetyistä näytteistä. Katkoviivat osoittavat määrittelyn $\pm 3x$ kokonaistarkkuuden (FOS: 1,16 C_T ; IL1B: 1,98 C_T ; eri määrittystarkkuus verrattuna kuviin 1–4, 8 ja 9 eri määrittäversioiden takia).

Käyttäjän tarvitsemat varusteet ja reagenssit

Kun käsittelet kemikaaleja, käytä aina asianmukaista suojavaatetusta, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista, jotka ovat saatavana tuotteen toimittajalta.

Kaikkiin protokoliin

- PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putket (tuotenro 762165)
- Etanoli (96–100 %, puhtausaste p.a.)
- Pipetit* (10 µl – 4 ml)
- Steriilit, aerosoliesteen sisältävät RNAasittomat pipettikärjet†
- Asteikollinen mittalasi‡
- Sentrifugi*, joka saavuttaa nopeuden 3000–5000 x g ja jossa on ulos kääntyvä roottori ja kotelot PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkille
- Vortex-sekoitin*
- Jäämurskaa
- Permanent-kynä etikettejä varten

Manuaaliseen protokollaan

- Vaihtelevanopeuksinen mikrosentrifugi*, joka saavuttaa vähintään nopeuden 1000–8000 x g, vaikka pienemmät ja suuremmat g-voimat ovat sovellettavia (katso käytännön vaiheista lisätietoja), ja jossa on roottori 2 ml:n mikrosentrifugiputkille

* Varmista, että laitteet on tarkastettu, huollettu ja kalibroitu säännöllisesti valmistajan suositusten mukaan.

† Varmista, että olet tutustunut RNA:n käsittelyohjeisiin (liite A, sivu 72).

‡ Etanolin lisäämiseen BR4-puskuritiivisteeseen.

- Ravistininkubaattori, * joka voi inkuboida lämpötilassa 55–65 °C ja ravistaa nopeudella ≥ 400 r/min, mutta ei yli 1400 r/min (esim. Eppendorf® Thermomixer Compact tai vastaava)

Automaattiseen protokollaan

- QIAcube* (QIAGEN, tuotenro 9001882 [110 V], tuotenro 9001293 [230 V])
- Sakset

QIAcube-tarvikkeita

- Filter-Tips, 1000 μ l (1024) (QIAGEN, tuotenro 990352)[†]
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, tuotenro 990393)[†]
- Rotor Adapters (10 x 24) (QIAGEN, tuotenro 990394)[†]

QIAcube-laitteen lisävarusteet

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

* Varmista, että laitteet on tarkastettu, huollettu ja kalibroitu säännöllisesti valmistajan suositusten mukaan.

[†] Sisältyvät myös pakkaukseen Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, tuotenro 990395)

Tärkeitä ilmoituksia

QIAcube-laitteen käyttäminen

Varmista, että tiedät, miten QIAcube-laitetta käytetään. Lue *QIAcube-käyttöopas* ja QIAcube-laitteen mukana tulleet lisätiedot ja kiinnitä erityistä huomiota turvallisuustietoihin, ennen kuin aloitat automaattisen PAXgene Blood RNA -protokollan.

QIAcube-laitteen käynnistäminen

Sulje QIAcube-laitteen ovi ja kytke laitteeseen virta virtakytkimestä (katso kuva 1.5, sivu 39).

Äänimerkki kuuluu ja käynnistysnäyttö tulee näkyviin. Laite tekee käynnistykseen liittyvät testit automaattisesti.

Protokollien asentaminen QIAcube-laitteeseen

Protokollan alkuasennus on tarpeen, ennen kuin ensimmäinen RNA:n valmisteluajo voidaan tehdä QIAcube-laitteella. Asenna sekä PAXgene Blood RNA Part A- että PAXgene Blood RNA Part B -protokollat.

Protokollat ovat saatavilla osoitteessa **www.qiagen.com/MyQIAcube**, ja ne on ladattava QIAcube-laitteen mukana toimitetulle USB-muistitikulle ja siirrettävä QIAcube-laitteeseen USB-portin kautta.

Suojapaneelin takana oleva USB-portti (katso kuva 1.5, sivu 39) mahdollistaa USB-muistitikun liittämisen QIAcube-laitteeseen (USB-muistitikku tulee QIAcube-laitteen mukana). Datatiedostot, kuten lokitiedostot tai raporttitiedostot, voidaan myös siirtää USB-portin kautta QIAcube-laitteesta USB-muistitikulle.



USB-portti on tarkoitettu käytettäväksi vain QIAGENin toimittaman USB-muistitikun kanssa. Älä liitä muita laitteita tähän porttiin.



Älä irrota USB-muistitikua, kun lataat protokollia tai siirrät datatiedostoja tai kun protokolla-ajo on kesken.



Kuva 15. QIAcube edestä.



Kosketusnäyttö



Luukku



RS232-sarjaportti suojapaneelin takana (vain QIAGEN-laitteiden huoltoasiantuntijoiden käyttöön)



USB-portti suojapaneelin takana



Virtakytkin



Waste (Jäte) -lokero

QIAcube-laitteen täyttäminen

Ajan säästämiseksi täyttäminen voidaan tehdä yhden tai molempien 10 minuutin sentrifugointivaiheen (vaiheet 3 ja 5) aikana. Katso Protokolla: Automaattinen kokonais-RNA:n puhdistus ihmisen kokoverestä, joka on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkiin, sivu 56.

Reagenssipullot

Ennen jokaista QIAcube-ajoa laitteen neljä (4) reagenssipulloa on täytettävä huolellisesti taulukossa 3 luetelluilla reagensseilla osoitettuun enimmäistasoon asti, tai jos se ei ole mahdollista, PAXgene Blood RNA Kit -sarjan puskurimäärien sallimaan tasoon. Merkitse pulloihin ja korkkeihin selkeästi puskurien nimet ja aseta täytetyt reagenssipullot reagenssipullotelineen asianmukaisiin paikkoihin. Aseta teline QIAcube-työpöydälle kuvan mukaisesti (kuvat 16 ja 17, sivut 41 ja 42).



Buffer BR2 -puskurin toimitettu määrä ei täytä reagenssipulloa osoitettuun tasoon asti. Buffer BR3- ja Buffer BR4 -puskurit eivät ehkä täytä pulloa osoitettuun tasoon asti, kun useita näytteitä on käsitelty edellisissä ajoissa.



Muista poistaa pullojen korkit, ennen kuin asetat ne työpöydälle.

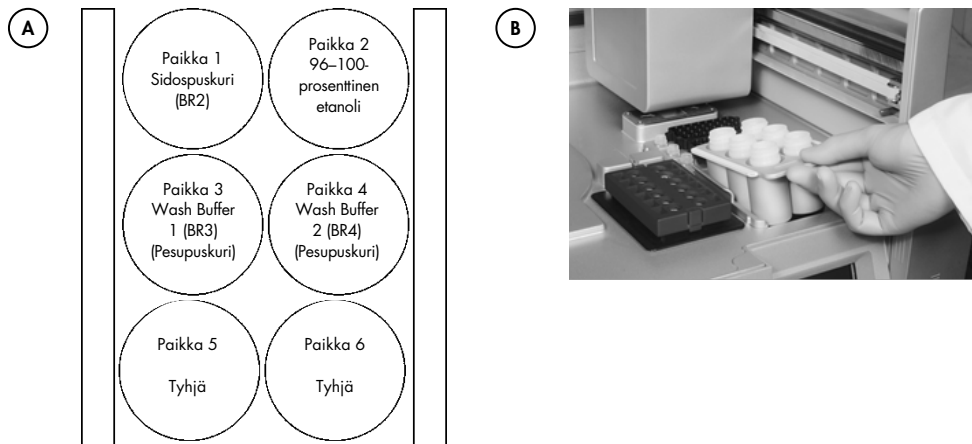


PAXgene Blood RNA Kit -sarjan mukana tulevat puskurimäärät (50) riittävät enintään seitsemään (7) RNA-valmisteluajoon QIAcube-laitteessa, jolloin näytteen numerot ovat 2–12 per ajo. Yleisesti ottaen ajoja, joissa on pienemmät näytteen numerot, on vältettävä, jotta voidaan käsitellä yhteensä 50 näytettä per sarja ja tehdä enintään 7 RNA-valmisteluajoa. Jos RNA-valmisteluajoja tehdään enemmän kuin 7, puskurimäärä ei ehkä riitä viimeisten näytteiden käsittelyyn.

