

Siječanj 2020.

Priručnik za PAXgene[®] Blood RNA Kit

Inačica 2



50 (kataloški br. 762174)

R3 **MAT** 1120409HR

REF 762174



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Proizvodi QIAGEN GmbH za PreAnalytiX

 **PreAnalytiX**
A QIAGEN / BD Company

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

Proizvodi PAXgene Blood RNA Kit nisu dostupni u svim državama; raspitajte se za njihovu dostupnost.

Ugovor o ograničenoj licenciji

Uporabom ovog proizvoda svaki kupac ili korisnik proizvoda PAXgene Blood RNA Kit pristaje na sljedeće uvjete:

1. PAXgene Blood RNA Kit smije se upotrebljavati isključivo u skladu s *Priručnikom za PAXgene Blood RNA Kit (PAXgene Blood RNA Kit Handbook)* i upotrebljavati samo s komponentama uključenima u komplet. Društvo PreAnalytiX ne daje nikakvu licenciju za svoje intelektualno vlasništvo za uporabu ili ugrađivanje komponenta ovog kompleta s bilo kojom komponentom koja nije sadržana u ovom kompletu, osim kako je opisano u *Priručniku za PAXgene Blood RNA Kit* i drugim protokolima dostupnima na web-mjestu www.preanalytix.com.
2. Osim izričito navedenih licencija, društvo PreAnalytiX ne jamči da ovaj komplet i/ili njegova uporaba ne krši prava trećih strana.
3. Ovaj komplet i njegove komponente licencirani su samo za jednokratnu uporabu i ne smiju se ponovno upotrebljavati, prerađivati niti preprodavati.
4. Društvo PreAnalytiX odriče se svih drugih licencija, izričitih ili impliciranih, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik ovog kompleta potvrđuju da neće dati ili dopustiti drugim osobama poduzimanje koraka koji bi mogli dovesti do kršenja gore navedenih odredbi ili omogućiti njihovo kršenje.
6. Društvo PreAnalytiX može provesti zabrane navedene u ovom Ugovoru o ograničenoj licenciji na bilo kojem sudu te će potraživati sve sudske troškove i troškove postupka istraživanja, uključujući troškove odvjetnika, za svaku radnju s ciljem provedbe ovog Ugovora o ograničenoj licenciji ili bilo kojeg svojeg prava intelektualnog vlasništva povezanog s kompletom i/ili njegovim komponentama.

Ažurirane uvjete licencije potražite na web-mjestu www.preanalytix.com.

Uvjetna prodaja

Navedeni proizvod dolazi s licencijom pod određenim patentnim zahtjevima US-7,270,953 i US-7,682,790, kao i EP-1820793 B1 te stranim ekvivalentima ovim patentnim zahtjevima za uporabu proizvoda za obradu kompleksa nukleinske kiseline koji se stvara tijekom prikupljanja uzoraka u epruveti PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-006 BD-8945 1120409 © 2005 – 2020 PreAnalytiX GmbH, sva prava pridržana.

PreAnalytiX Company

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Švicarska

www.preanalytix.com

Distributeri proizvoda društva PreAnalytiX

Proizvode društva PreAnalytiX za PreAnalytiX proizvodi društvo QIAGEN ili BD te ih za PreAnalytiX distribuira društvo QIAGEN ili BD. Proizvodi se ne mogu naručiti od društva PreAnalytiX GmbH.

Podatke za kontakt lokalnog distributera proizvoda društva PreAnalytiX potražite na posljednjoj stranici.

Sadržaj

| | |
|--|----|
| Sadržaj kompleta..... | 5 |
| Simboli..... | 7 |
| Uvjeti pohrane | 9 |
| Namjena | 9 |
| Ograničenja uporabe proizvoda..... | 10 |
| Kontrola kvalitete | 10 |
| Tehnička podrška | 10 |
| Sigurnosne informacije | 11 |
| Uvod | 14 |
| Načelo i postupak..... | 14 |
| Prikupljanje i stabilizacija uzoraka | 14 |
| Koncentracija i pročišćavanje RNK | 20 |
| Ručno pročišćavanje RNK | 20 |
| Automatizirano pročišćavanje RNK..... | 30 |
| Oprema i reagensi koje isporučuje korisnik | 36 |
| Važne napomene | 38 |
| Uporaba QIAcube..... | 38 |
| Pokretanje instrumenta QIAcube..... | 38 |
| Instaliranje protokola na instrument QIAcube..... | 38 |
| Punjenje instrumenta QIAcube..... | 40 |
| Protokol: ručno pročišćavanje ukupne RNK iz ljudske pune krvi prikupljene u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) | 49 |

| | |
|---|----|
| Protokol: automatizirano pročišćavanje ukupne RNK iz ljudske pune krvi prikupljene u epruветama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) | 56 |
| Vodič za rješavanje problema..... | 63 |
| Dodatak A: Opće napomene o rukovanju s RNK..... | 65 |
| Dodatak B: Kvantifikacija i određivanje kvalitete ukupne RNK | 66 |
| Dodatak C: Rukovanje epruветama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)..... | 67 |
| Informacije za naručivanje | 69 |
| Povijest revizija priručnika | 71 |


Sadržaj kompleta

| PAXgene Blood RNA Kit | | | (50) |
|-----------------------|--|-----------------|-----------------------------------|
| Kataloški br. | | | 762174 |
| Broj preparata | | | 50 |
| BR1 | Resuspension Buffer (Pufer za resuspendiranje) | RES BUF | 20 ml |
| BR2 | Binding Buffer (Vezivni pufer)* | BIND BUF | 18 ml |
| BR3 | Wash Buffer 1 (Pufer za ispiranje 1)* | WASH BUF 1 | 45 ml |
| BR4 | Wash Buffer 2 (concentrate) (Pufer za ispiranje 2 (koncentrat)) [†] | WASH BUF 2 CONC | 11 ml |
| BR5 | Elution Buffer (Pufer za eluiranje) | ELU BUF | 6 ml |
| RNFW | RNase-free Water (bottle) (Voda bez ribonukleaze (RNaze) (bočica)) | PEL WASH | 2 × 125 ml |
| PK | Proteinase K (green lid) (Proteinaza K (zeleni poklopac)) | PROTK | 2 × 1,4 ml |
| PRC | PAXgene RNA Spin Columns (red) (Spin kolone PAXgene RNA (crvene)) | PAXgene RNA COL | 5 × 10 |
| PT | Processing Tubes (2 ml) (Epruvete za obradu (2 ml)) | PROC TUBE | 6 × 50 |
| Hemogard | Secondary BD Hemogard™ Closures (Sekundarni poklopci BD Hemogard™) | SEC CLOS | 50 |
| MCT | Microcentrifuge Tubes (1,5 ml) (Epruvete za mikrocentrifugu (1,5 ml)) | MIC TUBE | 3 × 50, 1 × 10 |
| RNFD | DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNaza I, bez RNaze (liofilizirana)) | DNA REM | 1500 Kunitz jedinica [‡] |
| RDD | DNA Digestion Buffer (white lid) (Pufer za razgradnju DNK (bijeli poklopac)) | DNA DIG BUF | 2 × 2 ml |
| DRB | DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (Pufer za resuspendiranje DNaze (epruveta, ljubičasti poklopac)) | DNase RES BUF | 2 ml |

*Nije kompatibilan s reagensima za dezinfekciju koji sadržavaju izbjeljivač. Sadržava sol gvanidina. Informacije o sigurnosti potražite na stranici 11.

[†] Pufer za ispiranje 2 (BR4) isporučuje se kao koncentrat. Prije prve uporabe dodajte 4 volumena etanola (96 – 100-postotni, razred čistoće p.a.), kako je naznačeno na bočici, za dobivanje radne otopine.

[‡] Kunitz jedinice se upotrebljavaju za mjerenje DNaze I te se definiraju kao količina DNaze I koja uzrokuje povećanje u A₂₆₀ od 0,001 po minuti po mililitru pri 25 °C, pH 5,0, s visoko polimeriziranom DNK kao supstratom (Kunitz, M. (1950.) J. Gen. Physiol. **33**, 349 i 363).

| | | | |
|------------------------------|--|---|--------|
| PAXgene Blood RNA Kit | | (50) | |
| Kataloški br. | | 762174 | |
| Broj preparata | | 50 | |
| PSC | PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (Spin kolone PAXgene Shredder (ljubičaste)) | PAXgene SHRED COL | 5 × 10 |
| Priručnik | Priručnik za PAXgene Blood RNA Kit (inačica 2) |  | 1 |

Simboli



Sadržava reagensa dovoljno za <N> testova



Prije uporabe pročitajte upute



Upotrijebiti do



In vitro dijagnostički medicinski proizvod



Kataloški broj



Broj serije



Broj materijala



Komponente



Broj



Metoda sterilizacije zračenjem



Kunitz jedinice



Dodavanje



Sadržava











Rekonstituirano



Deoksiribonukleaza I



Etanol

| | |
|--|--|
| GITC | Gvanidin izotiocijanat |
| RNase-Free DNase Set | RNase-Free DNase Set |
| GTIN | Globalni broj trgovačke jedinice |
|  | Za jednokratnu uporabu |
|  | Ograničenje temperature |
|  | Gornja granica temperature |
|  | Proizvođač |
|  | Važna napomena |
|  _____ | Evidentirati trenutačni datum nakon dodavanja etanola u bočicu |
|  | Pri dolasku |
|  | Vodi do |

Uvjeti pohrane

Spin kolone PAXgene RNA (PRC), spin kolone PAXgene Shredder (PSC), proteinaza K (PK) te puferi (BR1, BR2, BR3, BR4 i BR5) mogu se pohraniti na suhom na temperaturi naznačenoj na naljepnici kompleta.

RNase-Free DNase Set, koji sadržava DNazu I (RNFD), pufer za razgradnju DNK (RDD) te pufer za resuspendiranje DNaze (DRB), isporučuje se pri sobnoj temperaturi. Pohranite sve komponente RNase-Free DNase Set odmah nakon primitka pri temperaturi naznačenoj na naljepnici. U slučaju propisne pohrane komplet je stabilan do datuma isteka valjanosti na kutiji kompleta.

Namjena

Komplet PAXgene Blood RNA Kit služi za pročišćavanje unutarstanične RNK iz pune krvi prikupljene u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Kada se komplet upotrebljava u kombinaciji s epruvetom PAXgene Blood RNA Tube (BRT), sustav pruža pročišćenu unutarstaničnu RNK iz pune krvi za reakciju RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction, lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja) koja se upotrebljava u molekularnom dijagnostičkom testiranju. Informacije o uporabi epruveta PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) potražite u *Priručniku za PAXgene Blood RNA Tube (PAXgene Blood RNA Tube Handbook)*.

Značajke radnog učinka sustava PAXgene Blood RNA System utvrđene su samo s genskim transkriptima FOS i IL1B. Korisnik je odgovoran za utvrđivanje odgovarajućih značajki radnog učinka sustava PAXgene Blood RNA System za druge ciljane transkripte.

Ograničenja uporabe proizvoda

Komplet PAXgene Blood RNA Kit namijenjen je za pročišćavanje unutarstanične RNK iz ljudske pune krvi ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocita/ml) za in vitro dijagnostičke primjene. Nije za pročišćavanje genomske DNK ili nukleinskih kiselina virusa iz ljudske pune krvi. Zbog ograničenog broja transkripata potvrđenih za specifikacije stabilizacije (genski transkripti FOS i IL1B), značajke radnog učinka nisu utvrđene za sve transkripte. Laboratorijsko osoblje treba pregledati podatke proizvođača i svoje vlastite podatke kako bi odredilo je li potrebno potvrđivanje za druge transkripte.

Ovaj proizvod namijenjen je uporabi za profesionalne korisnike, primjerice tehničare i liječnike, koji su obučeni u in vitro dijagnostičkim postupcima.

Kontrola kvalitete

U skladu sa sustavom za upravljanje kvalitetom društva QIAGEN certificiranim u skladu s normom ISO, svaka serija kompleta PAXgene Blood RNA Kit ispituje se prema unaprijed određenim specifikacijama kako bi se osigurala dosljedna kvaliteta proizvoda.

Tehnička podrška

Mi u društvu QIAGEN ponosni smo na kvalitetu i dostupnost svoje tehničke podrške. U našim odjelima tehničke službe rade iskusni znanstvenici s bogatim praktičnim i teorijskim znanjem iz područja molekularne biologije i uporabe proizvoda društva PreAnalytiX. Ako imate kakva pitanja u vezi kompleta PAXgene Blood RNA Kit, slobodno nas kontaktirajte.

Za tehničku podršku i više informacija nazovite tehničku službu društva QIAGEN.

Sigurnosne informacije

Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale.

Kako biste izbjegli rizik od infekcija (primjerice, virusom HIV-a ili virusima hepatitisa B) ili ozljeda prilikom rada s biološkim i kemijskim materijalima, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (safety data sheets, SDS). Oni su dostupni na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na web-mjestu **www.preanalytix.com**. Ondje možete pronaći, pregledati i ispisati sigurnosno-tehničke listove za ovaj komplet.

OPREZ



NEMOJTE dodavati izbjeljivač ili kisele otopine izravno u otpad nastao pripremom uzoraka.

Vezivni pufer (BR2) i pufer za ispiranje 1 (BR3) sadržavaju gvanidin tiocijanat, koji u kombinaciji s izbjeljivačem može stvoriti visoko reaktivne spojeve. Ako se vezivni pufer (BR2) ili pufer za ispiranje 1 (BR3) proliju, očistite odgovarajućim laboratorijskim deterdžentom i vodom. Ako se tekućina koja sadržava potencijalno infektivne agense prolije, očistite zahvaćeno područje najprije laboratorijskim deterdžentom i vodom, a zatim 1-postotnim (v/v) natrijevim hipokloritom.

Mješavina otopine za stabilizaciju RNK i krvi iz epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT) može se dezinficirati uporabom 1 volumena komercijalno dostupne otopine izbjeljivača (5-postotni natrijev hipoklorit) na 9 volumena mješavine otopine za stabilizaciju RNK i krvi.

Otpad nastao pripremom uzoraka, kao što su supernatanti iz koraka centrifugiranja u postupku pročišćavanja RNK, smatra se potencijalno infektivnim. Prije zbrinjavanja otpad se mora sterilizirati u autoklavu ili zapaliti kako bi se uništio infektivni materijal. Zbrinjavanje se mora obaviti prema službenim propisima.

Sljedeće izjave o opasnosti i mjerama opreza odnose se na komponente kompleta PAXgene Blood RNA Kit. Sigurnosne informacije o epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) potražite u *Priručniku za PAXgene Blood RNA Tube*.

Pufer BR2



Sadržava: gvanidin tiocijanat. Opasnost! Štetno ako se proguta. Može biti štetno u dodiru s kožom ili ako se udiše. Uzrokuje ozbiljno oštećenje očiju. Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. U dodiru s kiselinama oslobađa vrlo otrovni plin. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice. U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ako ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispiranje. Odmah nazvati CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA ili liječnika.

Pufer BR3



Sadržava: etanol; gvanidin tiocijanat. Opasnost! Zapaljiva tekućina i para. Uzrokuje ozbiljno oštećenje očiju. U dodiru s kiselinama oslobađa vrlo otrovni plin. Čuvati odvojeno od topline/iskre/otvorenog plamena/vrućih površina. Ne pušiti. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice. U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ako ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispiranje. Odmah nazvati CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA ili liječnika.

DNaza I



Sadržava: DNazu. Opasnost! Može izazvati alergijsku reakciju na koži. Ako se udiše može izazvati simptome alergije ili astme ili poteškoće s disanjem. Izbjegavati udisanje prašine/dima/plina/magle/pare/aerosola. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice. Nositi sredstva za zaštitu dišnog sustava. U SLUČAJU izloženosti ili sumnje na izloženost: nazvati CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA ili liječnika. Premjestiti unesrećenog na svježi zrak, umiriti ga i postaviti u položaj koji olakšava disanje.

Proteinaza K



Sadržava: proteinazu K. Opasnost! Uzrokuje blago nadraživanje kože. Ako se udiše može izazvati simptome alergije ili astme ili poteškoće s disanjem. Izbjegavati udisanje prašine/dima/plina/magle/pare/aerosola. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice. Nositi sredstva za zaštitu dišnog sustava. U SLUČAJU izloženosti ili sumnje na izloženost: nazvati CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA ili liječnika. Premjestiti unesrećenog na svježi zrak, umiriti ga i postaviti u položaj koji olakšava disanje.

Uvod

Prikupljanje pune krvi prvi je korak u mnogim molekularnim ispitivanjima kojima se proučava stanična RNK. Međutim, veliki problem u takvim eksperimentima predstavlja nestabilnost profila stanične RNK in vitro. Istraživanja društva PreAnalytiX pokazala su da se broj kopija pojedinačnih vrsta mRNA u punoj krvi može promijeniti za više od 1000 puta tijekom pohrane ili transporta pri sobnoj temperaturi.* Te su promjene uzrokovane brзом degradacijom RNK i induciranom ekspresijom određenih gena nakon prikupljanja uzorka krvi. Takve promjene u profilu ekspresije RNK onemogućuju pouzdana ispitivanja ekspresije gena. Stoga je metoda kojom bi se očuvao profil ekspresije RNK tijekom i nakon flebotomije ključna za točnu analizu ekspresije gena u ljudskoj punoj krvi.

Načelo i postupak

Društvo PreAnalytiX razvilo je novi sustav koji omogućava prikupljanje, stabilizaciju, pohranu i transport uzoraka ljudske pune krvi, uz brz i učinkovit protokol za pročišćavanje unutarstanične RNK. Za sustav je potrebna uporaba epruveta PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; američki patenti 6,602,718 i 6,617,170) za prikupljanje krvi i stabilizaciju RNK, nakon čega slijedi ručno ili automatizirano pročišćavanje RNK s pomoću kompleta PAXgene Blood RNA Kit. Ručni i automatizirani protokoli pružaju u suštini jednak radni učinak s obzirom na kvalitetu i prinos RNK. Podaci o radnom učinku za ručni protokol (stranice 23–30) i automatizirani protokol (stranice 33–35) uključeni su u ovaj priručnik.

Prikupljanje i stabilizacija uzoraka

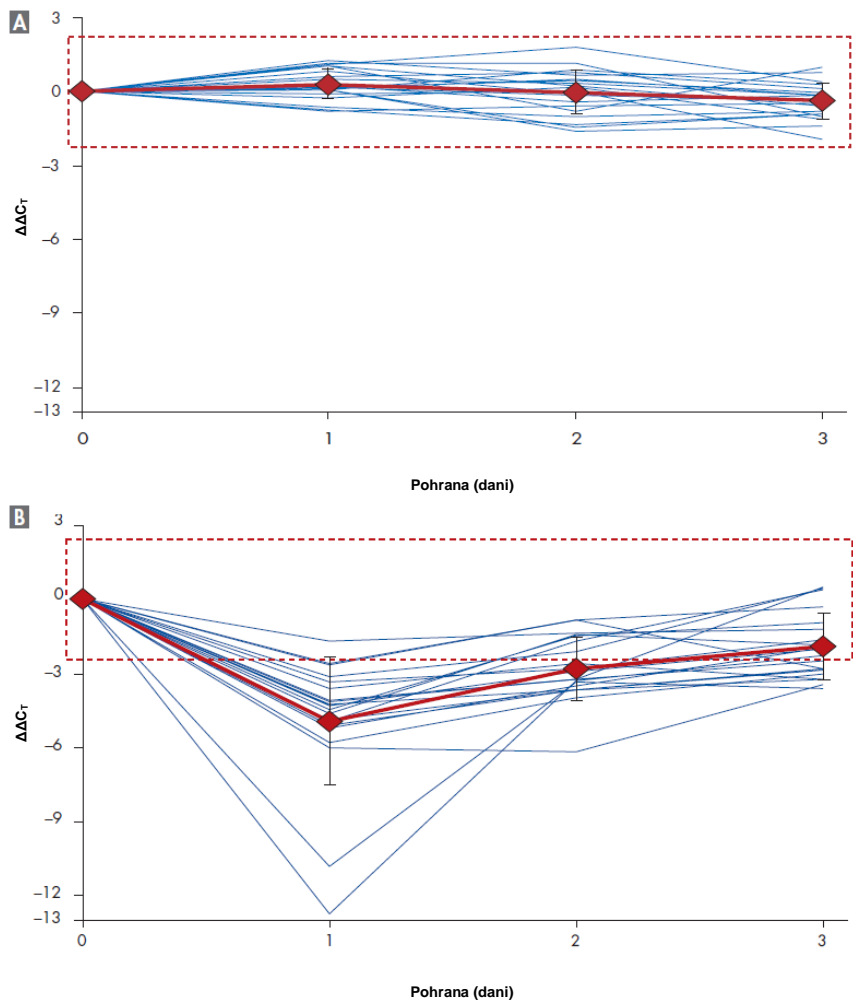
Epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) sadržavaju patentirani sastav reagensa temeljen na patentiranoj tehnologiji stabilizacije RNK. Sastav reagensa štiti molekule RNK od degradacije RNazama i umanjuje ex vivo promjene u ekspresiji gena. Epruvete

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

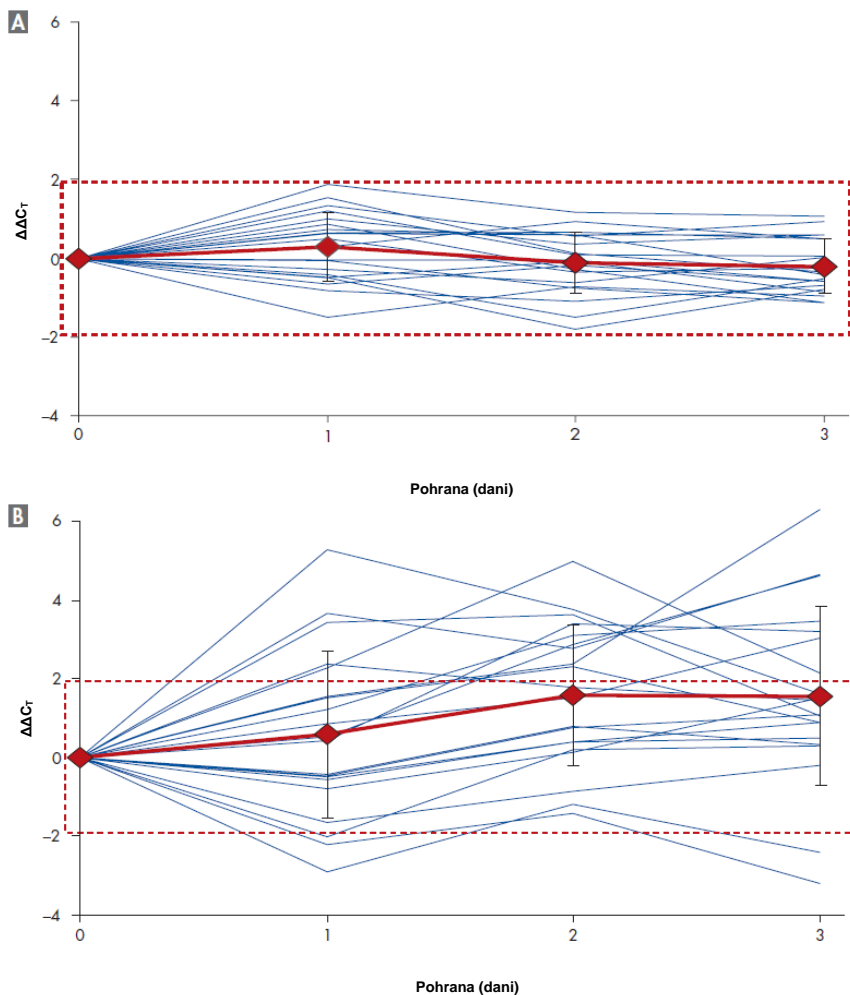
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) namijenjene su za prikupljanje ljudske pune krvi i stabilizaciju stanične RNK do 3 dana pri 18 – 25 °C (slike 1 i 2, stranice 16 i 17) ili do 5 dana pri 2 – 8 °C (slike 3 i 4, stranice 18 i 19). Trenutačno dostupni podaci pokazuju stabilizaciju stanične RNK tijekom najmanje 11 godina pri -20 °C ili -70 °C*. Za više informacija iz aktualnih ispitivanja koja procjenjuju stabilnost tijekom dužih razdoblja, kontaktirajte tehničku službu društva QIAGEN.

Stvarno trajanje stabilizacije RNK može varirati ovisno o vrsti stanične RNK i upotrijebljenom postupku daljnje obrade. Zbog ograničenog broja transkripata potvrđenih za specifikacije stabilizacije (genski transkripti FOS i IL1B), značajke radnog učinka nisu utvrđene za sve transkripte. Laboratorijsko osoblje treba pregledati podatke proizvođača i svoje vlastite podatke kako bi odredilo je li potrebno potvrđivanje za druge transkripte.

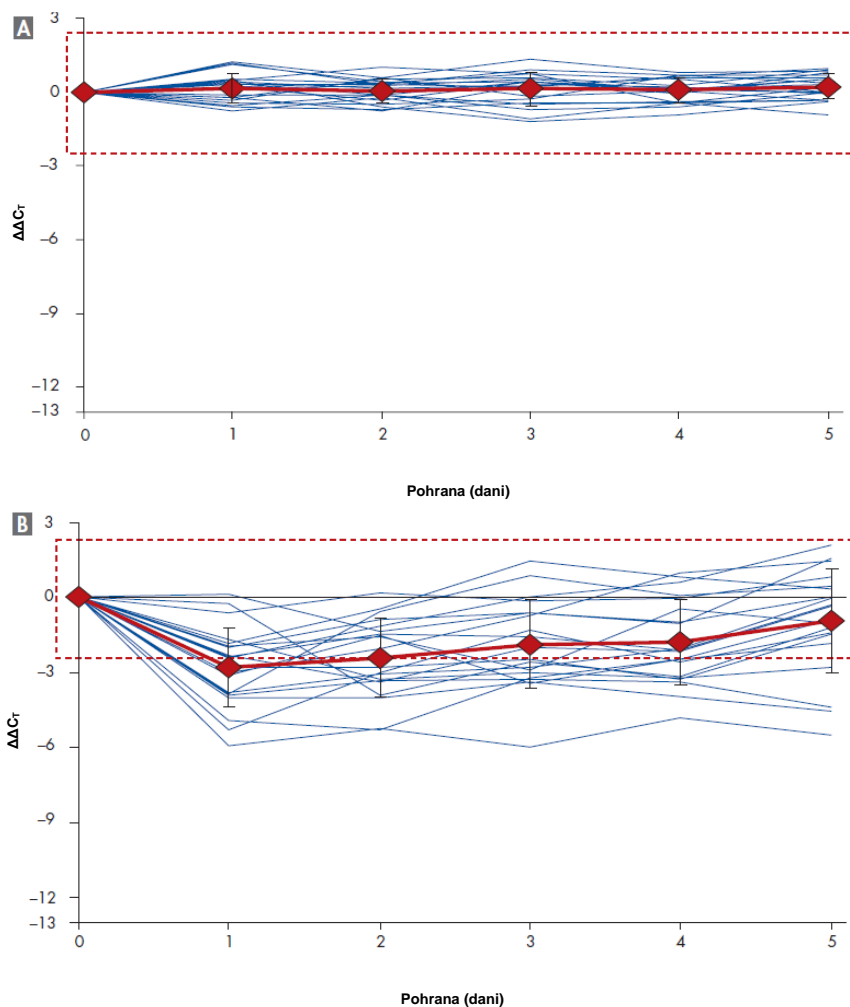
* U tijeku je dugotrajno ispitivanje pohrane krvi u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes.



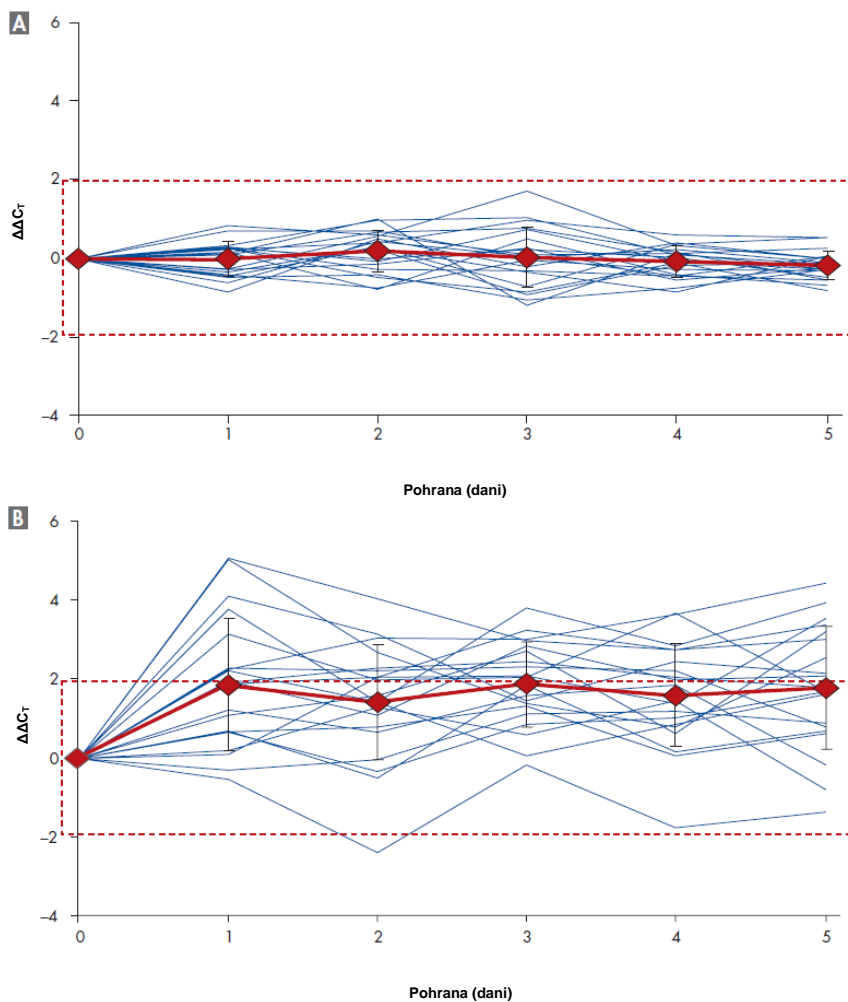
Slika 1. Stabilnost RNK u uzorcima krvi pri 18 – 25 °C: FOS. Krv je prikupljena od 10 davatelja, uz duplikate uzoraka, te pohranjena na 18 – 25 °C tijekom navedenog broja dana, nakon čega je slijedilo pročišćavanje ukupne RNK. **[A]** Krv je prikupljena i pohranjena u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), a ukupna RNK pročišćena je s pomoću kompleta PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Krv je prikupljena i pohranjena u standardne epruvete za prikupljanje krvi s etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA) kao antikoagulansom, a ukupna je RNK pročišćena s pomoću standardne metode organske ekstrakcije s čišćenjem RNK na bazi membrane od silika-gela. Relativne razine transkripta gena FOS određene su dvostrukom reakcijom RT-PCR u stvarnom vremenu, uz uporabu 18S rRNK kao internog standarda. Ucrtane su vrijednosti svih uzoraka, s prikazanim srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama svih uzoraka. Isprekidane linije označavaju ukupnu preciznost ispitivanja od $\pm 3 \times (2,34 C_T)$.