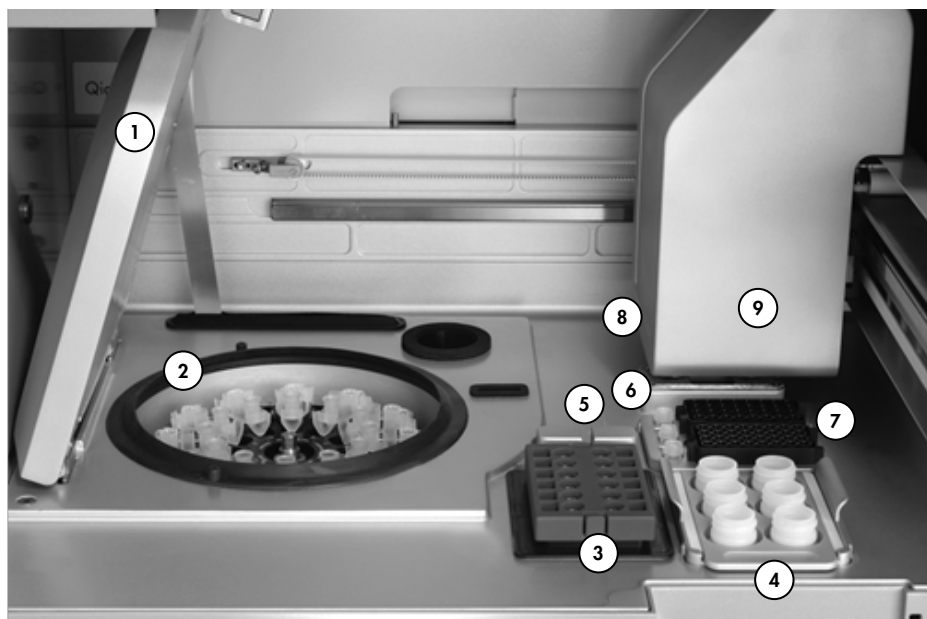
Taulukko 3. Sijainnit reagenssipullotelineessä

Paikka	Reagenssi
1	Sidospuskuri (BR2)
2	96–100-prosenttinen etanoli
3	Wash Buffer 1 (BR3) (Pesupuskuri 1 [BR3])
4	Wash Buffer 2 (BR4)* (Pesupuskuri 2 [BR4]*)
5	– (jätä tyhjäksi)
6	– (jätä tyhjäksi)

* Wash Buffer 2 (BR4) -pesupuskuri toimitetaan konsentraattina. Lisää ennen ensimmäistä käyttökertaa 4 tilavuutta etanolia (96–100 %, puhtausluokka p.a.) pullon merkintöjen mukaan työskentelyliuosta varten.



Kuva 16. Reagenssipullotelineen asettaminen. [A] Kaaviokuva pullojen sijainneista ja sisällöistä reagenssipullotelineessä. **[B]** Telineen asettaminen QIAcube-laitteeseen.



Kuva 17. QIAcube-laite sisältä.

- | | |
|------------------------|-------------------------------------|
| ① Sentrifugin kansi | ⑥ Mikrosentrifugiputkien aukot |
| ② Sentrifugi | ⑦ Kärkitelineet |
| ③ Ravistin | ⑧ Hävitysaukot kärjille ja putkille |
| ④ Reagenssipulloteline | ⑨ Robottivarsi |
| ⑤ Kärkianturi | |

Spin columns (PRC, PSC) -putket, mikrosentrifugiputket (MCT) ja QIAcube-muovitarvikkeet

Aseta kaksi (2) kärkitelinettä, joissa on 1000 µl:n suodatinkärkiä, QIAcube-laitteeseen (katso kuva 17, sivu 42). Täytä telineisiin kärjet tarvittaessa.



Käytä vain 1000 µl:n suodatinkärkiä, jotka on tarkoitettu käytettäväksi QIAcube-laitteen kanssa.

Merkitse kaikkien näytteiden roottoriadapterit ja mikrosentrifugiputket (MCT) permanent-kynällä. Avaa käytettävät PAXgene Shredder spin columns (PSC) -putket ja leikkaa niiden korkit kokonaan pois saksilla (katso kuva 18, sivu 44).



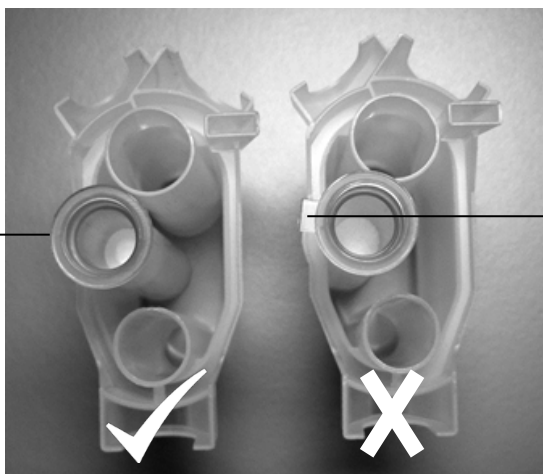
Jotta QIAcube-robottitartuntalaite toimii oikein, poista kokonaan (leikkaa) korkit ja kaikki muoviosat, jotka liittyvät korkin PAXgene Shredder spin columns (PSC) -putkiin (katso kuva 16). Muuten robottitartuntalaite ei pysty tarttumaan putkiin (PSC, PRC) kunnolla.

Aseta PAXgene RNA spin column (PRC) -putki, PAXgene Shredder spin column (PSC) -putki (ilman korkkia) ja merkitty mikrosentrifugiputki (MCT) asianmukaisiin paikkoihin kuhunkin merkittyyn roottorin adapteriin taulukon 3 ja kuvan 19 (sivu 44) mukaisesti.



Varmista, että spin column (PRC) -putken ja mikrosentrifugiputken (MCT) korkit on painettu kokonaan aukkojen pohjalle roottoriadapterin reunalla, koska muutoin korkit irtoavat sentrifugoinnin aikana.

Putken
korkki
poistettu
oikein



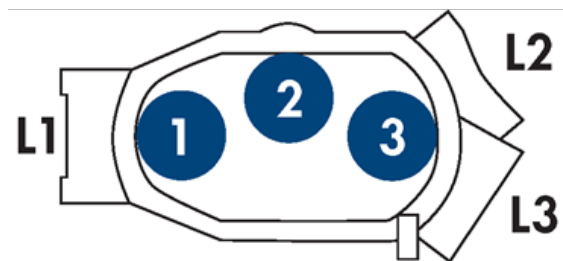
Putken
korkki
poistettu
väärin; osa
korkista on
vielä kiinni

Kuva 18. PAXgene Shredder spin column (PSC) -putken asettaminen PAXgene Shredder spin column (PSC) -putki asetetaan roottoriadapterin keskipaikkaan. Leikkaa korkki pois ennen putken (PSC) asettamista.

Taulukko 4. Laboratoriotarvikkeet roottoriadapterissa

Sijainti	Reagenssi	Korkin paikka
1	PAXgene RNA Spin Column -putki (punainen, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder spin column -putki (violetti, PSC) (leikkaa korkki pois ennen roottoriadapteriin asettamista)	–
3	Mikrosentrifugiputki (MCT)*	L3

* Käytä PAXgene Blood RNA Kit -sarjan sisältämiä mikrosentrifugiputkia (1,5 ml).



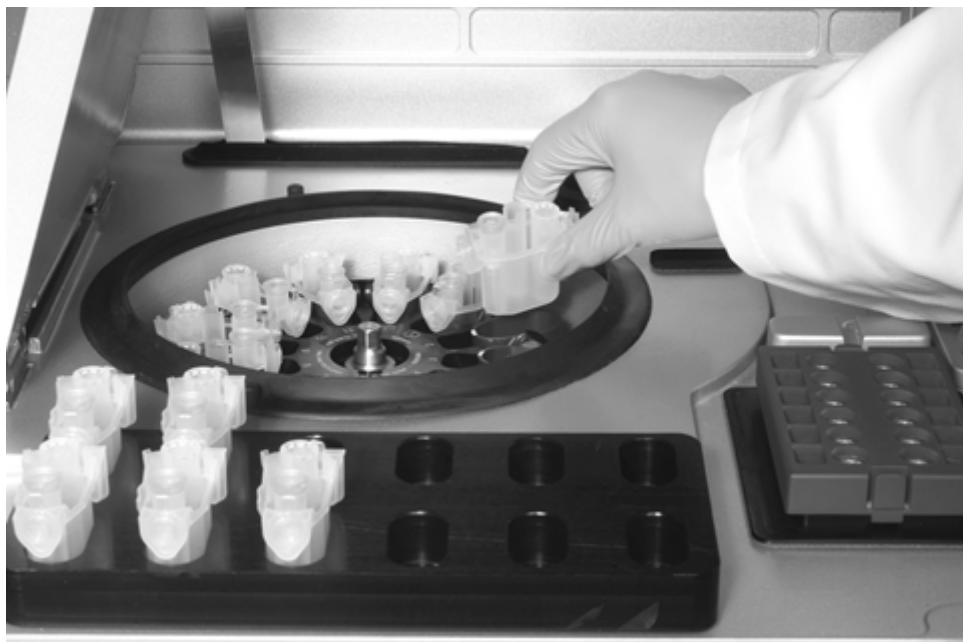
Kuva 19. Paikat roottoriadapterissa. Roottoriadapterissa on kolme putken paikkaa (1–3) ja kolme korkin paikkaa (L1–L3).