Slika 2. Stabilnost RNK u uzorcima krvi pri 18 – 25 °C: IL1B. Krv je prikupljena i ukupna RNK pročišćena, nakon pohrane pri 18 – 25 °C, kako je opisano na slici 1. Relativne razine transkripta gena IL1B određene su dvostrukom reakcijom RT-PCR u stvarnom vremenu, uz uporabu 18S rRNK kao internog standarda. Učrtane su vrijednosti svih uzoraka, s prikazanim srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama svih uzoraka. Isprekidane linije označavaju ukupnu preciznost ispitivanja od $\pm 3 \times (1,93 C_T)$.



Slika 3. Stabilnost RNK u uzorcima krvi pri 2 – 8 °C: FOS. Krv je prikupljena od 10 davatelja, uz duplikate uzoraka, te pohranjena na 2 – 8 °C tijekom navedenog broja dana, nakon čega je slijedilo pročišćavanje ukupne RNK. **[A]** Krv je prikupljena i pohranjena u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), a ukupna RNK pročišćena je s pomoću kompleta PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Krv je prikupljena i pohranjena u standardne epruvete za prikupljanje krvi s etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA) kao antikoagulansom, a ukupna je RNK pročišćena s pomoću standardne metode organske ekstrakcije s čišćenjem RNK na bazi membrane od silika-gela. Relativne razine transkripta gena FOS određene su dvostrukom reakcijom RT-PCR u stvarnom vremenu, uz uporabu 18S rRNK kao internog standarda. Uctane su vrijednosti svih uzoraka, s prikazanim srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama svih uzoraka. Isprekidane linije označavaju ukupnu preciznost ispitivanja od $\pm 3 \times (2,34 C_T)$.



Slika 4. Stabilnost RNK u uzorcima krvi pri 2 – 8 °C: IL1B. Krv je prikupljena i ukupna RNK pročišćena, nakon pohrane pri 2 – 8 °C, kako je opisano na slici 3. Relativne razine transkripta gena IL1B određene su dvostrukom reakcijom RT-PCR u stvarnom vremenu, uz uporabu 18S rRNK kao internog standarda. U crtane su vrijednosti svih uzoraka, s prikazanim srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama svih uzoraka. Isprekidane linije označavaju ukupnu preciznost ispitivanja od $\pm 3 \times (1,93 C_T)$.

Koncentracija i pročišćavanje RNK

Komplet PAXgene Blood RNA Kit služi za pročišćavanje ukupne RNK iz 2,5 ml ljudske pune krvi prikupljene s pomoću epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Postupak je jednostavan i može se provesti s pomoću ručnih ili automatiziranih protokola (pogledajte slike 5 i 10, stranice 21 i 31). U oba protokola pročišćavanje počinje s korakom centrifugiranja za stvaranje taloga nukleinskih kiselina u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Talog se ispire i resuspendira, nakon čega slijedi ručno ili automatizirano pročišćavanje RNK. U načelu, oba protokola slijede jednake korake protokola koji uključuju jednake komponente kompleta.

Ručno pročišćavanje RNK

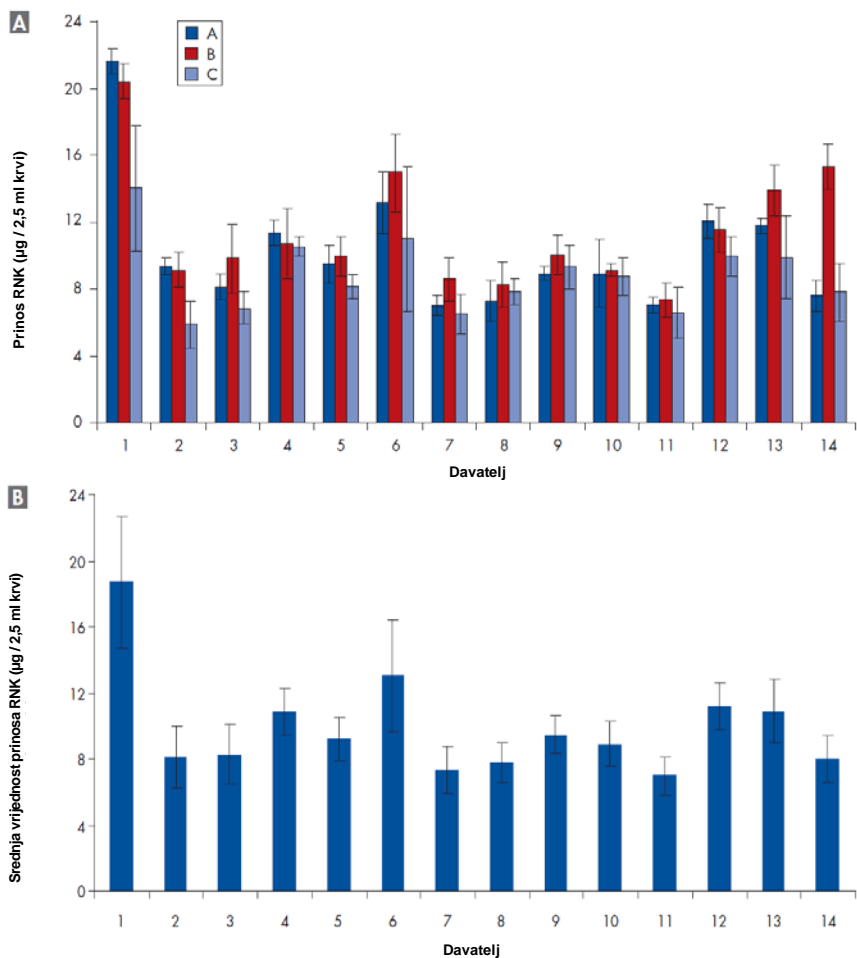
Resuspendirani talog inkubira se u optimiziranim puferima zajedno s proteinazom K (PK) kako bi došlo do razgradnje proteina. Provodi se dodatno centrifugiranje s pomoću spin kolone PAXgene Shredder (PSC) kako bi se homogenizirao lizat stanica te uklonio preostali stanični ostatak, a supernatant nevezane frakcije (eng. flow-through fraction) prenosi se u novu epruvetu za mikrocentrifugu. Dodaje se etanol kako bi se prilagodili uvjeti vezanja te se lizat postavlja u spin kolonu PAXgene RNA (PRC). Tijekom kratkog centrifugiranja RNK se selektivno veže na membranu od silika-gela PAXgene, dok kontaminanti prolaze kroz membranu. Preostali kontaminanti se uklanjaju u nekoliko učinkovitih koraka ispiranja. Između prvog i drugog koraka ispiranja membrana se tretira DNazom I (RNFD) kako bi se uklonile količine vezane DNK u tragovima. Nakon koraka ispiranja RNK se eluira u puferu za eluiranje (BR5) i toplinski se denaturira.

Ukupna RNK pročišćena sustavom PAXgene Blood RNA System je čista. Prilikom uporabe ručnog protokola vrijednosti A_{260}/A_{280} su između 1,8 i 2,2, a $\leq 1\%$ (w/w) genomske DNK prisutno je u $\geq 95\%$ svih uzoraka, što je izmjereno kvantitativnom reakcijom PCR (polymerase chain reaction, lančana reakcija polimerazom) u stvarnom vremenu sekvence gena beta-aktin. Barem 95 % uzoraka ne pokazuje inhibiciju u reakciji RT-PCR uz iskorištenje do 30 % eluata.

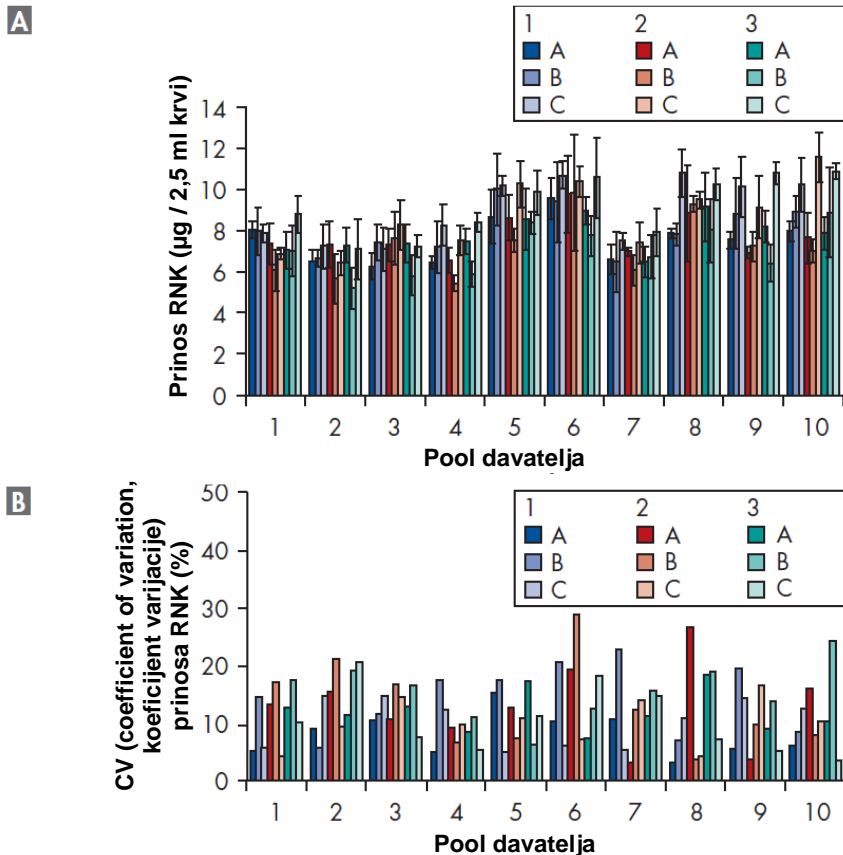
Za uporabu ručnog protokola prosječno je vrijeme pripreme uzoraka (na temelju podataka iz 12 procesa pripreme uzoraka) otprilike 90 minuta*, sa samo 40 minuta vremena rada rukama. Prinosi RNK iz 2,5 ml zdrave ljudske pune krvi su $\geq 3 \mu\text{g}$ za $\geq 95\%$ obrađenih uzoraka. Budući da prinosi u velikoj mjeri ovise o davatelju, individualni prinosi mogu varirati. Za pojedinačne davatelje sustav PAXgene Blood RNA System pruža visoko ponovljive prinose (slike 6 i 7, stranice 23 i 24) te ponovljivu reakciju RT-PCR (slike 8 i 9, stranice 28 i 29), što ga čini vrlo učinkovitim za klinička dijagnostička ispitivanja.

Slika 6 (stranica 23) označava sveukupnu ponovljivost rezultata sustava PAXgene Blood RNA System. Provedena su dodatna ispitivanja kako bi se prikazao utjecaj različitih serija kompleta PAXgene Blood RNA Kit i različitih rukovatelja na ponovljivost prinosa RNK i radnog učinka reakcije RT-PCR u stvarnom vremenu. Budući da su za ta ispitivanja upotrebljavani uzorci krvi iz poola umjesto pojedinačnih uzoraka iz epruveta PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), rezultati ne odražavaju ponovljivost sustava, uključujući promjene između pojedinačnih prikupljanja krvi, nego samo ponovljivost pripreme uzoraka (pogledajte sliku 7, stranica 24).

* Ukupno vrijeme trajanja protokola, uključujući unaprijed obavljeno rukovanje epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugiranja, ispiranje taloga i resuspendiranje taloga).



Slika 6. Ponovljivo pročišćavanje RNK. Učeterostručene uzorke krvi od 14 davatelja ručno je obradio svaki od 3 tehničara pojedinačno (A, B, C). Upotrijebljena su tri kompleta opreme te su svi uzorci koje je pripremio jedan tehničar obrađeni s pomoću iste opreme. **[A]**Prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije prinosa RNK po replikatima uzoraka istih davatelja, koje su obradili različiti tehničari. **[B]**Tri različita tehničara obradila su dvanaest replikata uzoraka krvi od svakoga od 14 davatelja. Prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije prinosa RNK po uzorcima od istih davatelja, koje su obradili svi tehničari. Za sve RNK uzorke, omjeri A_{260}/A_{280} imali su raspon od 1,8 do 2,2.



Slika 7. Ponovljivost prinosa RNK za različite rukovatelje i serije kompleta PAXgene Blood RNA Kit uz uporabu uzoraka krvi iz poola. Uzorci krvi od 30 različitih davatelja prikupljeni su u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 epruveta po davatelju, ukupno 360 epruveta). Sadržaj epruveta od 3 davatelja uključen je u pool i potom ponovno alikvotiran u 36 uzorka. Tih 36 uzoraka po poolu od 3 davatelja ručno su obradila 3 različita rukovatelja. Svaki je rukovatelj upotrijebio 3 različite serije kompleta PAXgene Blood RNA Kit za ekstrakciju i obradio učestvostručene uzorke iz svakog od 10 poolova davatelja. **[A]** Prinos RNK i standardna devijacija za svaku kombinaciju rukovatelj – serija. Učestvostručene uzorke krvi iz 10 poolova davatelja obradila su 3 različita rukovatelja (A, B, C) koristeći svaku od 3 serija kompleta (1, 2, 3). Prikazane su srednje vrijednosti (stupci) i standardne devijacije (trake s pogreškama) po učestvostručenom uzorku od istog davatelja za različite rukovatelje i različite serije kompleta. **[B]** CV prinosa RNK po poolu davatelja za sve kombinacije rukovatelj – serija (A, B, C; 1, 2, 3), izračunat iz srednje vrijednosti prinosa i standardne devijacije prinosa prikazan je na slici 7A.