Sentrifugin täyttäminen

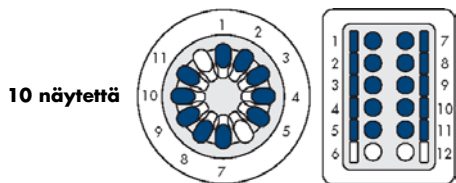
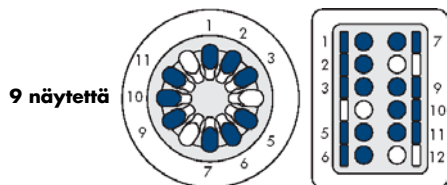
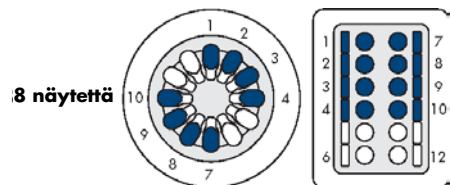
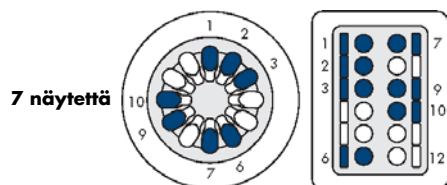
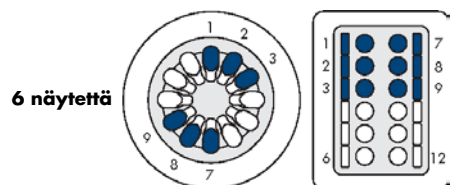
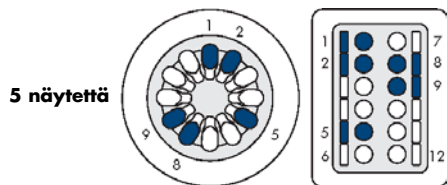
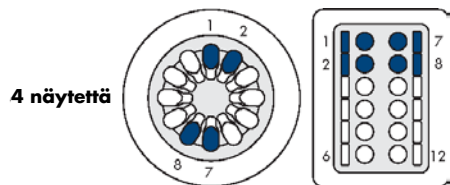
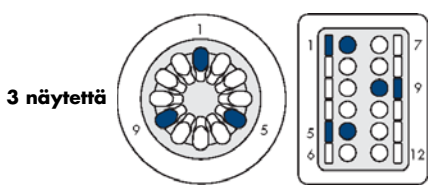
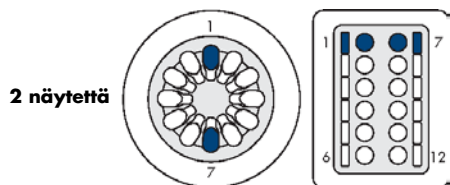
Aseta kootut roottoriadapterit sentrifugin koteloihin kuvan 20 mukaisesti.



Jos käsittelet alle 12 näytettä, lataa sentrifugin roottori säteittäissuunnassa tasapainoisesti (katso kuva 21, sivu 46). Kaikki sentrifugin kotelot on asennettava ennen protokolla-ajon aloittamista, vaikka näytteitä käsiteltäisiin alle 12. Yksittäistä (yhtä) näytettä tai 11 näytettä ei voi käsitellä.



Kuva 20. Sentrifugin täyttäminen. Aseta kootut roottoriadapterit sentrifugin koteloihin.



Kuva 21. Sentrifugin ja ravistimen täyttäminen. Sentrifugin ja ravistimen paikat 2–10 näytteen käsittelyssä. Yhtä tai 11 näytettä ei voi käsitellä.

Käsittelyputket) (PT)

Poista mikrosentrifugiputkien aukkoihin aiemmista ajoista jääneet käsittelyputket (PT) (katso kuva 17, sivu 42). Täytä kolme (3) käsittelyputkea (PT) taulukossa 5 ilmoitetulla reagenssimäärällä ajon sisältämän näytemäärän mukaan.

DNaasi I -inkubaatioseosta varten pipetoi ilmoitettu määrä DNA:n hajottamiskurkia (RDD) käsittelyputkeen (PT) ja lisää ilmoitettu määrä DNaasi I (RNFD) -varastoliuosta. Sekoita pipetoimalla varovasti koko seosta ylös ja alas kolme (3) kertaa käyttämällä 1000 µl:n pipettikärkeä.

Käytä PAXgene Blood RNA Kit -sarjan sisältämiä 2 ml:n käsittelyputkia (PT). Merkitse putkiin (PT) selvästi reagenssien nimet ja aseta ne asianmukaisiin paikkoihin mikrosentrifugiputkien aukkoihin taulukon 6 (sivu 48) mukaisesti.



DNaasi I (RNFD) on erittäin herkkä fyysiselle denaturoitumiselle. Sekoita vain pipetoimalla käyttämällä suurireikäisiä pipettikärkiä siirroksen vähentämiseksi. Älä vorteksoi.



Pipetoi vain tarvittava määrä taulukon 5 mukaisesti.

Taulukko 5. Käsittelyputkiin tarvittava reagenssien määrä mikrosentrifugiputkien aukoissa

Näytteiden määrä	Ilmoitetulle näytemäärälle tarvittava reagenssin määrä (µl)		
	Proteinaasi K (PK)	DNaasi I -inkubaatioseos	Eluutiopuskuri (BR5)
2	126	187 (23 DNaasi I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNaasi I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNaasi I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNaasi I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNaasi I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNaasi I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNaasi I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNaasi I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNaasi I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNaasi I + 806 Buffer RDD)	1177

Taulukko 6. Mikrosentrifugiputkien aukot

	Sijainti		
	A	B	C
Sisältö	Proteinaasi K (PK)	DNaasi I -inkubaatioseos	Eluutiopuskuri (BR5)
Astia	Käsittelyputki (PT)*	Käsittelyputki (PT)*	Käsittelyputki (PT)*

* Käytä PAXgene Blood RNA Kit -sarjan sisältämiä 2 ml:n käsittelyputkia (PT).

Protokolla: Manuaalinen kokonais-RNA:n puhdistus ihmisen kokoverestä, joka on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkiin

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Varmista, että pakkauksen laatikko on ehjä ja vahingoittumaton ja että puskurit eivät ole vuotaneet. Älä käytä sarjaa, joka on vahingoittunut.
- Kun käytät pipettiä, varmista, että se on asetettu oikeaan määrään ja että neste aspiroidaan ja tiputetaan varovasti ja kokonaisuudessaan.
- Jotta näytteitä ei siirretä väärään putkeen tai spin column -putkeen, on varmistettava, että kaikki putket ja spin column -putket on merkitty asianmukaisesti permanent-kynällä. Merkitse kunkin putken korkki ja runko (PT, MCT). Merkitse spin column -putken käsittelyputken (PT) runko. Sulje jokainen putki tai spin column -putki sen jälkeen, kun siihen on siirretty nestettä.
- Näytteiden ja puskurien läikkyminen toimenpiteen aikana voi vähentää RNA:n tuottoa ja puhtautta.
- Ellei muutoin ilmoiteta, kaikki tämän protokollan vaiheet, mukaan lukien sentrifugointivaiheet, on suoritettava huoneenlämmössä (15–25 °C).

Nukleiinihappojen monistustekniikoiden herkkyyden takia seuraavia varotoimia tarvitaan käsiteltäessä näytteitä ristikontaminaation välttämiseksi.

- Pipetoi näyte varovasti spin column -putkeen (PRC, PSC) reunaan kastelematta.
- Vaihda pipetin kärki aina liuoksen siirtojen välillä. Käytä aerosolinesstopipettikärkiä.
- Älä kosketa spin column -putken (PRC, PSC) kalvoa pipetin kärjellä.

- Kun olet vorteksoinut tai lämmittänyt mikrosentrifugiputkea (MCT), sentrifugoi sitä lyhyesti, jotta korkin sisäpuolella olevat pisarat lähtevät pois.
- Käytä käsineitä koko toimenpiteen ajan. Jos käsineet ja näyte joutuvat kosketuksiin toistensa kanssa, vaihda käsineet välittömästi.
- Sulje spin column -putki (PRC, PSC), ennen kuin asetat sen mikrosentrifugiin. Sentrifugoi toimenpiteen kuvauksen mukaisesti.
- Avaa vain yksi spin column -putki (PRC, PSC) kerrallaan ja varo huolellisesti tuottamasta aerosoleja.
- Jotta useita näytteitä voidaan käsitellä yhtä aikaa tehokkaasti, täytä teline käsittelyputkilla, joihin spin column -putket (PRC, PSC) voidaan siirtää sentrifugikäsittelyn jälkeen. Hävitä käytetyt käsittelyputket (PT), joissa on läpivirtausnestettä, ja aseta uudet käsittelyputket (PT) sisältävät spin column -putket (PRC, PSC) suoraan mikrosentrifugiin.