Tablica 1A. Ponovljivost unutar svake serije i svakog korisnika za odabrane poolove davatelja (1, 6, 9, 10)

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

Tablica 1B. Ponovljivost unutar svakog korisnika i između svih serija za odabrane poolove davatelja (1, 6, 9, 10)

| Kombinacija podataka | Pool davatelja 1 5,1 x 10 ⁶ stanica/ml | | | Pool davatelja 6 6,5 x 10 ⁶ stanica/ml | | |
|------------------------|--|---------|--------|--|---------|--------|
| | Srednji prinos (µg) | SD (µg) | CV (%) | Srednji prinos (µg) | SD (µg) | CV (%) |
| Korisnik A, sve serije | 7,46 | 0,85 | 11 | 9,43 | 1,22 | 13 |
| Korisnik B, sve serije | 7,02 | 1,31 | 19 | 8,98 | 2,09 | 23 |
| Korisnik C, sve serije | 7,84 | 0,98 | 13 | 10,56 | 1,15 | 11 |
| Kombinacija podataka | Pool davatelja 9 8,4 x 10 ⁶ stanica/ml | | | Pool davatelja 10 10,2 x 10 ⁶ stanica/ml | | |
| | Srednji prinos (µg) | SD (µg) | CV (%) | Srednji prinos (µg) | SD (µg) | CV (%) |
| Korisnik A, sve serije | 7,54 | 0,72 | 10 | 7,81 | 0,82 | 11 |
| Korisnik B, sve serije | 7,48 | 1,50 | 20 | 8,26 | 1,54 | 19 |
| Korisnik C, sve serije | 10,02 | 1,34 | 13 | 10,89 | 1,10 | 10 |

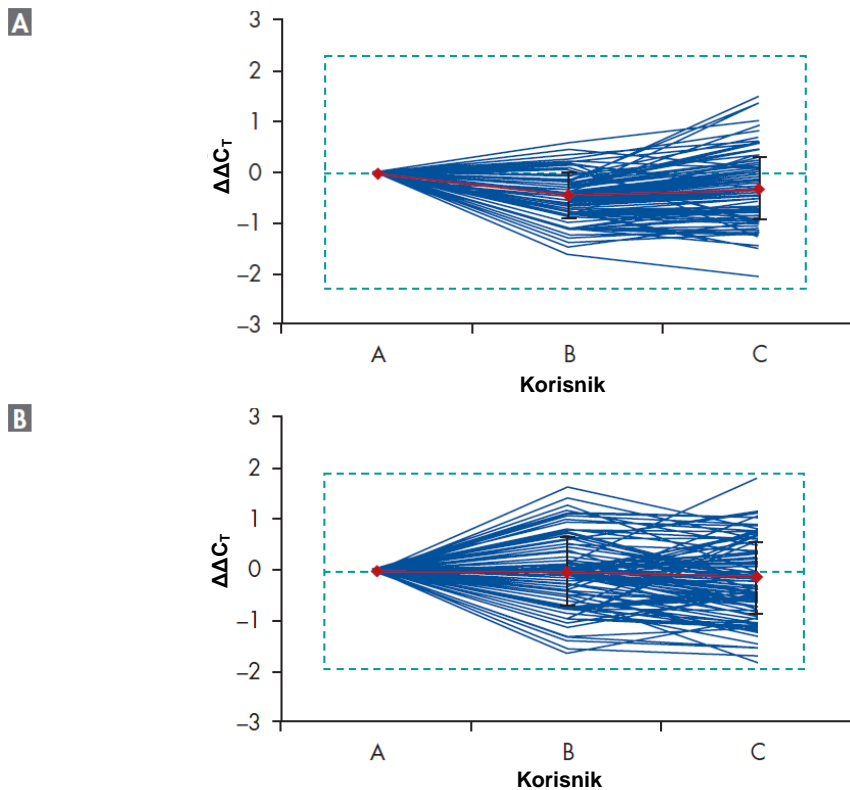
Tablica 1C. Ponovljivost unutar svake serije i između svih korisnika za odabrane poolove davatelja (1, 6, 9, 10)

| Kombinacija podataka | Pool davatelja 1 5,1 x 10 ⁶ stanica/ml | | | Pool davatelja 6 6,5 x 10 ⁶ stanica/ml | | |
|-------------------------|--|---------|--------|--|---------|--------|
| | Srednji prinos (µg) | SD (µg) | CV (%) | Srednji prinos (µg) | SD (µg) | CV (%) |
| Seriya 1, svi korisnici | 7,96 | 0,69 | 9 | 9,88 | 1,34 | 14 |
| Seriya 2, svi korisnici | 6,76 | 0,93 | 14 | 9,99 | 1,84 | 18 |
| Seriya 3, svi korisnici | 7,60 | 1,27 | 17 | 9,09 | 1,71 | 19 |
| Kombinacija podataka | Pool davatelja 9 8,4 x 10 ⁶ stanica/ml | | | Pool davatelja 10 10,2 x 10 ⁶ stanica/ml | | |
| | Srednji prinos (µg) | SD (µg) | CV (%) | Srednji prinos (µg) | SD (µg) | CV (%) |
| Seriya 1, svi korisnici | 8,83 | 1,63 | 19 | 9,02 | 1,27 | 14 |
| Seriya 2, svi korisnici | 7,75 | 1,36 | 18 | 8,73 | 2,31 | 26 |
| Seriya 3, svi korisnici | 8,46 | 1,99 | 24 | 9,20 | 1,80 | 20 |

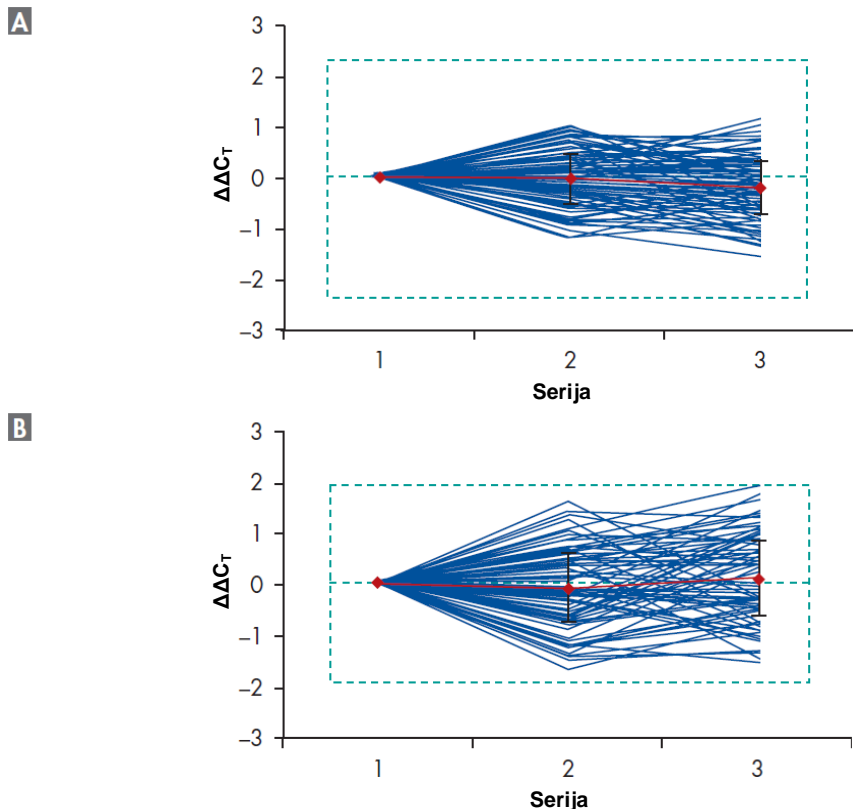
Tablica 1D. Ponovljivost između svih serija i svih korisnika za odabrane poolove davatelja (1, 6, 9, 10)

| Kombinacija podataka | Pool davatelja 1 5,1 x 10 ⁶ stanica/ml | | | Pool davatelja 6 6,5 x 10 ⁶ stanica/ml | | |
|-------------------------|--|---------|--------|--|---------|--------|
| | Srednji prinos (µg) | SD (µg) | CV (%) | Srednji prinos (µg) | SD (µg) | CV (%) |
| Seriya 1, svi korisnici | 7,44 | 1,09 | 15 | 9,66 | 1,65 | 17 |
| Kombinacija podataka | Pool davatelja 9 8,4 x 10 ⁶ stanica/ml | | | Pool davatelja 10 10,2 x 10 ⁶ stanica/ml | | |
| | Srednji prinos (µg) | SD (µg) | CV (%) | Srednji prinos (µg) | SD (µg) | CV (%) |
| Seriya 1, svi korisnici | 8,35 | 1,70 | 20 | 8,99 | 1,80 | 20 |

Detaljna analiza 4 reprezentativna poola davatelja. Poolovi su odabrani prema broju bijelih krvnih stanica i odražavaju visoke, srednje i niske vrijednosti normalnog raspona broja bijelih krvnih stanica ($4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$ leukocita/ml). Broj bijelih krvnih stanica predstavlja srednju vrijednost od 3 broja bijelih krvnih stanica od 3 davatelja po poolu davatelja.



Slika 8. Ponovljivost reakcije RT-PCR: između korisnika. Za reakciju RT-PCR u stvarnom vremenu upotrijebljena je RNK pročišćena u eksperimentu opisanom na slici 7. Relativne razine transkripta gena **[A]** FOS i **[B]** IL1B određene su dvostrukom reakcijom RT-PCR u stvarnom vremenu, uz uporabu 18S rRNK kao internog standarda. U crtane su vrijednosti za sve uzorke, u odnosu na vrijednosti za korisnika 1 (10 poolova davatelja x 3 serije kompleta x 4 replikata uzoraka = 120 skupova podataka za svaki gen), sa srednjim vrijednostima (crvene linije) i standardnim devijacijama (crne trake) za sve prikazane uzorke. Isprekidane linije označavaju ukupnu preciznost ispitivanja od ± 3 x (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).



Slika 9. Ponovljivost reakcije RT-PCR: između serija kompleta. Za reakciju RT-PCR u stvarnom vremenu upotrijebljena je RNK pročišćena u eksperimentu opisanom na slici 7. Relativne razine transkripta gena **[A]** FOS i **[B]** IL1B određene su dvostrukom reakcijom RT-PCR u stvarnom vremenu, uz uporabu 18S rRNK kao internog standarda. Učrtane su vrijednosti za sve uzorke, u odnosu na vrijednosti za seriju kompleta 1 (10 poolova davatelja x 3 korisnika x 4 replikata uzoraka = 120 skupova podataka za svaki gen), sa srednjim vrijednostima (crvene linije) i standardnim devijacijama (crne trake) za sve prikazane uzorke. Isprekidane linije označavaju ukupnu preciznost ispitivanja od $\pm 3 \times$ (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).

Tablica 2. Sažetak podataka o reakciji RT-PCR iz slika 8 i 9

| Sustav testa | Ispitivanje FOS/18S rRNK | | Ispitivanje IL1B/18S rRNK | |
|--|---|---------------------------------|---|---------------------------------|
| Usporedba podataka | Srednja vrijednost ($\Delta\Delta C_T$) | \pm SD ($\Delta\Delta C_T$) | Srednja vrijednost ($\Delta\Delta C_T$) | \pm SD ($\Delta\Delta C_T$) |
| Ponovljivost unutar svakog korisnika i između svih serija | | | | |
| Svi korisnici, serija 1 – serija 1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Svi korisnici, serija 1 – serija 2 | -0,03 | 0,48 | -0,07 | 0,66 |
| Svi korisnici, serija 1 – serija 3 | -0,21 | 0,52 | 0,11 | 0,71 |
| Ponovljivost unutar svakog korisnika i između svih serija | | | | |
| Sve serije, korisnik A – korisnik A | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Sve serije, korisnik A – korisnik B | -0,46 | 0,44 | -0,06 | 0,69 |
| Sve serije, korisnik A – korisnik C | -0,31 | 0,60 | -0,15 | 0,71 |

Korisnik: tehničar koji je proveo ispitivanje.

Serija: broj serije kompleta koji se koristi u ovom ispitivanju.

SD: standardna devijacija.

Srednje vrijednosti $\Delta\Delta C_T$ (N = 120) i standardne devijacije prikazane su za podatke prikazane na slikama 8 i 9.

Automatizirano pročišćavanje RNK

Priprema uzoraka automatizirana je uz uporabu standardnog instrumenta QIAcube® (kat. br. 9001882 [110 V], kat. br. 9001293 [230 V]; ne uključujući QIAcube Connect) te slijedi iste korake kao ručni postupak, što vam omogućuje da nastavite upotrebljavati komplet PAXgene Blood RNA Kit za pročišćavanje visokokvalitetne RNK. Pogledajte *Korisnički priručnik za QIAcube (QIAcube User Manual)* i www.qiagen.com/MyQIAcube za više informacija o instrumentu QIAcube.

Protokol automatiziranog pročišćavanja RNK sastoji se od 2 dijela (ili protokola), „PAXgene Blood RNA Part A” i „PAXgene Blood RNA Part B”, uz kratku ručnu intervenciju između 2 dijela (pogledajte sliku 10, stranica 31).

RNK u puferu za eluiranje (BR5). Rukovatelj prenosi epruvete za mikrocentrifugu (MCT) koje sadržavaju pročišćenu RNK u jedinicu termotresilice instrumenta QIAcube. Rukovatelj odabire i pokreće protokol „PAXgene Blood RNA Part B” iz izbornika, a instrument QIAcube provodi denaturaciju toplinom.

Prosječno vrijeme pripreme uzoraka (na temelju podataka iz 12 procesa pripreme uzoraka) je 151 minuta*, sa značajno manje vremena rada rukama u usporedbi s ručnim protokolom.

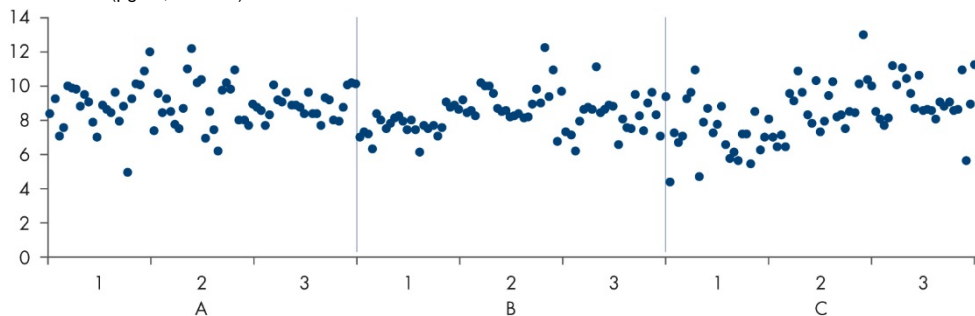
Prinosi RNK iz 2,5 ml zdrave ljudske pune krvi su $\geq 3 \mu\text{g}$ za $\geq 95 \%$ obrađenih uzoraka. Slika 11 (stranica 33) prikazuje prinose RNK iz ukupno 216 uzoraka pripremljenih s pomoću automatiziranog protokola s 3 serije kompleta koje su obradila 3 rukovatelja. Budući da su za ta ispitivanja upotrebljavani uzorci krvi iz poola umjesto pojedinačnih uzoraka iz epruveta PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), rezultati ne odražavaju prinos RNK očekivan iz uzoraka dobivenih jednostrukim pojedinačnim prikupljanjem krvi. Budući da prinosi u velikoj mjeri ovise o davatelju, pojedinačni prinosi mogu varirati (slika 11, stranica 33).

Barem 95 % uzoraka ne pokazuje inhibiciju u reakciji RT-PCR uz iskorištenje do 30 % eluata. Prilikom uporabe automatiziranog protokola križna kontaminacija između uzoraka ne može se detektirati, što je izmjereno kvantitativnom reakcijom RT-PCR u stvarnom vremenu sekvenci transkripata gena ABL1 i FOS u uzorcima negativnima na RNK (voda) u usporedbi s uzorcima pozitivnima na RNK (ljudska puna krv) u istom procesu.

RNK pročišćena sustavom PAXgene Blood RNA System i automatiziranim protokolom je čista, što je dokazano nedostatkom inhibicije reakcije RT-PCR (pogledajte sliku 11, stranica 33) i vrijednostima A_{260}/A_{280} između 1,8 i 2,2. Genomska DNK je prisutna u količini od $\leq 1 \%$ (w/w) u $\geq 95 \%$ svih uzoraka, što je izmjereno kvantitativnom reakcijom PCR u stvarnom vremenu sekvence gena beta-aktin. Slike 12 i 13 (stranice 33 i 34) prikazuju vrijednosti A_{260}/A_{280} i relativnu genomsku DNK iz ukupno 216 uzoraka pripremljenih s pomoću automatiziranog protokola s 3 serije kompleta koje su obradila 3 rukovatelja.

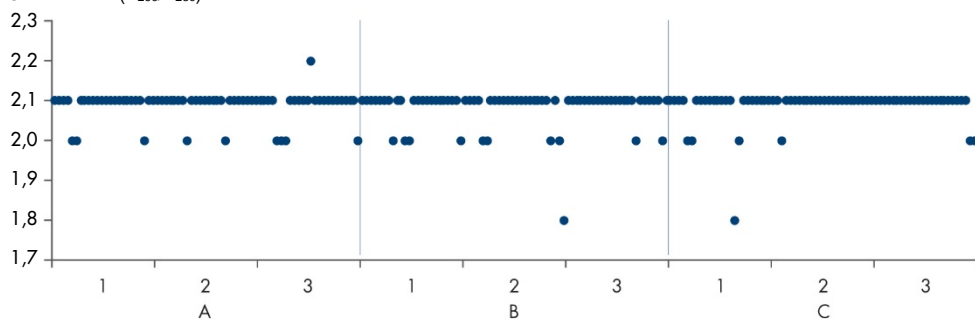
* Ukupno vrijeme trajanja protokola, uključujući unaprijed obavljeno rukovanje epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugiranje, ispiranje taloga i resuspendiranje taloga).

Prinos RNK (μg / 2,5 ml krvi)

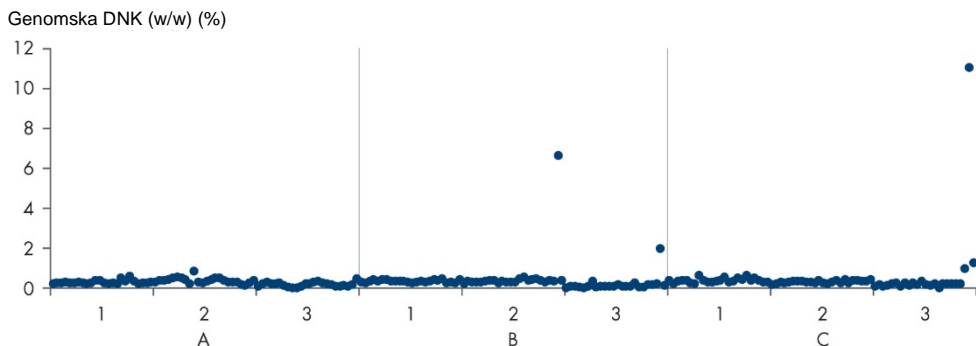


Slika 11. Prinos RNK: automatizirana obrada. Uzorci krvi od 36 različitih davatelja prikupljeni su u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 6 epruveta po davatelju, ukupno 216 epruveta). Sadržaj epruveta od 6 davatelja uključen je u pool i potom ponovno alikvotiran u 36 uzorka. Tih 36 uzoraka po poolu od 6 davatelja obradila su 3 različita rukovatelja (A, B, C). Svaki je rukovatelj upotrijebio 3 različite serije (1, 2, 3) kompleta PAXgene Blood RNA Kit za automatiziranu ekstrakciju i obradio učetverostručene uzorke iz svakog od 6 poolova davatelja. Za svaku kombinaciju rukovatelj – serija prikazani su prinosi RNK svih individualnih uzoraka.

Čistoća RNK (A_{260}/A_{280})

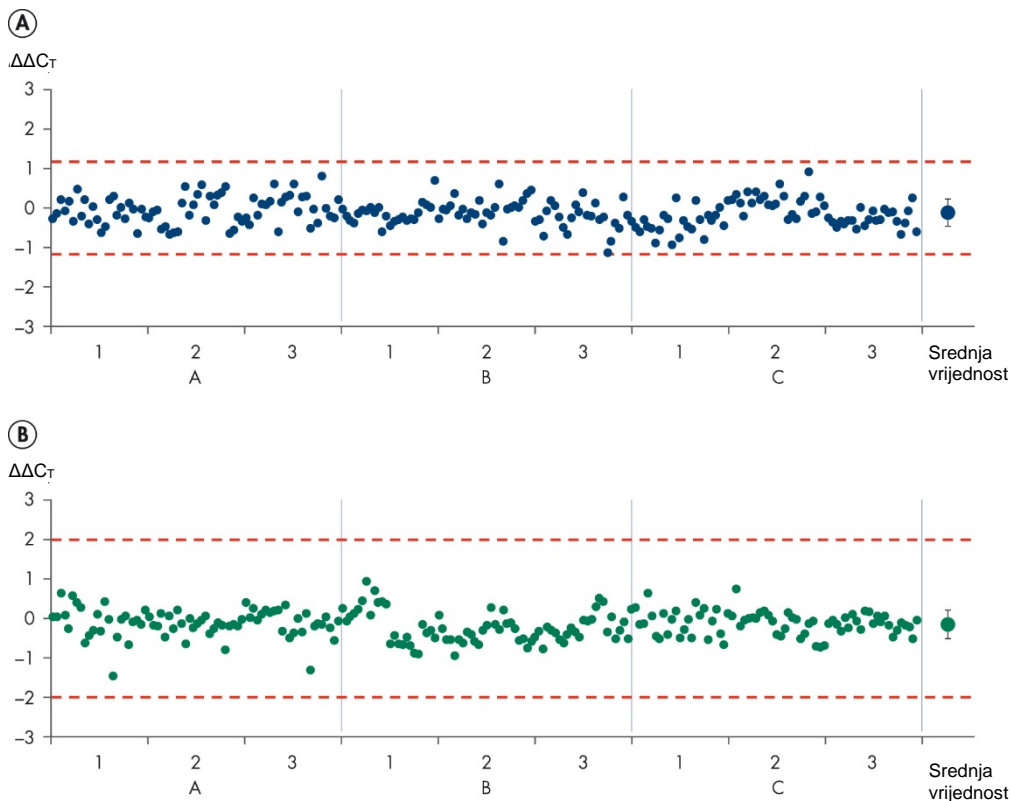


Slika 12. Čistoća RNK (vrijednosti A_{260}/A_{280}): automatizirana obrada. RNK su pročistila 3 različita rukovatelja (A, B, C) koristeći 3 različite serije (1, 2, 3) kompleta PAXgene Blood RNA Kit u eksperimentu opisanom u slici 11. Za svaku kombinaciju rukovatelj – serija prikazane su vrijednosti A_{260}/A_{280} za sve pojedinačne uzorke.



Slika 13. Čistoća RNK (% kontaminacije genomskom DNK): automatizirana obrada. RNK su pročistila 3 različita rukovatelja (A, B, C) koristeći 3 različite serije (1, 2, 3) kompleta PAXgene Blood RNA Kit u eksperimentu opisanom u slici 11. Za svaku kombinaciju rukovatelj – serija prikazane su količine genomske DNK (w/w) u svim pojedinačnim uzorcima.

Automatizirani protokol pročišćavanja RNK s pomoću sustava PAXgene Blood RNA System pruža visoko ponovljive rezultate reakcije RT-PCR, kako je prikazano na slici 14 (stranica 35), što ga čini vrlo učinkovitim za klinička dijagnostička ispitivanja.



Slika 14. Ponovljivost reakcije RT-PCR: između automatiziranih i ručnih protokola. RNK su pročistila 3 različita rukovatelja (A, B, C) koristeći 3 različite serije (1, 2, 3) kompleta PAXgene Blood RNA Kit s pomoću automatiziranog protokola u eksperimentu opisanom u slici 11. Usporedno s time, RNK je pročišćena iz odgovarajućih epruveta s replikatima uzoraka s pomoću ručnog protokola. Relativne razine transkripta gena **[A]** FOS i **[B]** IL1B određene su dvostrukom reakcijom RT-PCR u stvarnom vremenu, uz uporabu 18S rRNK kao internog standarda. Moguće razlike u razinama transkripata između RNK pripremljene iz uparenih uzoraka krvi uz uporabu oba protokola ekstrakcije (automatiziranog i ručnog protokola) izračunate su metodom $\Delta\Delta C_T$. Pojedinačne vrijednosti $\Delta\Delta C_T$ za sve parove uzoraka (4 replikata uzoraka x 6 poolova davatelja x 3 serije kompleta x 3 rukovatelja = 216 parova za svaki gen) ucrtane su kao jednostruke točke sa srednjim vrijednostima (veće točke) i standardnim devijacijama (crne trake) za sve prikazane uzorke. Isprekidane linije označavaju ukupnu preciznost ispitivanja od $\pm 3 \times$ (FOS: 1,16 C_T ; IL1B: 1,98 C_T ; različite preciznosti ispitivanja u usporedbi sa slikama 1 – 4, 8 i 9 zbog različitih verzija ispitivanja).

Oprema i reagensi koje isporučuje korisnik

Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (SDS) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

Za sve protokole

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; kat. br. 762165)
- Etanol (96 – 100-postotni, razred čistoće p.a.)
- Pipete* (10 µl – 4 ml)
- Sterilni vrhovi pipeta, s barijerom protiv aerosola, bez RNaze[†]
- Menzura[‡]
- Centrifuga* sposobna doseći 3000 – 5000 x g te opremljena rotorom s njišućim vjedrima za postavljanje epruveta PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Vorteks miješalica*
- Zdrobljeni led
- Trajni marker za označavanje

Za ručni protokol

- Mikrocentrifuga s varijabilnom brzinom sposobna doseći raspon od najmanje 1000 – 8000 x g, iako su primjenjive i niže i više gravitacijske sile (pogledajte korake protokola za više informacija) te opremljena rotorom za epruvete za mikrocentrifugu od 2 ml

* Provjerite jesu li instrumenti redovito pregledavani, održavani i kalibrirani prema preporuci proizvođača.

[†] Provjerite jeste li upoznati sa smjernicama o rukovanju RNK (Dodatak A, stranica 64).

[‡] Za dodavanje etanola u koncentrat pufera BR4.

- Tresilica-inkubator* sposobna za inkubaciju pri 55 °C i 65 °C i trešnju pri ≥400 o/min, ne prelazeći 1400 o/min (primjerice, termomiješalica Compact, Eppendorf® ili slična)

Za automatizirani protokol

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

Potrošni materijali za QIAcube

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

Dodatna oprema za QIAcube

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

* Provjerite jesu li instrumenti redovito pregledavani, održavani i kalibrirani prema preporuci proizvođača.

[†] Uključen i u Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, kat. br. 990395)

Važne napomene

Uporaba QIAcube

Provjerite jeste li upoznati s radom instrumenta QIAcube. Pročitajte *Korisnički priručnik za QIAcube* i sve dodatne informacije isporučene s instrumentom QIAcube, obrađujući posebnu pozornost na sigurnosne informacije, prije početka uporabe automatiziranih protokola s pomoću PAXgene Blood RNA.

Pokretanje instrumenta QIAcube

Zatvorite vratašca instrumenta QIAcube te uključite instrument QIAcube sklopkom za napajanje (vidi sliku 15, stranica 39).

Oglašava se zvučni signal i pojavljuje se zaslon pokretanja. Instrument automatski izvodi početna testiranja.

Instaliranje protokola na instrument QIAcube

Prvotno instaliranje protokola potrebno je prije nego što se može izvesti prvi proces pripreme RNK na instrumentu QIAcube. Instalirajte oba protokola „PAXgene Blood RNA Part A” i „PAXgene Blood RNA Part B”.

Protokolima je moguće pristupiti na **www.qiagen.com/MyQIAcube** i moraju se preuzeti na USB štapić isporučen uz instrument QIAcube te prenijeti na instrument QIAcube putem USB priključka.

USB priključak, koji se nalazi iza zaštitne ploče (pogledajte sliku 15, stranica 39), omogućava priključivanje instrumenta QIAcube na USB štapić (isporučen s instrumentom QIAcube). Podatkovne datoteke, primjerice datoteke zapisa ili datoteke izvješća, također se mogu prenositi s instrumenta QIAcube na USB štapić putem USB priključka.



USB priključak namijenjen je samo za uporabu uz USB štapić koji isporučuje društvo QIAGEN. Ne priključujte druge uređaje na ovaj priključak.



Ne uklanjajte USB štapić dok je u tijeku preuzimanje protokola ili prijenos podatkovnih datoteka ili tijekom izvođenja protokola.



Slika 15. Prednji prikaz instrumenta QIAcube.



Dodirni zaslon



Vratašca



Serijski priključak RS232 iza zaštitne ploče (smiju ga upotrebljavati samo stručnjaci za servis instrumenata društva QIAGEN)



USB priključak iza zaštitne ploče



Sklopka za napajanje



Ladica za otpad

Punjenje instrumenta QIAcube

Radi uštede vremena punjenje se može izvesti tijekom jednog ili oba koraka centrifuge u trajanju od 10 minuta (koraci 3 i 5) u „Protokol: automatizirano pročišćavanje ukupne RNK iz ljudske pune krvi prikupljene u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)”, stranica 56.

Bočice za reagense

Prije svakog procesa na instrumentu QIAcube pažljivo napunite 4 bočice za reagense reagensima navedenima u tablici 3 do maksimalne razine indikatora ili, ako to nije moguće, do razine koju dopuštaju volumeni pufera isporučeni u kompletu PAXgene Blood RNA Kit. Jasno označite bočice i poklopce nazivima pufera i postavite napunjene bočice za reagense u odgovarajuće položaje na nosaču za bočice za reagense. Postavite nosač na radnu površinu instrumenta QIAcube kako je prikazano (slike 16 i 17, stranice 41 i 42).



Isporučeni volumen pufera BR2 neće napuniti bočicu za reagense do razine indikatora. Puferi BR3 i BR4 možda neće napuniti bočicu do razine indikatora nakon obrade više uzoraka u prethodnim procesima.



Pobrinite se da ste uklonili poklopce s bočica prije postavljanja na radnu površinu.