Ennen kuin aloitat

- Verinäyte on otettava PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen *PAXgene Blood RNA Tube -putken käsikirjan* ohjeiden mukaisesti. Katso tarvittaessa liitteestä C (sivu 69) suosituksia PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkien käsittelemisestä.
- Varmista, että PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkia inkuboidaan vähintään 2 tuntia huoneenlämmössä verinäytteen ottamisen jälkeen, jotta verisolut lysoituvat täydellisesti. PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putken inkubointi yön yli voi suurentaa tuottoa. Jos PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkea säilytettiin lämpötilassa 2–8 °C, –20 °C tai –70 °C verinäytteen oton jälkeen, tasapainota se ensin huoneenlämpöön ja säilytä sitä sitten huoneenlämmössä kaksi (2) tuntia ennen toimenpiteen aloittamista.
- Lue turvallisuustiedot sivulta 10.
- Lue RNA:n käsittelyohjeet (liite A, sivu 66).
- Varmista, että välineet, kuten pipetit ja ravistininkubaattori, on tarkastettu ja kalibroitu säännöllisesti valmistajan ohjeiden mukaan.
- Ravistininkubaattori tarvitaan vaiheissa 5 ja 20. Aseta ravistininkubaattorin lämpötilaksi 55 °C.

- Sidospuskuriin (BR2) voi muodostua saostuma säilytyksen aikana. Lämmitä puskuria tarvittaessa 37 °C:seen, jotta se liukenee.
- Wash Buffer 2 (BR4) -pesupuskuri toimitetaan konsentraattina. Lisää ennen ensimmäistä käyttökertaa 4 tilavuutta etanolia (96–100 %, puhtausluokka p.a.) pullon merkintöjen mukaan työskentelyliuosta varten.
- Jos käytät RNase-Free DNase Set -sarjaa ensimmäistä kertaa, valmista DNAasi I -varastoliuos. Liuota kiinteä DNAasi I (RNFD; 1500 Kunitz-yksikköä) * 550 µl:aan DNAasi-resuspensiopuskuria (DRB), joka sisältyy sarjaan. Varmista, että DNAasi I:ä (RNFD) ei häviä, kun avaat pullon. Älä vorteksoi käyttövalmiiksi saatettua DNAasi I (RNFD) -liuosta. DNAasi I on erittäin herkkä fyysiselle denaturoitumiselle. Sekoittaminen on tehtävä vain kääntelemällä putkea varovasti ylösalaisin.
- Nykyiset tiedot osoittavat, että käyttövalmiiksi saatettua DNAasi I (RNFD) -liuosta voidaan säilyttää 2–8 °C:ssa enintään 6 viikkoa. DNAasi I (RNFD) -liuoksen pitkäkestoista varastointia varten varastoliuos on poistettava lasipullosta, jaettava yhden käyttökerran alikvootteihin (käytä sarjan mukana tulevia 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkia [MCT], ne riittävät viiteen alikvoottiin) ja asetettava –20 °C:seen enintään 9 kuukaudeksi. Sulatettuja alikvootteja voi säilyttää 2–8 °C:n lämpötilassa enintään 6 viikkoa. Alikvootteja ei saa pakastaa uudelleen sulattamisen jälkeen.
- DNAasi I (RNFD) -liuoksen käyttövalmiiksi saattamisessa ja alikvootteihin jakamisessa on varmistettava, että noudatetaan RNA:n käsittelyohjeita (liite A, sivu 66).

* Kunitz-yksiköt ovat yleisesti käytettyjä yksiköitä DNAasi I:n mittaamiseen. Yksikön määritelmä on se DNAasi I:n määrä, joka aiheuttaa A_{260} :n nousun 0,001/minuutti/millilitra 25 °C:ssa, pH:ssa 5,0, käytettäessä erittäin polymeroitunutta DNA:ta substraattina (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 ja 363).

Menetelmä

1. Sentrifugoi PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkea 10 minuuttia nopeudella 3000–5000 x g laitteella, jossa on ulos heilahtava roottori.



Varmista, että verinäytettä on inkuboitu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkessa vähintään 2 tuntia huoneenlämmössä (15–25 °C), jotta verisolut lysoituvat täydellisesti.



Roottorin täytyy sisältää putkiadapterit pyöreäpohjaisille putkille. Jos muuntyyppisiä putkiadaptoreita käytetään, putket voivat hajota sentrifugoinnin aikana.

2. Poista supernatantti dekantoinnalla tai pipetoimalla. Lisää 4 ml RNAasitonta vettä (RNFV) pellettiin ja sulje putki uudella toissijaisella BD Hemogard -sulkimella (sisältyy sarjaan). Jos supernatantti dekantoidaan, älä koske pellettiin ja kuivaa putken reuna puhtaalla paperipyyhkeellä.

3. Vorteksoi, kunnes pelletti liikenee näkyvästi, ja sentrifugoi 10 minuuttia nopeudella 3000–5000 x g laitteella, jossa on ulos heilahtava roottori. Poista ja hävitä supernatantti kokonaisuudessaan.

Supernatanttiin vorteksoinnin jälkeen ennen sentrifugointia jääneet pienet epäpuhtaudet eivät vaikuta toimenpiteeseen.



Jos supernatanttia ei poisteta kokonaan, se estää lyysausta ja laimentaa lysaattia, mikä vaikuttaa RNA:n PAXgene-kalvoon kiinnittymisen olosuhteisiin.

4. Lisää 350 µl resuspensiopuskuria (BR1) ja vorteksoi, kunnes pelletti liikenee näkyvästi.
5. Pipetoi näyte 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen (MCT). Lisää 300 µl sidospuskuria (BR2) ja 40 µl proteinaasi K:ta (PK). Sekoita vorteksoimalla 5 sekunnin ajan ja inkuboi 10 minuuttia 55 °C:ssa käyttämällä ravistininkubaattoria nopeudella 400–1400 r/min. Aseta inkubaation jälkeen ravistininkubaattorin lämpötilaksi 65 °C (vaihetta 20 varten).



Älä sekoita sidospuskuria (BR2) ja proteinaasi K:ta (PK) yhteen ennen niiden lisäämistä näytteeseen.

6. Pipetoi lysaattia suoraan PAXgene Shredder spin column (PSC) -putkeen (violetti), joka on asetettu 2 ml:n käsittelyputkeen (PT), ja sentrifugoi 3 minuuttia maksiminopeudella (mutta ei yli 20 000 x g).



Pipetoi lysaatti varovasti spin column (PSC) -putkeen ja tarkista visuaalisesti, että lysaatti on täysin siirtynyt spin column (PSC) -putkeen.

Jotta PSC- ja PT-putket eivät vahingoitu, älä ylitä nopeutta 20 000 x g.



Jotkin näytteet voivat virrata PAXgene Shredder spin column (PSC) -putken läpi sentrifugoimatta. Tämä johtuu joidenkin näytteiden vähäisestä viskositeetista, eikä sitä pitäisi katsoa tuotteen toimimattomuuden merkiksi.

7. Siirrä läpivirtausfraktion koko supernatantti uuteen 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen (MCT) koskematta käsittelyputkessa olevaa pellettä.
8. Lisää 350 µl etanolia (puhtausaste p.a., 96–100 %). Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi lyhyesti (1–2 sekuntia nopeudella 500–1000 x g), jotta pisarat putken korkin sisäpuolelta lähtevät pois.



Sentrifugoinnin kesto ei saa olla yli 1–2 sekuntia, koska se voi aiheuttaa nukleiinihappojen pelletöitymistä ja vähentää kokonais-RNA:n tuottoa.

9. Pipetoi 700 µl näytettä PAXgene RNA spin column (PRC) -putkeen (punainen), joka on asetettu 2 ml:n käsittelyputkeen (PT), ja sentrifugoi 1 minuutin ajan nopeudella 8000–20,000 x g. Aseta spin column (PRC) -putki uuteen 2 ml:n käsittelyputkeen (PT) ja heitä pois vanha läpivirtausta sisältävä käsittelyputki (PT).

10. Pipetoi jäljelle jäänyt näyte PAXgene RNA spin column (PRC) -putkeen ja sentrifugoi 1 minuutin ajan nopeudella 8000–20 000 x g. Aseta spin column (PRC) -putki uuteen 2 ml:n käsittelyputkeen (PT) ja heitä pois vanha läpivirtausta sisältävä käsittelyputki (PT).



Pipetoi näyte varovasti spin column (PRC) -putkeen ja tarkista visuaalisesti, että näyte on täysin siirtynyt spin column (PRC) -putkeen.

11. Pipetoi 350 µl pesupuskuria 1 (BR3) PAXgene RNA spin column (PRC) -putkeen. Sentrifugoi 1 minuutin ajan nopeudella 8000–20 000 x g. Aseta spin column (PRC) -putki uuteen 2 ml:n käsittelyputkeen (PT) ja heitä pois vanha läpivirtausta sisältävä käsittelyputki (PT).

12. Lisää 10 µl DNAasi I (RNFD) -varastoliuosta 70 µl:aan DNA:n hajotuspuskuria (RDD), joka on 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkessa (MCT). Sekoita kääntämällä putkea varovasti ja sentrifugoi lyhyesti kerätäksesi jäännösnesteen putken reunoilta.

Jos käsittelet esimerkiksi 10 näytettä, lisää 100 µl DNAasi I (RNFD) -varastoliuosta 700 µl:aan DNA:n hajotuspuskuria (RDD). Käytä sarjan mukana tulleita 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkia (MCT).



DNAasi I on erittäin herkkä fyysiselle denaturoitumiselle. Sekoittaminen on tehtävä vain kääntelemällä putkea varovasti. Älä vorteksoi.