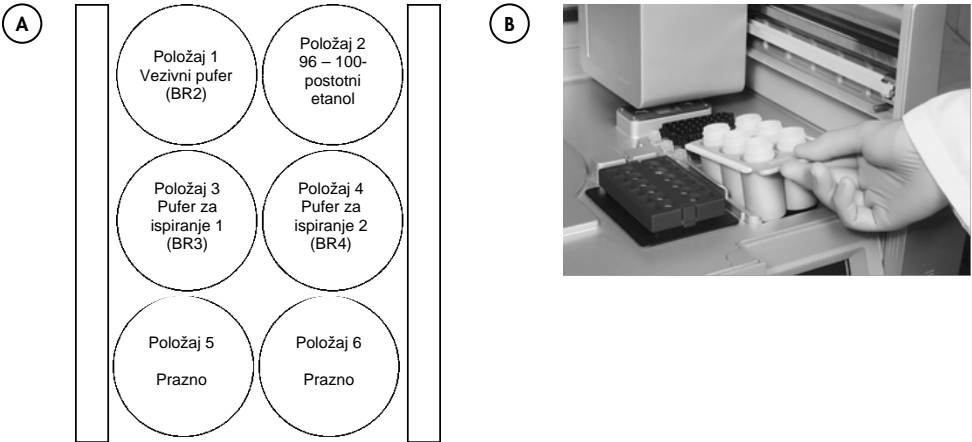


Volumeni pufera isporučeni u kompletu PAXgene Blood RNA Kit (50) dovoljni su za najviše 7 procesa pripreme RNK na instrumentu QIAcube, s 2 do 12 uzoraka po procesu. Proces s nižim brojem uzoraka općenito se trebaju izbjegavati kako bi se moglo obraditi ukupno 50 uzoraka po kompletu uz najviše 7 procesa pripreme RNK. Više od 7 procesa pripreme RNK može dovesti do nedovoljnih volumena pufera za obradu posljednjih uzoraka.

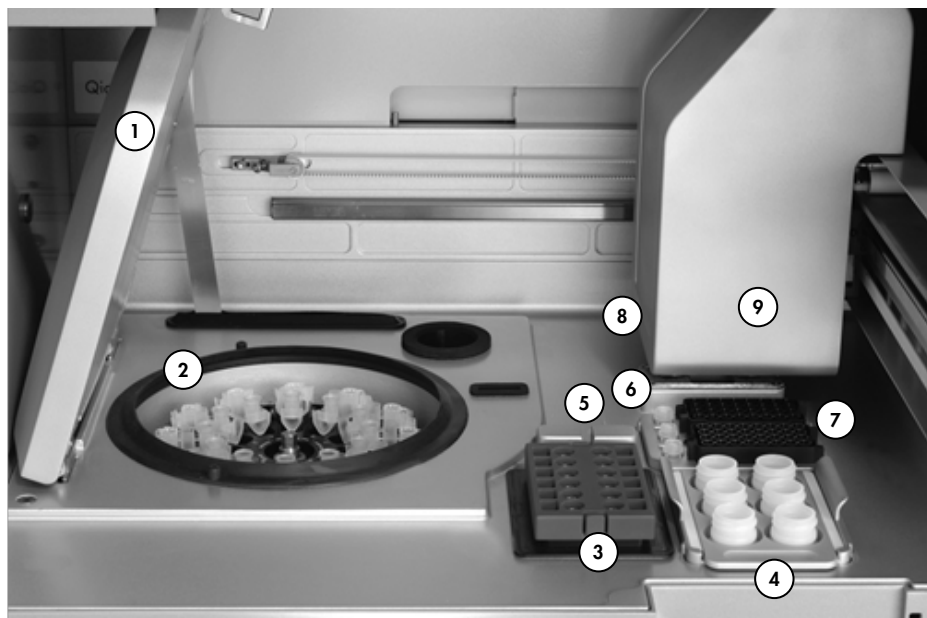
Tablica 3. Položaji na nosaču za bočice za reagense

| Položaj | Reagens |
|---------|-----------------------------|
| 1 | Vezivni pufer (BR2) |
| 2 | 96 – 100-postotni etanol |
| 3 | Pufer za ispiranje 1 (BR3) |
| 4 | Pufer za ispiranje 2 (BR4)* |
| 5 | – (ostaviti prazno) |
| 6 | – (ostaviti prazno) |

* Pufer za ispiranje 2 (BR4) isporučuje se kao koncentrat. Prije prve uporabe dodajte 4 volumena etanola (96 – 100-postotni, razred čistoće p.a.), kako je naznačeno na bočici, za dobivanje radne otopine.



Slika 16. Punjenje nosača za bočice za reagense. [A] Shema položaja i sadržaja bočica u nosaču za bočice za reagense. [B] Postavljanje nosača u instrument QIAcube.



Slika 17. Unutarnji prikaz instrumenta QIAcube.

- | | | | |
|---|-----------------------------|---|--|
| 1 | Poklopac centrifuge | 6 | Utori za epruvete za mikrocentrifugu |
| 2 | Centrifuga | 7 | Nosači vrhova |
| 3 | Tresilica | 8 | Utori za zbrinjavanje za vrhove i kolone |
| 4 | Nosač za bočice za reagense | 9 | Robotska ruka |
| 5 | Senzor za vrhove | | |

Spin kolone (PRC, PSC), epruvete za mikrocentrifugu (MCT) i plastični pribor za instrument QIAcube

Postavite 2 nosača vrhova ispunjena vrhovima s filtrom od 1000 µl na instrument QIAcube (pogledajte sliku 17, stranica 42). Ponovno napunite nosače vrhovima kada je to potrebno.



Upotrebljavajte samo vrhove s filtrom od 1000 µl koji su namijenjeni uporabi s instrumentom QIAcube.

Označite adaptere rotora i epruvete za mikrocentrifugu (MCT) za svaki uzorak s pomoću trajnog markera. Otvorite spin kolone PAXgene Shredder (PSC) za uporabu te potpuno odrežite poklopce škarama (pogledajte sliku 18, stranica 44).



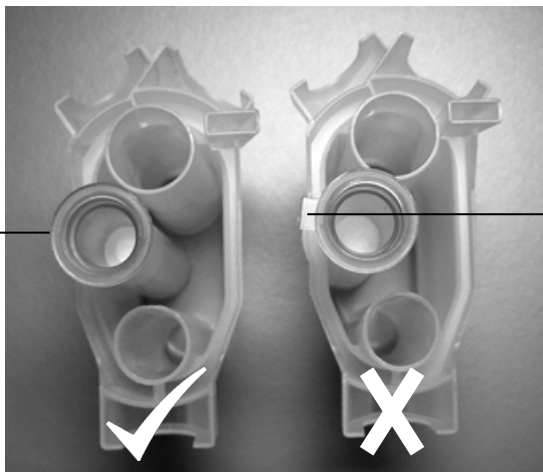
Kako biste omogućili propisan rad robotske hvataljke instrumenta QIAcube, potpuno odstranite (odrežite) poklopce i sve plastične dijelove koji povezuju poklopac sa spin kolonama PAXgene Shredder (PSC; pogledajte sliku 16). U suprotnom, robotska hvataljka ne može propisno uhvatiti spin kolone (PSC, PRC).

Postavite spin kolonu PAXgene RNA (PRC), spin kolonu PAXgene Shredder (PSC, bez poklopca) i označenu epruvetu za mikrocentrifugu (MCT) u odgovarajuće položaje u svakom označenom adapteru rotora, kako je prikazano u tablici 4 i na slici 19 (stranica 44).



Pobrinite se da su poklopci spin kolone (PRC) i epruvete za mikrocentrifugu (MCT) pogurnuti sve do dna utora na rubu adaptera rotora jer će u se u suprotnom poklopci odlomiti tijekom centrifugiranja.

Poklopac kolone ispravno uklonjen



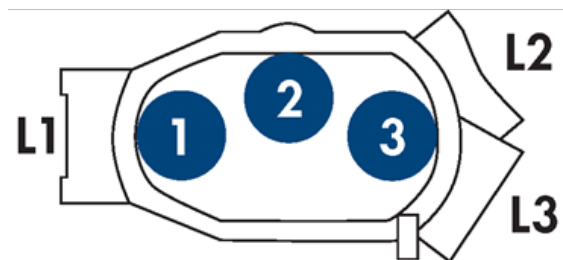
Poklopac kolone neispravno uklonjen; dio poklopca i dalje pričvršćen

Slika 18. Postavljanje spin kolone PAXgene Shredder (PSC). Spin kolona PAXgene Shredder (PSC) postavljena je u srednji položaj adaptera rotora. Odrežite poklopac prije postavljanja kolone (PSC).

Tablica 4. Laboratorijski proizvodi u adapteru rotora

| Položaj | Reagens | Položaj poklopca |
|---------|---|------------------|
| 1 | Spin kolona PAXgene RNA (crvena, PRC) | L1 |
| 2 | Spin kolona PAXgene Shredder (ljubičasta, PSC) (odrežite poklopac prije postavljanja u adapter rotora) | – |
| 3 | Epruveta za mikrocentrifugu (MCT)* | L3 |

* Upotrijebite epruvete za mikrocentrifugu (1,5 ml) uključene u komplet PAXgene Blood RNA Kit.



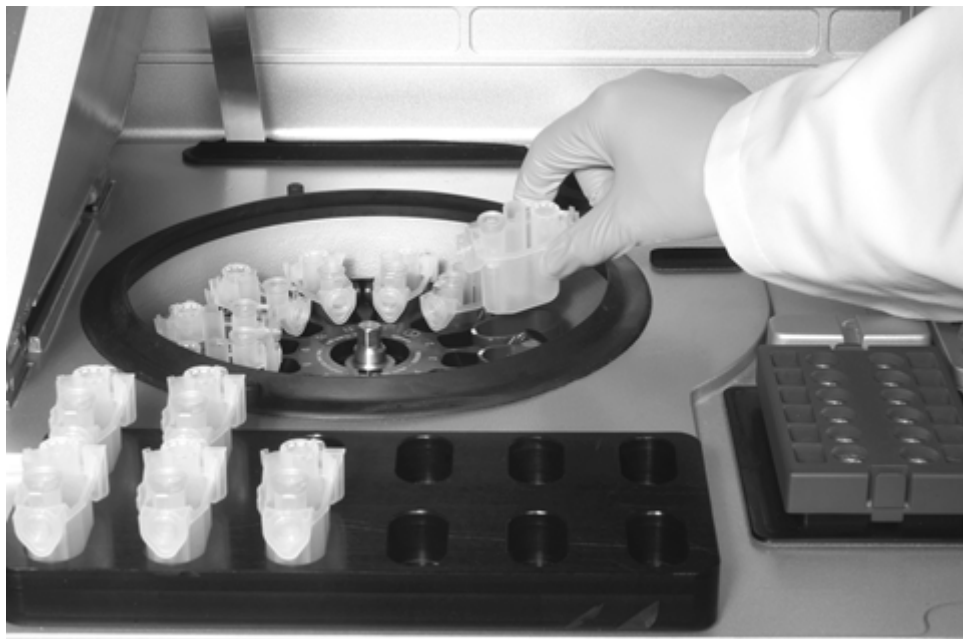
Slika 19. Položaji na adapteru rotora. Adapter rotora ima tri položaja za epruvete (1 – 3) i tri položaja za poklopce (L1 – L3).

Punjenje centrifuge

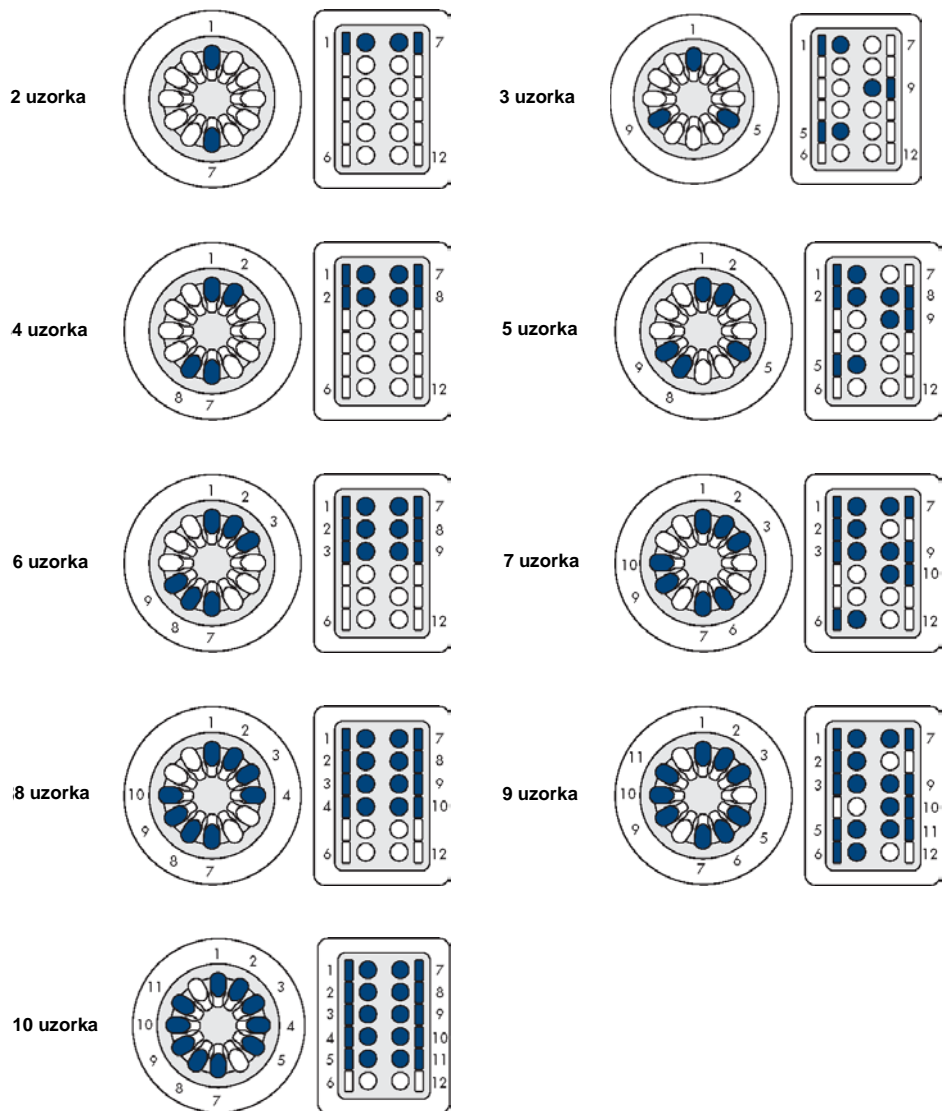
Postavite sastavljene adaptore rotora u vjedra centrifuge kako je prikazano na slici 20 u nastavku.



Ako obrađujete manje od 12 uzoraka, pobrinite se da rasporedite uzorke kako bi rotor centrifuge bio ravnomjerno opterećen radijalno (slika 21, stranica 46). Sva vjedra centrifuge moraju biti montirana prije pokretanja procesa protokola, čak i u slučaju kada se obrađuje manje od 12 uzoraka. Jedan ili 11 uzoraka ne mogu se obrađivati.



Slika 20. Punjenje centrifuge. Postavite sastavljene adaptore rotora u vjedra centrifuge.



Slika 21. Punjenje centrifuge i tresilice. Prikazani su položaji centrifuge i tresilice za obradu od dva (2) do deset (10) uzoraka. Jedan ili 11 uzoraka ne mogu se obrađivati.