13. Pipetoi DNAasi I (RNFD) -inkubaatioseos (80 µl) suoraan PAXgene RNA spin column (PRC) -putken kalvolle ja aseta se työpöydälle (20–30 °C) 15 minuutin ajaksi.



Varmista, että DNAasi I (RNFD) -inkubaatioseos asetetaan suoraan kalvolle. DNAasin hajotus on epätäydellistä, jos osa seoksesta lisätään spin column (PRC) -putken seinämille tai O-renkaalle ja se pysyy siellä.

14. Pipetoi 350 µl pesupuskuria 1 (BR3) PAXgene RNA spin column (PRC) -putkeen ja sentrifugoi 1 minuutin ajan nopeudella 8000–20 000 x g. Aseta spin column (PRC) -putki uuteen 2 ml:n käsittelyputkeen (PT) ja heitä pois vanha läpivirtausta sisältävä käsittelyputki (PT).

15. Pipetoi 500 µl pesupuskuria 2 (BR4) PAXgene RNA spin column (PRC) -putkeen ja sentrifugoi 1 minuutin ajan nopeudella 8000–20 000 x g. Aseta spin column (PRC) -putki uuteen 2 ml:n käsittelyputkeen (PT) ja heitä pois vanha läpivirtausta sisältävä käsittelyputki (PT).



Wash Buffer 2 (BR4) -pesupuskuri toimitetaan konsentraattina. Varmista, että etanoli on lisätty pesupuskuriin 2 (BR4) ennen käyttöä (katso Ennen kuin aloitat, sivu 50).

16. Lisää toiset 500 µl pesupuskuria 2 (BR4) PAXgene RNA spin column (PRC) -putkeen. Käytä sentrifugissa 3 minuuttia nopeudella 8000–20 000 x g

17. Heitä pois läpivirtausta sisältävä käsittelyputki (PT) ja aseta PAXgene RNA spin column (PRC) -putki uuteen 2 ml:n käsittelyputkeen (PT). Käytä sentrifugissa 1 minuutti nopeudella 8000–20 000 x g

18. Heitä pois läpivirtauksen sisältävä käsittelyputki (PT). Aseta PAXgene RNA spin column (PRC) -putki 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen (MCT) ja pipetoi 40 µl eluutiopuskuria (BR5) suoraan PAXgene RNA spin column (PRC) -putken kalvolle. Käytä sentrifugissa 1 minuutti nopeudella 8000–20 000 x g RNA:n eluimista varten.

On tärkeää kastella koko kalvo eluutiopuskurilla (BR5), jotta saavutetaan maksimi eluutiotehokkuus.

19. Toista eluutiovaihe (vaihe 18) kuvauksen mukaisesti käyttämällä 40 µl eluutiopuskuria (BR5) ja samaa mikrosentrifugiputkea (MCT).

20. Inkuboi eluaattia 5 minuuttia 65 °C:ssa ravistininkubaattorissa (vaiheesta 5) ravistamatta. Inkuboinnin jälkeen jäähdytä välittömästi jään avulla.

Tämä inkubaatio 65 °C:ssa denaturoi RNA:n myöhempiä sovelluksia varten. Älä ylitä inkubaatioaikaa tai lämpötilaa.

21. Jos RNA-näytteitä ei käytetä välittömästi, säilytä niitä –20 °C:ssa tai –70 °C:ssa.

Koska RNA pysyy denaturoituneena toistuvan pakastuksen ja sulatuksen jälkeen, inkubointia 65 °C:ssa ei ole tarpeen toistaa. Jos käytät RNA-näytteitä diagnostisessa määrittelyksessä, noudata valmistajan antamia ohjeita.

Tarkkaa RNA:n kvantifiointia varten 260 nm:n absorbanssilla on suositeltavaa laimentaa näytteet 10 mM:n Tris-HCl:llä, pH 7,5. * Näytteen laimentaminen RNA-sittomalla vedellä voi johtaa epätarkan alhaisiin arvoihin.

Nollaa spektrofotometri käyttämällä nollanäytettä, joka on valmistettu samasta määrästä eluutiopuskuria (BR5) ja Tris-HCl-puskuria kuin mitattavissa näytteissä. Eluutiopuskurilla (BR5) on korkea absorbanssi 220 nm, mikä voi johtaa korkeisiin tausta-absorbanssitasoihin, jos spektrofotometriä ei ole asianmukaisesti nollattu.

Huomautus: Tris-HCl-puskurissa kvantifiointiin on käytettävä suhdetta

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$. Katso Liite B, sivu 67.

* Työkenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedoista, jotka ovat saatavana tuotteen toimittajalta.

Protokolla: Automaattinen kokonais-RNA:n puhdistus ihmisen kokoverestä, joka on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkiin

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Varmista, että pakkauksen laatikko on ehjä ja vahingoittumaton ja että puskurit eivät ole vuotaneet. Älä käytä sarjaa, joka on vahingoittunut.
- Kun käytät pipettiä, varmista, että se on asetettu oikeaan määrään ja että neste aspiroidaan ja tiputetaan varovasti ja kokonaisuudessaan.
- Jotta näytteitä ei siirretä väärään putkeen tai muovitarvikkeeseen, on varmistettava, että kaikki käsittelyputket (PT), mikrosentrifugiputket (MCT) ja roottoriadapterit on merkitty asianmukaisesti permanent-kynällä. Merkitse kunkin mikrosentrifugiputken (MCT) korkki ja runko, kunkin käsittelyputken (PT) runko ja kunkin roottoriadapterin ulkoseinämä.
- Näytteiden ja puskurien läikkyminen toimenpiteen aikana voi vähentää RNA:n tuottoa ja puhtautta.
- Ellei muutoin ilmoiteta, kaikki tämän protokollan vaiheet, mukaan lukien sentrifugointivaiheet, on suoritettava huoneenlämmössä (15–25 °C).

Nukleiinihappojen monistustekniikoiden herkkyyden takia seuraavia varotoimia tarvitaan käsiteltäessä näytteitä ristikontaminaation välttämiseksi.

- Pipetoi näyte varovasti käsittelyputken (PT) pohjalle kastelematta putken reunaa.
- Vaihda pipetin kärki aina liuoksen siirtojen välillä. Käytä aerosolinesstopipetikärkiä.
- Älä kosketa spin column -putken (PRC, PSC) kalvoa pipetin kärjellä.
- Kun olet vorteksoinut tai lämmittänyt mikrosentrifugiputkea (MCT), sentrifugoi sitä lyhyesti, jotta korkin sisäpuolella olevat pisarat lähtevät pois.

- Käytä käsineitä koko toimenpiteen ajan. Jos käsineet ja näyte joutuvat kosketuksiin toistensa kanssa, vaihda käsineet välittömästi.

Ennen kuin aloitat

- Verinäyte on otettava PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen *PAXgene Blood RNA Tube* -putken *käsikirjan* ohjeiden mukaisesti. Katso tarvittaessa liitteestä C (sivu 69) suosituksia PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkien käsittelemisestä.
- Varmista, että PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkia inkuboidaan vähintään 2 tuntia huoneenlämmössä verinäytteen ottamisen jälkeen, jotta verisolut lysoituvat täydellisesti. PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putken inkubointi yön yli voi suurentaa tuottoa. Jos PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkea säilytettiin lämpötilassa 2–8 °C, –20 °C tai –70 °C verinäytteen oton jälkeen, tasapainota se ensin huoneenlämpöön ja säilytä sitä sitten huoneenlämmössä kaksi (2) tuntia ennen toimenpiteen aloittamista.
- Lue turvallisuustiedot sivulta 10.
- Lue Tärkeitä ilmoituksia, sivu 38.
- Lue RNA:n käsittelyohjeet (liite A, sivu 66).
- Lue *QIAcube-käyttöopas* ja QIAcube-laitteen mukana tulleet lisätiedot ja kiinnitä erityistä huomiota turvallisuustietoihin.
- Varmista, että välineet, kuten pipetit ja QIAcube, on tarkastettu ja kalibroitu säännöllisesti valmistajan ohjeiden mukaan.
- Sidospuskuriin (BR2) voi muodostua saostuma säilytyksen aikana. Lämmitä puskuuri tarvittaessa 37 °C:seen, jotta se liukenee.
- Wash Buffer 2 (BR4) -pesupuskuuri toimitetaan konsentraattina. Lisää ennen ensimmäistä käyttökertaa 4 tilavuutta etanolia (96–100 %, puhtausluokka p.a.) pullon merkintöjen mukaan työskentelyliuosta varten.