Epruvete za obradu (PT)

Uklonite epruvete za obradu (PT) preostale u utorima za epruvete za mikrocentrifugu iz prethodnih procesa (pogledajte sliku 17, stranica 42). Napunite 3 epruvete za obradu (PT) količinom reagensa navedenom u tablici 5 prema broju uzoraka u procesu.

Za mješavinu za inkubaciju DNaze I, pipetirajte naznačeni volumen pufera za razgradnju DNK (RDD) u epruvetu za obradu (PT) i dodajte naznačeni volumen temeljne standardne otopine DNaze I (RNFD). Miješajte nježno pipetirajući cijelu mješavinu gore i dolje 3 puta uz uporabu vrha pipete od 1000 µl.

Upotrijebite epruvete za obradu (PT) od 2 ml uključene u komplet PAXgene Blood RNA Kit. Jasno označite epruvete (PT) nazivima reagensa i postavite ih u odgovarajući položaj na utorima za epruvete za mikrocentrifugu, kako je naznačeno u tablici 6 (stranica 48).



DNaza I (RNFD) je posebno osjetljiva na fizičku denaturaciju. Miješajte samo pipetiranjem, s pomoću širokih vrhova pipete, kako bi se smanjila fragmentacija. Ne miješajte vorteks miješalicom.



Pipetirajte samo potreban volumen, kako je naznačeno u tablici 5.

Tablica 5. Volumen reagensa potreban u epruvetama za obradu za utore epruveta za mikrocentrifugu

| Broj uzoraka | Volumen reagensa za naznačeni broj uzoraka (µl) | | |
|--------------|---|------------------------------------|--------------------------|
| | Proteinaza K (PK) | Mješavina za inkubaciju DNaze I | Pufer za eluiranje (BR5) |
| 2 | 126 | 187 (23 DNaze I + 164 Buffer RDD) | 313 |
| 3 | 170 | 261 (33 DNaze I + 228 Buffer RDD) | 399 |
| 4 | 213 | 334 (42 DNaze I + 292 Buffer RDD) | 486 |
| 5 | 256 | 407 (51 DNaze I + 356 Buffer RDD) | 572 |
| 6 | 299 | 481 (60 DNaze I + 421 Buffer RDD) | 658 |
| 7 | 342 | 554 (69 DNaze I + 485 Buffer RDD) | 745 |
| 8 | 386 | 627 (78 DNaze I + 549 Buffer RDD) | 831 |
| 9 | 429 | 701 (88 DNaze I + 613 Buffer RDD) | 918 |
| 10 | 472 | 775 (97 DNaze I + 678 Buffer RDD) | 1004 |
| 12 | 558 | 921 (115 DNaze I + 806 Buffer RDD) | 1177 |

Tablica 6. Utori za epruvete za mikrocentrifugu

| | Položaj | | |
|----------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| | A | B | C |
| Područje | Proteinaza K (PK) | Mješavina za inkubaciju DNaze I | Pufer za eluiranje (BR5) |
| Posuda | Epruveta za obradu (PT)* | Epruveta za obradu (PT)* | Epruveta za obradu (PT)* |

* Upotrijebite epruvete za obradu (PT) od 2 ml uključene u komplet PAXgene Blood RNA Kit.

Protokol: ručno pročišćavanje ukupne RNK iz ljudske pune krvi prikupljene u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Važne točke prije započinjanja

- Provjerite je li kutija kompleta netaknuta i neoštećena te potvrdite da puferi nisu iscurili. Ne upotrebljavajte oštećeni komplet.
- Prilikom uporabe pipete provjerite je li pipeta postavljena na točan volumen te je li tekućina pažljivo i potpuno aspirirana i dispenzirana.
- Kako biste izbjegli prenošenje uzoraka u pogrešnu epruvetu ili spin kolonu, pobrinite se da su sve epruvete i spin kolone propisno označene s pomoću trajnog markera. Označite poklopac i tijelo svake epruvete (PT, MCT). Za spin kolone, označite tijelo epruvete za obradu (PT). Zatvorite svaku epruvetu ili spin kolonu nakon što se u njih prenese tekućina.
- Prolijevanja uzoraka i pufera tijekom postupka mogu smanjiti prinos i čistoću RNK.
- Osim ako je drugačije naznačeno, svi koraci u ovom protokolu, uključujući korake centrifugiranja, trebaju se provesti pri sobnoj temperaturi (15 – 25 °C).

Zbog osjetljivosti tehnologija amplifikacije nukleinske kiseline, potrebno je poduzeti sljedeće mjere opreza prilikom rukovanja uzorcima kako bi se izbjegla križna kontaminacija:

- Pažljivo pipetirajte uzorak u spin kolonu (PRC, PSC) bez navlaživanja ruba kolone.
- Uvijek promijenite vrhove pipeta između dva prijenosa tekućina. Upotrijebite vrhove pipeta s barijerom protiv aerosola.
- Izbjegnite dodirivanje membrane spin kolone (PRC, PSC) vrhom pipete.

- Nakon miješanja vorteks miješalicom ili zagrijavanja epruvete za mikrocentrifugu (MCT) kratko je centrifugirajte kako biste uklonili kapljice s unutrašnje strane poklopca.
- Tijekom cijelog postupka nosite rukavice. U slučaju dodira između rukavica i uzorka, odmah promijenite rukavice.
- Zatvorite spin kolonu (PRC, PSC) prije nego što je postavite u mikrocentrifugu. Centrifugirajte prema opisanom u postupku.
- Otvorite samo jednu po jednu spin kolonu (PRC, PSC) i izbjegavajte stvaranje aerosola.
- Za učinkovitu paralelnu obradu više uzoraka, napunite nosač epruvetama za obradu (PT) u koje se spin kolone (PRC, PSC) mogu prenijeti nakon centrifugiranja. Zbrinite iskorištene epruvete za obradu (PT) koje sadržavaju nevezanu frakciju te postavite nove epruvete za obradu (PT) koje sadržavaju spin kolone (PRC, PSC) izravno u mikrocentrifugu.

Postupci koje treba napraviti prije započinjanja

- Krv se mora prikupiti u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) prema uputama u *Priručniku za PAXgene Blood RNA Tube*. Ako je potrebno, pogledajte Dodatak C (stranica 67) za preporuke o rukovanju epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Pobrinite se da su epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkubirane najmanje 2 sata pri sobnoj temperaturi nakon prikupljanja krvi kako bi se osigurala potpuna liza krvnih stanica. Inkubacija epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT) preko noći može povećati prinose. Ako je epruveta PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pohranjena na temperaturama od 2 – 8 °C, -20 °C ili -70 °C nakon prikupljanja krvi, prvo joj prilagodite temperaturu sobnoj temperaturi i potom je pohranite na sobnoj temperaturi 2 sata prije početka postupka.
- Pročitajte sigurnosne informacije na stranici 11.
- Pročitajte smjernice o rukovanju s RNK (Dodatak A, stranica 65).
- Pobrinite se da su instrumenti, poput pipeta i tresilice-inkubatora, redovito pregledavani i kalibrirani u skladu s preporukama proizvođača.

- Tresilica-inkubator potreban je u koracima 5 i 20. Postavite temperaturu tresilice-inkubatora na 55 °C.
- Vezivni pufer (BR2) može u pohrani stvoriti precipitat. Ako je potrebno, zagrijte ga na 37 °C kako bi se precipitat razgradio.
- Pufer za ispiranje 2 (BR4) isporučuje se kao koncentrat. Prije prve uporabe dodajte 4 volumena etanola (96 – 100-postotni, razred čistoće p.a.), kako je naznačeno na bočici, za dobivanje radne otopine.
- Ako prvi puta upotrebljavate RNase-Free DNase Set, pripremite temeljnu standardnu otopinu DNaze I. Otopite krutu DNazu I (RNFD; 1500 Kunitz jedinica)* u 550 µl pufera za resuspendiranje DNaze (DRB) koji je isporučen s kompletom. Obratite pažnju na to da se nijedan dio DNaze (RNFD) ne izgubi prilikom otvaranja bočice. Rekonstituiranu DNazu I (RNFD) nemojte miješati vorteks miješalicom. DNaza I je posebno osjetljiva na fizičku denaturaciju. Miješanje se mora obavljati samo nježnim preokretanjem epruvete.
- Prema trenutačno poznatim podacima rekonstituirana DNaza I (RNFD) može se pohraniti pri 2 – 8 °C do 6 tjedana. Za dugotrajnu pohranu DNaze I (RNFD) uklonite temeljnu standardnu otopinu iz staklene bočice, podijelite je u jednokratne alikvote (upotrijebite epruvete za mikrocentrifugu [MCT] od 1,5 ml isporučene s kompletom; dovoljno ih je za 5 alikvota) i pohranite ih pri -20 °C do 9 mjeseci. Odmrznuti alikvoti mogu se pohraniti pri 2 – 8 °C do 6 tjedana. Nakon odmrzavanja nemojte ponovno zamrzavati alikvote.
- Prilikom rekonstituiranja i alikvotiranja DNaze I (RNFD) pobrinite se da slijedite smjernice za rukovanje s RNK (Dodatak A, stranica 65).

* Kunitz jedinice se upotrebljavaju za mjerenje DNaze I te se definiraju kao količina DNaze I koja uzrokuje povećanje u A_{260} od 0,001 po minuti po mililitru pri 25 °C, pH 5,0, s visoko polimeriziranom DNK kao supstratom (Kunitz, M. (1950.) J. Gen. Physiol. **33**, 349 i 363).

Postupak

1. Centrifugirajte epruvetu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tijekom 10 minuta pri 3000 – 5000 x g s pomoću rotora s njišućim vjedrima.



Pobrinite se da je uzorak krvi inkubiran u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tijekom najmanje 2 sata pri sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) kako bi se postigla potpuna liza krvnih stanica.



Rotor mora sadržavati adaptere za epruvete sa zaobljenim dnom. Ako se upotrebljavaju druge vrste adaptera za epruvete, epruvete mogu puknuti tijekom centrifugiranja.

2. Uklonite supernatant pretakanjem ili pipetiranjem. Dodajte 4 ml vode bez RNaze (RNFW) u talog i zatvorite epruvetu novim sekundarnim poklopcem BD Hemogard (isporučen s kompletom).

Ako je supernatant pretočen, pazite da ne poremetite talog te osušite rub epruvete čistim papirnatim ručnikom.

3. Miješajte vorteks miješalicom dok se talog vidljivo ne razgradi te centrifugirajte 10 minuta pri 3000 – 5000 x g s pomoću rotora s njišućim vjedrima. Uklonite i zbrinite cijeli supernatant.

Mali ostaci materijala preostali u supernatantu nakon miješanja vorteks miješalicom, no prije centrifugiranja, neće utjecati na postupak.



Nepotpuno uklanjanje supernatanta inhibirat će lizu i razrijediti lizat te stoga utjecati na uvjete za vezanje RNK na membranu PAXgene.

4. Dodajte 350 µl pufera za resuspendiranje (BR1) i miješajte vorteks miješalicom dok se talog vidljivo ne razgradi.
5. Pipetirajte uzorak u epruvetu za mikrocentrifugu (MCT) od 1,5 ml. Dodajte 300 µl vezivnog pufera (BR2) i 40 µl proteinaze K (PK). Miješajte vorteks miješalicom 5 sekundi i inkubirajte 10 minuta pri 55 °C koristeći tresilicu-inkubator pri 400 – 1400 o/min. Nakon inkubacije postavite temperaturu tresilice-inkubatora na 65 °C (za korak 20).



Ne miješajte vezivni pufer (BR2) i proteinazu K (PK) prije dodavanja u uzorak.

6. Pipetirajte lizat izravno u spin kolonu PAXgene Shredder (PSC; ljubičasta) postavljenu u epruvetu za obradu (PT) od 2 ml i centrifugirajte 3 minute pri najvećoj brzini (ne prelazeći 20.000 x g).



Pažljivo pipetirajte lizat u spin kolonu (PSC) i vizualno pregledajte je li lizat potpuno prenesen u spin kolonu (PSC).

Kako biste spriječili oštećenja kolona (PSC) i epruveta (PT), ne premašujte 20.000 x g.



Neki uzorci mogu proći kroz spin kolonu PAXgene Shredder (PSC) bez centrifugiranja. To se događa zbog niske viskoznosti nekih uzoraka i ne smije se smatrati znakom kvara proizvoda.

7. Pažljivo prenesite cijeli supernatant nevezane frakcije u novu epruvetu za mikrocentrifugu (MCT) od 1,5 ml, a da pritom ne poremetite talog u epruveti za obradu.
8. Dodajte 350 µl etanola (96 – 100-postotnog, razred čistoće p. a.). Miješajte vorteks miješalicom i kratko centrifugirajte (1 – 2 sekunde pri 500 – 1000 x g) kako bi se uklonile kapljice s unutrašnje strane poklopca.



Centrifugiranje ne smije biti duže od 1 – 2 sekunde jer bi to moglo dovesti do taloženja nukleinskih kiselina i smanjenih prinosa ukupne RNK.

9. Pipetirajte 700 µl uzorka u spin kolonu PAXgene RNA (PRC, crvena) postavljenu u epruvetu za obradu od 2 ml (PT) i centrifugirajte 1 minutu pri 8000 – 20.000 x g. Postavite spin kolonu (PRC) u novu epruvetu za obradu (PT) od 2 ml i zbrinite staru epruvetu za obradu (PT) koja sadržava nevezanu frakciju.
10. Pipetirajte preostali uzorak u spin kolonu PAXgene RNA (PRC) i centrifugirajte 1 minutu pri 8000 – 20.000 x g. Postavite spin kolonu (PRC) u novu epruvetu za obradu (PT) od 2 ml i zbrinite staru epruvetu za obradu (PT) koja sadržava nevezanu frakciju.



Pažljivo pipetirajte uzorak u spin kolonu (PRC) i vizualno pregledajte je li uzorak potpuno prenesen u spin kolonu (PRC).

11. Pipetirajte 350 µl pufera za ispiranje 1 (BR3) u spin kolonu PAXgene RNA (PRC). Centrifugirajte 1 minutu pri 8000 – 20.000 x g. Postavite spin kolonu (PRC) u novu epruvetu za obradu (PT) od 2 ml i zbrinite staru epruvetu za obradu (PT) koja sadržava nevezanu frakciju.

12. Dodajte 10 µl temeljne standardne otopine DNaze I (RNFD) u 70 µl pufera za razgradnju DNK (RDD) u epruveti za mikrocentrifugu (MCT) od 1,5 ml. Miješajte laganim, kratkim udarcem epruvete te kratko centrifugirajte kako biste prikupili preostalu tekućinu sa strana epruvete.

Ako obrađujete, primjerice, 10 uzoraka, dodajte 100 µl temeljne standardne otopine DNaze I (RNFD) u 700 µl pufera za razgradnju DNK (RDD). Upotrijebite epruvete za mikrocentrifugu (MCT) od 1,5 ml koje su isporučene s kompletom.



DNaza I je posebno osjetljiva na fizičku denaturaciju. Miješanje se mora obavljati samo laganim, kratkim udarcem epruvete. Ne miješajte vorteks miješalicom.