- Jos käytät RNase-Free DNase Set -sarjaa ensimmäistä kertaa, valmista DNAasi I -varastoliuos. Liuota kiinteä DNAasi I (RNFD; 1500 Kunitz-yksikköä)* 550 µl:aan DNAasi-resuspensiopuskuria (DRB), joka sisältyy sarjaan. Varmista, että DNAasi I:ä (RNFD) ei häviä, kun avaat pullon. Älä vorteksoi käyttövalmiiksi saatettua DNAasi I (RNFD) -liuosta. DNAasi I on erittäin herkkä fyysiselle denaturoitumiselle. Sekoittaminen on tehtävä vain kääntelemällä putkea varovasti ylösalaisin.
- Nykyiset tiedot osoittavat, että käyttövalmiiksi saatettua DNAasi I (RNFD) -liuosta voidaan säilyttää 2–8 °C:ssa enintään 6 viikkoa. DNAasi I (RNFD) -liuoksen pitkäkestoista varastointia varten varastoliuos on poistettava lasipullosta, jaettava yhden käyttökerran alikvootteihin (käytä sarjan mukana tulevia 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkia [MCT], ne riittävät viiteen alikvoottiin) ja asetettava –20 °C:seen enintään 9 kuukaudeksi. Sulatettuja alikvootteja voi säilyttää 2–8 °C:n lämpötilassa enintään 6 viikkoa. Alikvootteja ei saa pakastaa uudelleen sulattamisen jälkeen.
- DNAasi I (RNFD) -liuoksen käyttövalmiiksi saattamisessa ja alikvootteihin jakamisessa on varmistettava, että noudatetaan RNA:n käsittelyohjeita (liite A, sivu 66).
- Asenna oikea ravistinadapteri (tulee QIAcube mukana; käytä adapteria 2 ml:n turvalukitusputkille, joissa on merkintä 2) ja aseta ravistelijateline adapterin päälle.
- Tarkista Waste (Jäte) -lokero ja tyhjennä se tarvittaessa.
- Asenna protokollat, jos sitä ei ole jo tehty edellisten ajojen yhteydessä. Asenna sekä PAXgene Blood RNA Part A- että PAXgene Blood RNA Part B -protokollat. Katso Protokollien asentaminen QIAcube-laitteeseen, sivu 38.

* Kunitz-yksiköt ovat yleisesti käytettyjä yksiköitä DNAasi I:n mittaamiseen. Yksikön määritelmä on se DNAasi I:n määrä, joka aiheuttaa A_{260} :n nousun 0,001/minuutti/millilitra 25 °C:ssa, pH:ssa 5,0, käytettäessä erittäin polymeroitunutta DNA:ta substraattina (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 ja 363).

Menetelmä

1. Sulje QIAcube-laitteen ovi ja kytke laitteeseen virta virtakytkimestä (katso kuva 15, sivu 39).

Äänimerkki kuuluu ja käynnistysnäyttö tulee näkyviin. Laite tekee käynnistykseen liittyvät testit automaattisesti.

2. Avaa QIAcube-laitteen ovi ja aseta tarvittavat reagenssit ja muovitarvikkeet QIAcube-laitteeseen. Katso QIAcube-laitteen täyttäminen, sivu 40.

Ajan säästämiseksi täyttö voidaan tehdä yhden tai molempien 10 minuutin sentrifugointivaiheen (vaiheet 3 ja 5) aikana.

3. Sentrifugoi PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkea 10 minuuttia nopeudella 3000–5000 x g laitteella, jossa on ulos heilahtava roottori.



Varmista, että verinäytettä on inkuboitu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkessa vähintään 2 tuntia huoneenlämmössä (15–25 °C), jotta verisolut lysoituvat täydellisesti.



Roottorin täytyy sisältää putkiadapterit pyöreäpohjaisille putkille. Jos muuntityypisiä putkiadaptoreita käytetään, putket voivat hajota sentrifugoinnin aikana.

4. Poista supernatantti dekanttoimalla tai pipetoimalla. Lisää 4 ml RNAasitonta vettä (RNFW) pellettiin ja sulje putki uudella toissijaisella BD Hemogard -sulkimella (sisältyy sarjaan).

Jos supernatantti dekantoidaan, älä koske pellettiin ja kuivaa putken reuna puhtaalla paperipyyhkeellä.

5. Vorteksoi, kunnes pelletti liukenee näkyvästi, ja sentrifugoi 10 minuuttia nopeudella 3000–5000 x g laitteella, jossa on ulos heilahtava roottori. Poista ja hävitä supernatantti kokonaisuudessaan.

Supernatanttiin vorteksoinnin jälkeen ennen sentrifugointia jääneet pienet epäpuhtaudet eivät vaikuta toimenpiteeseen.



Jos supernatanttia ei poisteta kokonaan, se estää lyysausta ja laimentaa lysaattia, mikä vaikuttaa RNA:n PAXgene-kalvoon kiinnittymisen olosuhteisiin.

6. Lisää 350 µl resuspensiopuskuria (BR1) ja vorteksoi, kunnes pelletti liukenee näkyvästi.
7. Pipetoi näyte 2 ml:n käsittelyputkeen (PT).



Käytä PAXgene Blood RNA Kit -sarjan sisältämiä 2 ml:n käsittelyputkia (PT).

8. Aseta avoimet, näytettä sisältävät käsittelyputket (PT) QIAcube-ravistelijaan (katso kuva 17, sivu 42). Näytepaikat on numeroitu asettamisen helpottamiseksi. Aseta ravistelijatelineen tulpat (tulevat QIAcube-laitteen mukana) ravistelijatelineen reunoilla oleviin aukkoihin kunkin käsittelyputken viereen. Tämä mahdollistaa näytteiden tunnistuksen asetustarkistuksen aikana.



Varmista, että oikea ravistinadapteri (Shaker Adapter, 2 ml, turvalukitusputket, merkitty 2, tulee QIAcube-putken mukana) on asennettu.



Jos käsittelet alle 12 näytettä, aseta ravistinteline kuvan 21, sivu 46, mukaisesti. Yhtä tai 11 näytettä ei voi käsitellä.

9. Sulje QIAcube-laitteen ovi (katso kuva 15, sivu 39).
10. Valitse PAXgene Blood RNA Part A -protokolla ja käynnistä se.

Noudata QIAcube-laitteen kosketusnäytössä annettuja ohjeita.



Varmista, että molemmat ohjelman osat (A ja B) on asennettu QIAcube-laitteeseen (katso Protokollien asentaminen QIAcube-laitteeseen, sivu 38).



QIAcube tekee asetustarkistukset näytteille, kärjille, roottoriadaptereille ja reagenssipulloille.

11. Kun PAXgene Blood RNA Part A -protokolla on valmis, avaa QIAcube-laitteen ovi (katso kuva 15, sivu 39). Poista ja heitä pois PAXgene RNA spin column (PRC) -putket roottoriadaptereista ja tyhjät käsittelyputket (PT) ravistelijasta.



Ajon aikana laite siirtää spin column -putket roottoriadapterin paikasta 1 (kannen paikka L1) roottoriadapterin paikkaan 3 (kannen paikka L2) (katso kuva 19, sivu 44).

12. Sulje kaikkien puhdistettua RNA:ta roottoriadaptereissa (paikka 3, kannen paikka L3, katso kuva 19, sivu 44) sisältävien 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkien (MCT) korkit. Siirrä 1,5 ml:n mikrosentrifugiputket (MCT) QIAcube-ravistinadapteriin (katso kuva 17, sivu 42).

13. Sulje QIAcube-laitteen ovi (katso kuva 15, sivu 39).

14. Valitse PAXgene Blood RNA Part B -protokolla ja käynnistä se.

Noudata QIAcube-laitteen kosketusnäytössä annettuja ohjeita.



Tämä ohjelma inkuboi näytteitä 65 °C:ssa ja denaturoi RNA:n myöhempiä sovelluksia varten. Vaikka myöhempi sovellus sisältäisi lämpödenaturointivaiheen, älä jätä tätä vaihetta tekemättä. Riittävä RNA:n denaturointi on tärkeää, jotta myöhemmät sovellukset ovat mahdollisimman tehokkaita.

15. Kun PAXgene Blood RNA Part B -ohjelma on valmis, avaa QIAcube-laitteen ovi (katso kuva 15, sivu 39). Aseta puhdistetun RNA:n sisältävät mikrosentrifugiputket (MCT) välittömästi jäähän.



VAROITUS: Kuuma pinta. Ravistelija voi lämmetä jopa 70 °C:n lämpötiloihin. Vältä koskemasta sitä, kun se on kuuma.



Älä anna puhdistetun RNA:n jäädä QIAcube-laitteeseen. Koska näytteitä ei ole jäädytetty, puhdistettu RNA voi hajota. Valvomattomia yöllä tapahtuvia näytteen valmisteluajoja ei tämän vuoksi suositella.

16. Jos RNA-näytteitä ei käytetä välittömästi, säilytä niitä –20 °C:ssa tai –70 °C:ssa.

Koska RNA pysyy denaturoituneena toistuvan pakastuksen ja sulatuksen jälkeen, ei ole tarpeen toistaa lämpöinkubointiprotokollaa (PAXgene Blood RNA Part B). Jos RNA-näytteitä käytetään diagnostisessa määrittämisessä, on noudatettava valmistajan antamia ohjeita.

Tarkkaa RNA:n kvantifiointia varten 260 nm:n absorbanssilla on suositeltavaa laimentaa näytteet 10 mM:n Tris-HCl:llä, pH 7,5. * Näytteen laimentaminen RNA-sittomalla vedellä voi johtaa epätarkan alhaisiin arvoihin.

* Työskennellessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedoista, jotka ovat saatavana tuotteen toimittajalta.

Nollaa spektrofotometri käyttämällä nollanäytettä, joka on valmistettu samasta määrästä eluutiopuskuria (BR5) ja Tris-HCl-puskuria kuin mitattavissa näytteissä. Eluutiopuskurilla (BR5) on korkea absorbanssi 220 nm, mikä voi johtaa korkeisiin tausta-absorbanssitasoihin, jos spektrofotometriä ei ole asianmukaisesti nollattu.



Tris-HCl-puskurissa kvantifiointiin on käytettävä suhdetta

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Katso Liite B, sivu 67.

17. Poista reagenssipulloteline QIAcube-työpöydältä (katso kuva 17, sivu 42) ja sulje kaikki pullot asianmukaisesti merkityillä korkeilla. Pulloissa olevaa puskuria voidaan säilyttää huoneenlämmössä (15–25 °C) enintään 3 kuukauden ajan. Poista ja hävitä QIAcube mikrosentrifugiputkien aukoissa oleviin käsittelyputkiin (PT) jääneet reagenssit (katso kuva 17, sivu 42). Poista ja hävitä roottoriadapterit sentrifugista (katso kuva 17, sivu 42). Tyhjennä QIAcube-laitteen Waste (Jäte) -lokero (katso kuva 15, sivu 39). Sulje QIAcube-laitteen ovi ja katkaise laitteen virta virtakytkimestä (katso kuva 15, sivu 39).

Ongelmien ratkaisu

Tämä ongelmien ratkaisupuos voi auttaa mahdollisissa esiin tulevissa ongelmisssa. Lisätietoja on saatavissa myös teknisen tuen sivustostamme usein kysyttyjen kysymysten osiosta: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGENin teknisen palvelun asiantuntijat vastaavat aina mielellään kysymyksiisi, koskivatpa ne sitten tämän käsikirjan tietoja tai tässä käsikirjassa esiteltyjä protokollia tai näytteisiin ja testeihin liittyviä tekniikoita. (Katso yhteystiedot tämän takakannesta tai osoitteesta www.qiagen.com.)

Huomautuksia ja ehdotuksia

RNA hajonnut

RNasin kontaminaatio



Ole varovainen, ettet vie RNAaseja reagensseihin toimenpiteen tai myöhemmän käsittelyn aikana (katso Liite A, sivu 66).

Heikko RNA:n tuotto

a) Alle 2,5 ml verta otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen



Varmista, että 2,5 ml verta on otettu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen (katso *PAXgene Blood RNA Tube -käsikirja*).

b) RNA-pitoisuus mitattuna vedessä



RNA on laimennettava 10 mM:n Tris-HCl:llä, pH 7,5, * tarkkaa kvantifiointia varten (katso Liite B, sivu 67).



c) Solujäte siirretty PAXgene RNA spin column (PRC) -putkeen manuaalisen protokollan vaiheissa 9 ja 10





Vältä siirtämästä suuria hiukkasia, kun pipetoit supernatanttia manuaalisen protokollan vaiheessa 7 (pienen solujätämäärän siirtäminen ei vaikuta toimenpiteeseen).

* Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista, jotka ovat saatavana tuotteen toimittajalta.

Huomautuksia ja ehdotuksia

- d) Supernatanttia ei poistettu täysin vaiheessa 3  Varmista, että supernatantti poistetaan kokonaisuudessaan. Jos supernatantti dekantoidaan, poista pisarat PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putken reunasta taputtelemalla sitä paperipyyhkeeseen. Ryhdy tarvittaviin varotoimiin ristikontaminaation estämiseksi.
- e) PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen ottamisen jälkeen verta inkuboidaan alle 2 tuntia.  Inkuboi verta PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkessa vähintään 2 tuntia näytteenoton jälkeen.

Matala A_{260}/A_{280} -arvo

- a) Vettä käytetty laimentamaan RNA:ta A_{260}/A_{280} -mittausta varten  Käytä 10 mM:n Tris-HCl:ää, pH 7,5, laimentamaan RNA ennen puhtauden mittaamista * (katso Liite B, sivu 67).
- b) Spektrofotometriä ei ole nollattu kunnolla  Nollaa spektrofotometri käyttämällä nollanäytettä, joka on valmistettu samasta määrästä eluutiopuskuria (BR5) ja 10 mM:n Tris-HCl-puskuria, pH 7,5, kuin mitattavissa näytteissä. Eluutiopuskurilla (BR5) on korkea absorbanssi 220 nm, mikä voi johtaa korkeisiin tausta-absorbanssitasoihin, jos spektrofotometriä ei ole asianmukaisesti nollattu.

* 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.

Huomautuksia ja ehdotuksia

Laitteen toimintahäiriö

QIAcube-laitetta ei käytetty oikein

Lue *QIAcube-käyttöopas* ja kiinnitä huomiota erityisesti Ongelmien ratkaisu -osioon. Varmista, että QIAcube on huollettu asianmukaisesti *QIAcube-käyttöoppaan* ohjeiden mukaisesti.

Liite A: Yleisiä huomautuksia RNA:n käsittelystä

RNA:n käsitteleminen



Ribonukleasit (RNAasit) ovat erittäin vakaita ja aktiivisia entsyymejä, jotka eivät tavallisesti edellytä kofaktoreita toimiakseen. Koska RNAaseja on vaikea inaktivoida ja jopa pikkuruiset määrät riittävät hajottamaan RNA:ta, mitään muovi- tai lasitarvikkeita ei saa käyttää poistamatta ensin mahdollista RNAasi-kontaminaatiota. On oltava erittäin varovainen, ettei vahingossa vie RNAaseja RNA-näytteeseen puhdistustoimenpiteen aikana tai sen jälkeen. Jotta voidaan luoda ja ylläpitää RNAasitonta ympäristöä, esikäsittelyn aikana on ryhdyttävä varotoimiin ja käytettävä kertakäyttöisiä ja ei-kertakäyttöisiä astioita ja liuoksia RNA:n kanssa työskennellessä.

Yleinen käsittely



Asianmukaista mikrobiologista, aseptista tekniikkaa on aina käytettävä työskennellessä RNA:n kanssa. Käsissä ja pölyssä on bakteereita ja homeita, ne ovat yleisiä RNAasi-kontaminaation lähteitä. Estä ihon pinnan tai pölyisten laboratoriovälineiden aiheuttamat RNAasi-kontaminaatiot käyttämällä aina lateksi- tai vinyylikäsitteitä, kun käsittelet reagensseja ja RNA-näytteitä. Vaihda käsiin usein ja pidä putket suljettuina aina kun mahdollista. Pidä puhdistettu RNA jäässä, kun alikvootteja pipetoidaan myöhempiä sovelluksia varten.

Käytäntöjä RNAasi-kontaminaation poistamiseen lasitarvikkeista ja liuoksista löytyy yleisistä molekyylibiologian oppaista, kuten Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Liite B Kokonais-RNA:n kvantifiointi ja laadun määrittäminen

RNA:n kvantifiointi

RNA:n pitoisuus on määritettävä mittaamalla absorbanssi 260 nm:ssä (A_{260}) spektrofotometrillä. Merkittävyyden varmistamiseksi lukemien tulisi olla spektrofotometrien lineaarisella alueella. Yhden yksikön absorbanssi aallonpituudella 260 nm vastaa 44 µg:aa RNA:ta millilitrassa ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$). Tämä suhde on voimassa vain mittauksissa, jotka tehdään 10 mM:n Tris-HCl-puskurissa, * pH 7,5. Siksi jos on tarpeen laimentaa RNA-näytettä, se on tehtävä 10 mM:n Tris-HCl-puskurilla. Kuten jäljempänä on selostettu (katso RNA:n puhtaus, sivu 68), absorbanssiarvojen suhde 260 ja 280 nm:ssä tuottaa arvion RNA:n puhtaudesta. Mitattaessa RNA-näytteitä on varmistettava, että kyvetit ovat RNAasittomia. Nollaa spektrofotometri käyttämällä nollanäytettä, joka on valmistettu samasta määrästä eluutiopuskuria (BR5) ja Tris-HCl-puskuria kuin mitattavissa näytteissä. Eluutiopuskurilla (BR5) on korkea absorbanssi 220 nm, mikä voi johtaa korkeisiin tausta-absorbanssitasoihin, jos spektrofotometriä ei ole asianmukaisesti nollattu. Esimerkki RNA:n kvantifioinnissa käytetystä laskennasta on esitetty jäljempänä.

RNA-näytteen tilavuus	= 80 µl
Laimennus (1/15)	= 10 µl RNA-näytettä + 140 µl 10 mM:n Tris-HCl:ä, pH 7,5
Mittaa kyvetissä (RNAasittomassa) olevan laimennetun näytteen absorbanssi.	
A_{260}	= 0,3
Näytteen pitoisuus	= $44 \times A_{260} \times \text{laimennuskerroin}$ = $44 \times 0,3 \times 15$ = 198 µg/ml
Kokonaistuotto	= pitoisuus x näytteen tilavuus millilitroina = 198 µg/ml x 0,08 ml = 15,8 µg RNA

* Työskennellessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista, jotka ovat saatavana tuotteen toimittajalta.

RNA:n puhtaus

260 nm:ssä ja 280 nm:ssä (A_{260}/A_{280}) mitattujen lukemien suhde antaa arvion RNA:n puhtaudesta suhteessa kontaminantteihin, jotka absorboivat UV-valoa, kuten proteiini. pH kuitenkin vaikuttaa merkittävästi A_{260}/A_{280} -suhteeseen. Matalampi pH tuottaa matalamman A_{260}/A_{280} -suhteen ja pienemmän herkkyuden proteiinikontaminaatiolle.* Tarkkoja arvoja varten on suositeltavaa mitata absorbanssi 10 mM:n Tris-HCl-puskurissa, pH 7,5. Puhtaalla RNA:lla on A_{260}/A_{280} -suhde 1,8–2,2 10 mM:n Tris-HCl-puskurissa, pH 7,5. Nollaa spektrofotometri käyttämällä nollanäytettä, joka on valmistettu samasta määrästä eluutiopuskuria (BR5) ja Tris-HCl-puskuria kuin mitattavissa näytteissä. Eluutiopuskurilla (BR5) on korkea absorbanssi 220 nm, mikä voi johtaa korkeisiin tausta-absorbanssitasoihin, jos spektrofotometriä ei ole asianmukaisesti nollattu.

* 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.

Liite C: PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkien käsitleminen



Seuraavat BD:n suositukset voivat olla hyödyllisiä käsiteltäessä PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkia. Katso *PAXgene Blood RNA Tube -käsikirjasta* lisätietoja PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkista.

Ohjeet BD Hemogard -sulkimen poistamiseen

1. Tartu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen toisella kädellä ja aseta peukalo BD Hemogard -sulkimen alle. (Lisää vakautta asettamalla käsivarsi tasaiselle pinnalle.) Väännä BD Hemogard -suljinta toisella kädellä, kun samanaikaisesti painat toisen käden peukalolla ylöspäin VAIN, KUNNES PUTKEN SULJIN ON LÖYSÄLLÄ.
2. Siirrä peukalo pois, ennen kuin nostat sulkimen. ÄLÄ käytä peukaloa painamaan suljinta pois PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkesta. Huomio: Jos PAXgene Blood RNA Tube (BRT) sisältää verta, on olemassa alistumisvaara. Loukkaantumisen estämiseksi sulkimen poistamisen yhteydessä on tärkeää, että peukalo, jolla suljinta painetaan ylöspäin, ei enää koske PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkeen välittömästi, kun BD Hemogard -suljin löystyy.
3. Nosta suljin pois PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkesta. Mikäli muovisuojaus irtoaa kumitulpasta, ÄLÄ KOKOA SULJINTA UUELLEEN. Poista kumisuljin varovasti PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkesta.

Ohjeet toissijaisen BD Hemogard -sulkimen asettamiseen

1. Aseta suljin PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putken päähän.
2. Väännä ja paina alaspäin tiukasti, kunnes suljin on asettunut uudelleen kokonaan. Sulkimen täydellinen uudelleenasetus on tarpeen, jotta se pysyy tiukasti PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkessa käsittelyn aikana.

Tilaustiedot

Tuote	Sisältö	Tuotenro
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Column -putkea, 50 Shredder Spin Column -putkea, käsittelyputkia, RNAasitonta DNAasi I:ä, RNAasittomia reagensseja ja puskureita. Käytettäväksi yhdessä PAXgene Blood RNA Tube -putkien kanssa	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 verinäyteputkea	762165
Liittyvät tuotteet, jotka voi tilata QIAGENilta		
Starter Pack, QIAcube	Pakkaus sisältää: reagenssipullotelineet (3); telineen merkintätarrat (8); 200 µl:n suodatinkärjet (1024); 1000 µl:n suodatinkärjet (1024); 1000 µl:n suodatinkärjet, leveäaukkoiset (1024); 30 ml:n reagenssipullot (18); roottoriadapterit (240); roottoriadapterin pidike	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Steriilit, kertakäyttöiset suodatinkärjet, telineessä	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Korkilliset reagenssipullot (30 ml), 6 kappaleen pakkaus, käytettäväksi QIAcube-reagenssipullotelineen kanssa	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	240 preparaattia varten: 240 kertakäyttöistä roottoriadapteria, käytettäväksi QIAcube-laitteen kanssa	990394

Reagent Bottle Rack	Teline, johon mahtuu 6 x 30 ml:n reagenssipulloa QIAcube-työpöydälle	990390
Rotor Adapter Holder	12 kertakäyttöisen roottoriadapterin pidike, käytettäväksi QIAcube-laitteen kanssa	990392

Liittyvät tuotteet, jotka voi tilata BD:ltä*

Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 21 G:n, 0,75 tuuman (0,8 x 19 mm:n) neula, 12 tuuman (305 mm:n) letku, jossa luer-sovitin; 50/laatikko, 200/pakkaus	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Pelkkä kotelo 13 mm:n ja 16 mm:n halkaisijalle; 1000/kotelo	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm 4,0 ml:n näytteenottoputki, jossa punainen BD Hemogard -suljin ja paperietiketti; 100/laatikko, 1000/kotelo	368975

* Nämä verinäytteen ottovälineet edustavat tyypillisiä tuotteita, joita voidaan käyttää PAXgene Blood RNA Tube (BRT) -putkien kanssa. Lisätietoja näistä lisävarusteista sekä niiden tilausohjeet ovat osoitteessa www.preanalytix.com.

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista PreAnalytiX- tai QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. PreAnalytiX- ja QIAGEN-sarjojen käyttöoppaat ja käsikirjat ovat saatavilla osoitteissa www.preanalytix.com ja www.qiagen.com. Ne voi myös pyytää PreAnalytiX-yhtiön tekniseltä palvelulta.

Käsikirjan muutoshistoria

Asiakirja ja versio	Muutokset	Päivämäärä
HB-0101-004, R2	Muutoksia koko asiakirjassa GHS-säädösten noudattamiseksi	Kesäkuu 2015
HB-0101-005, R3	Uusi mallipohja; muutoksia automaattiseen protokollaan ja suorituskykytietoihin, turvallisuustietojen päivitys GHS-säädösten noudattamista varten; muutoksia laitteen tietoihin ja tuotteen käyttörajoitusilmoitukseen.	Helmikuu 2019
HB-0101-006, R3	Korjattu sarjan nimi sarjan sisällön taulukossa sivulla 5.	Tammikuu 2020

PreAnalytiX Worldwide

PreAnalytiX-tuotteita jakelevat QIAGEN- ja BD-yhtiöt

Australia • Orders 03 9840 9800 • Fax 03 9840 9888 • Technical 1 800 243 066
Austria • Orders 0800 28 10 10 • Fax 0800 28 10 19 • Technical 0800 28 10 11
Belgium • Orders 0800 79612 • Fax 0800 79611 • Technical 0800 79556
Brazil • Orders 0800 557779 • Fax 55 11 5079 4001 • Technical 0800 557779
Canada • Orders 800 572 9613 • Fax 800 713 5951 • Technical 800 DNA-PREP (800 362 7737)
China • Orders 0086 21 3865 3865 • Fax 0086 21 3865 3965 • Technical 800 988 0325, 800 988 0327
Denmark • Orders 80 885945 • Fax 80 885944 • Technical 80 885942
Finland • Orders 0800 914416 • Fax 0800 914415 • Technical 0800 914413
France • Orders 01 60 920 926 • Fax 01 60 920 925 • Technical 01 60 920 930 • Offers 01 60 920 928
Germany • Orders 02103 29 12000 • Fax 02103 29 22000 • Technical 02103 29 12400
Hong Kong • Orders 800 933 965 • Fax 800 930 439 • Technical 800 930 425
Ireland • Orders 1800 555 049 • Fax 1800 555 048 • Technical 1800 555 061
Italy • Orders 02 33430411 • Fax 02 33430426 • Technical 800 787980
Japan • Telephone 03 5547 0811 • Fax 03 5547 0818 • Technical 03 5547 0811
Korea (South) • Orders 1544 7145 • Fax 1544 7146 • Technical 1544 7145
Luxembourg • Orders 8002 2076 • Fax 8002 2073 • Technical 8002 2067
Mexico • Orders 01 800 7742 639 • Fax 01 800 1122 330 • Technical 01 800 7742 639
The Netherlands • Orders 0800 0229592 • Fax 0800 0229593 • Technical 8000 0229602
Norway • Orders 800 18859 • Fax 800 18817 • Technical 800 18712
Singapore • Orders 65 67775366 • Fax 65 67785177 • Technical 65 67775366
Spain • Orders 91 630 7050 • Fax 91 630 5145 • Technical 91 630 7050
Sweden • Orders 020 790282 • Fax 020 790582 • Technical 020 798328
Switzerland • Orders 055 254 22 11 • Fax 055 254 22 13 • Technical 055 254 22 12
UK • Orders 01293 422 911 • Fax 01293 422 922 • Technical 01293 422 999
USA • Orders 800 426 8157 • Fax 800 718 2056 • Technical 800 DNA-PREP (800 362 7737)

www.qiagen.com

www.PreAnalytiX.com

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

www.bd.com

www.PreAnalytiX.com