13. Pipetirajte mješavinu za inkubaciju DNaze I (RNFD) (80 µl) izravno na membranu spin kolone PAXgene RNA (PRC) i postavite na stolnu površinu (20 – 30 °C) na 15 minuta.



Pobrinite se da je mješavina za inkubaciju DNaze I (RNFD) postavljena izravno na membranu. Razgradnja DNaze bit će nepotpuna ako se dio mješavine nanese i ostane na stijenkama ili O-prstenu spin kolone (PRC).

14. Pipetirajte 350 µl pufera za ispiranje 1 (BR3) u spin kolonu PAXgene RNA (PRC) i centrifugirajte 1 minutu pri 8000 – 20.000 x g. Postavite spin kolonu (PRC) u novu epruvetu za obradu (PT) od 2 ml i zbrinite staru epruvetu za obradu (PT) koja sadržava nevezanu frakciju.

15. Pipetirajte 500 µl pufera za ispiranje 2 (BR4) u spin kolonu PAXgene RNA (PRC) i centrifugirajte 1 minutu pri 8000 – 20.000 x g. Postavite spin kolonu (PRC) u novu epruvetu za obradu (PT) od 2 ml i zbrinite staru epruvetu za obradu (PT) koja sadržava nevezanu frakciju.



Pufer za ispiranje 2 (BR4) isporučuje se kao koncentrat. Pobrinite se da je etanol dodan u pufer za ispiranje 2 (BR4) prije uporabe (pogledajte „Postupci koje treba napraviti prije započinjanja”, stranica 50).

16. Dodajte još 500 µl pufera za ispiranje 2 (BR4) u spin kolonu PAXgene RNA (PRC). Centrifugirajte 3 minute pri 8000 – 20.000 x g.

17. Zbrinite epruvetu za obradu (PT) koja sadržava nevezanu frakciju i postavite spin kolonu PAXgene RNA (PRC) u novu epruvetu za obradu od 2 ml (PT). Centrifugirajte 1 minutu pri 8000 – 20.000 x g.

18. Zbrinite epruvetu za obradu (PT) koja sadržava nevezanu frakciju. Postavite spin kolonu PAXgene RNA (PRC) u epruvetu za mikrocentrifugu (MCT) od 1,5 ml i pipetirajte 40 µl pufera za eluiranje (BR5) izravno na membranu spin kolone PAXgene RNA (PRC). Centrifugirajte 1 minutu pri 8000 – 20.000 x *g* kako biste eluirali RNK. Važno je namočiti cijelu membranu puferom za eluiranje (BR5) kako bi se postigla maksimalna učinkovitost eluiranja.
19. Ponovite korak eluiranja (korak 18) kako je opisano, upotrebljavajući 40 µl pufera za eluiranje (BR5) i istu epruvetu za mikrocentrifugu (MCT).
20. Inkubirajte eluat 5 minuta pri 65 °C u tresilici-inkubatoru (iz koraka 5) bez trešnje. Nakon inkubacije odmah ohladite na ledu. Inkubacija pri 65 °C denaturira RNK za postupke daljnje obrade. Ne premašujte vrijeme ni temperaturu inkubacije.
21. Ako se uzorci RNK neće odmah upotrebljavati, pohranite ih na -20 °C ili -70 °C. Budući da RNK ostaje denaturirana nakon ponovljenog zamrzavanja i odmrzavanja, nije potrebno ponoviti inkubaciju pri 65 °C. Ako upotrebljavate uzorke RNK za dijagnostičko ispitivanje, slijedite upute proizvođača. Za točnu kvantifikaciju RNK mjerenje apsorpcije pri 260 nm preporučujemo razrjeđivanje uzoraka s 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Razrjeđivanje uzoraka u vodi bez RNaze može dovesti do netočno niskih vrijednosti. Postavite nultu vrijednost spektrofotometra s pomoću prazne otopine koja se sastoji od jednakog omjera pufera za eluiranje (BR5) i pufera Tris-HCl kao u uzorcima koji će se obraditi. Pufer za eluiranje (BR5) ima visoku apsorpciju pri 220 nm, što može dovesti do visokih pozadinskih razina apsorpcije ako spektrofotometar nije propisno postavljen na nultu vrijednost.

Napomena: Za kvantifikaciju u puferu Tris-HCl koristite odnos

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$. Pogledajte Dodatak B, stranica 66.

* Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (SDS) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

Protokol: automatizirano pročišćavanje ukupne RNK iz ljudske pune krvi prikupljene u epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Važne točke prije započinjanja

- Provjerite je li kutija kompleta netaknuta i neoštećena te potvrdite da puferi nisu iscurili. Ne upotrebljavajte oštećeni komplet.
- Prilikom uporabe pipete provjerite je li pipeta postavljena na točan volumen te je li tekućina pažljivo i potpuno aspirirana i dispenzirana.
- Kako biste izbjegli prenošenje uzoraka u pogrešne epruvete i plastične potrošne materijale, pobrinite se da su sve epruvete za obradu (PT), epruvete za mikrocentrifugu (MCT) i adapteri rotora propisno označeni trajnim markerom. Označite poklopac i tijelo svake epruvete za mikrocentrifugu (MCT), tijelo svake epruvete za obradu (PT) i vanjsku stijenku svakog adaptera rotora.
- Prolijevanja uzoraka i pufera tijekom postupka mogu smanjiti prinos i čistoću RNK.
- Osim ako je drugačije naznačeno, svi koraci u ovom protokolu, uključujući korake centrifugiranja, trebaju se provesti pri sobnoj temperaturi (15 – 25 °C).

Zbog osjetljivosti tehnologija amplifikacije nukleinske kiseline, potrebno je poduzeti sljedeće mjere opreza prilikom rukovanja uzorcima kako bi se izbjegla križna kontaminacija:

- Pažljivo pipetirajte uzorak u epruvetu za obradu (PT), na dno epruvete bez navlaživanja ruba epruvete.
- Uvijek promijenite vrhove pipeta između dva prijenosa tekućina. Upotrijebite vrhove pipeta s barijerom protiv aerosola.
- Izbjegnite dodirivanje membrane spin kolone (PRC, PSC) vrhom pipete.

- Nakon miješanja vorteks miješalicom ili zagrijavanja epruvete za mikrocentrifugu (MCT) kratko je centrifugirajte kako biste uklonili kapljice s unutrašnje strane poklopca.
- Tijekom cijelog postupka nosite rukavice. U slučaju dodira između rukavica i uzorka, odmah promijenite rukavice.

Postupci koje treba napraviti prije započinjanja

- Krv se mora prikupiti u epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) prema uputama u *Priručniku za PAXgene Blood RNA Tube*. Ako je potrebno, pogledajte Dodatak C (stranica 67) za preporuke o rukovanju epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Pobrinite se da su epruvete PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkubirane najmanje 2 sata pri sobnoj temperaturi nakon prikupljanja krvi kako bi se osigurala potpuna liza krvnih stanica. Inkubacija epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT) preko noći može povećati prinose. Ako je epruveta PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pohranjena na temperaturama od 2 – 8 °C, -20 °C ili -70 °C nakon prikupljanja krvi, prvo joj prilagodite temperaturu sobnoj temperaturi i potom je pohranite na sobnoj temperaturi 2 sata prije početka postupka.
- Pročitajte sigurnosne informacije na stranici 11.
- Pročitajte „Važne napomene”, stranica 38.
- Pročitajte smjernice o rukovanju s RNK (Dodatak A, stranica 65).
- Pročitajte *Korisnički priručnik za QIAcube* i sve dodatne informacije isporučene s instrumentom QIAcube, obrađujući posebnu pozornost na sigurnosne informacije.
- Pobrinite se da su instrumenti, poput pipeta i instrumenta QIAcube, redovito pregledavani i kalibrirani u skladu s preporukama proizvođača.
- Vezivni pufer (BR2) može u pohrani stvoriti precipitat. Ako je potrebno, zagrijte ga na 37 °C kako bi se precipitat razgradio.
- Pufer za ispiranje 2 (BR4) isporučuje se kao koncentrat. Prije prve uporabe dodajte 4 volumena etanola (96 – 100-postotni, razred čistoće p.a.), kako je naznačeno na bočici, za dobivanje radne otopine.

- Ako prvi puta upotrebljavate RNase-Free DNase Set, pripremite temeljnu standardnu otopinu DNaze I. Otopite krutu DNazu I (RNFD; 1500 Kunitz jedinica)* u 550 µl pufera za resuspendiranje DNaze (DRB) koji je isporučen s kompletom. Obratite pažnju na to da se nijedan dio DNaze (RNFD) ne izgubi prilikom otvaranja bočice. Rekonstituiranu DNazu I (RNFD) nemojte miješati vorteks miješalicom. DNaza I je posebno osjetljiva na fizičku denaturaciju. Miješanje se mora obavljati samo nježnim preokretanjem epruvete.
- Prema trenutačno poznatim podacima rekonstituirana DNaza I (RNFD) može se pohraniti pri 2 – 8 °C do 6 tjedana. Za dugotrajnu pohranu DNaze I (RNFD) uklonite temeljnu standardnu otopinu iz staklene bočice, podijelite je u jednokratne alikvote (upotrijebite epruvete za mikrocentrifugu [MCT] od 1,5 ml isporučene s kompletom; dovoljno ih je za 5 alikvota) i pohranite ih pri -20 °C do 9 mjeseci. Odmrznuti alikvoti mogu se pohraniti pri 2 – 8 °C do 6 tjedana. Nakon odmrzavanja nemojte ponovno zamrzavati alikvote.
- Prilikom rekonstituiranja i alikvotiranja DNaze I (RNFD) pobrinite se da slijedite smjernice za rukovanje s RNK (Dodatak A, stranica 65).
- Instalirajte ispravan adapter tresilice (uključen uz instrument QIAcube; upotrebljavajte adapter za epruvete sa sigurnosnim poklopcem od 2 ml, označene s „2”), te postavite nosač tresilice na gornju stranu adaptera.
- Provjerite ladicu za otpad i ispraznite je ako je potrebno.
- Instalirajte protokole ako to već niste učinili za prethodne procese. Instalirajte oba protokola „PAXgene Blood RNA Part A” i „PAXgene Blood RNA Part B”. Pogledajte „Instaliranje protokola na instrument QIAcube”, stranica 38.

* Kunitz jedinice se upotrebljavaju za mjerenje DNaze I te se definiraju kao količina DNaze I koja uzrokuje povećanje u A_{260} od 0,001 po minuti po mililitru pri 25 °C, pH 5,0, s visoko polimeriziranom DNK kao supstratom (Kunitz, M. (1950.) J. Gen. Physiol. **33**, 349 i 363).

Postupak

1. Zatvorite vratašca instrumenta QIAcube te uključite instrument QIAcube sklopkom za napajanje (vidi sliku 15, stranica 39).

Oglašava se zvučni signal i pojavljuje se zaslon pokretanja. Instrument automatski izvodi početna testiranja.

2. Otvorite vratašca instrumenta QIAcube i postavite potrebne reagense i plastični pribor u instrument QIAcube. Pogledajte „Punjenje instrumenta QIAcube”, stranica 40.

Radi uštede vremena punjenje se može izvesti tijekom jednog ili oba koraka centrifuge u trajanju od 10 minuta (koraci 3 i 5).

3. Centrifugirajte epruvetu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tijekom 10 minuta pri 3000 – 5000 x g s pomoću rotora s njišućim vjedrima.



Pobrinite se da je uzorak krvi inkubiran u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tijekom najmanje 2 sata pri sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) kako bi se postigla potpuna liza krvnih stanica.



Rotor mora sadržavati adaptore za epruvete sa zaobljenim dnom. Ako se upotrebljavaju druge vrste adaptera za epruvete, epruvete mogu puknuti tijekom centrifugiranja.

4. Uklonite supernatant pretakanjem ili pipetiranjem. Dodajte 4 ml vode bez RNaze (RNFw) u talog i zatvorite epruvetu novim sekundarnim poklopcem BD Hemogard (isporučen s kompletom).

Ako je supernatant pretočen, pazite da ne poremetite talog te osušite rub epruvete čistim papirnatim ručnikom.

5. Miješajte vorteks miješalicom dok se talog vidljivo ne razgradi te centrifugirajte 10 minuta pri 3000 – 5000 x g s pomoću rotora s njišućim vjedrima. Uklonite i zbrinite cijeli supernatant.

Mali ostaci materijala preostali u supernatantu nakon miješanja vorteks miješalicom, no prije centrifugiranja, neće utjecati na postupak.



Nepotpuno uklanjanje supernatanta inhibirat će lizu i razrijediti lizat te stoga utjecati na uvjete za vezanje RNK na membranu PAXgene.

6. Dodajte 350 µl pufera za resuspendiranje (BR1) i miješajte vorteks miješalicom dok se talog vidljivo ne razgradi.

7. Pipetirajte uzorak u epruvetu za obradu (PT) od 2 ml.



Upotrijebite epruvete za obradu (PT) od 2 ml uključene u komplet PAXgene Blood RNA Kit.

8. Postavite otvorene epruvete za obradu (PT) s uzorkom u tresilicu QIAcube (pogledajte sliku 17, stranica 42). Položaji uzoraka označeni su brojevima radi lakšeg postavljanja. Umetnite čepove nosača tresilice (uključeni uz QIAcube) u utore na rubu nosača tresilice uz svaku epruvetu za obradu. To omogućava detekciju uzoraka tijekom provjere postavljanja.



Pobrinite se da je instaliran ispravan adapter tresilice (adapter tresilice, 2 ml, epruvete sa sigurnosnim poklopcem, označene s „2”, uključene uz QIAcube).



Ako obrađujete manje od 12 uzoraka, pobrinite se da postavite nosač tresilice kako je prikazano na slici 21, stranica 46. Jedan ili 11 uzoraka ne mogu se obrađivati.

9. Zatvorite vratašca instrumenta QIAcube (pogledajte sliku 15, stranica 39).

10. Odaberite protokol PAXgene Blood RNA Part A” i započnite protokol.

Slijedite upute navedene na dodirnom zaslonu instrumenta QIAcube.



Pobrinite se da su oba dijela programa (dio A i dio B) instalirani na instrumentu QIAcube (pogledajte „Instaliranje protokola na instrument QIAcube”, stranica 38).



Instrument QIAcube izvršit će provjeru postavljanja za uzorke, vrhove, adaptore rotora i bočice za reagense.

11. Nakon što završi protokol PAXgene Blood RNA Part A”, otvorite vratašca instrumenta QIAcube (slika 15, stranica 39). Uklonite i zbrinite spin kolone PAXgene RNA (PRC) iz adaptera rotora i prazne epruvete za obradu (PT) iz tresilice.



Tijekom procesa instrument premješta spin kolone iz položaja 1 na adapteru rotora (položaj poklopca L1) u položaj 3 na adapteru rotora (položaj poklopca L2) (pogledajte sliku 19, stranica 44).

12. Zatvorite poklopce svih epruveta za mikrocentrifugu (MCT) od 1,5 ml koje sadržavaju pročišćenu RNK u adapterima rotora (položaj 3, položaj poklopca L3, pogledajte sliku 19, stranica 44). Premjestite epruvete za mikrocentrifugu (MCT) od 1,5 ml na adapter tresilice instrumenta QIAcube (pogledajte sliku 17, stranica 42).
13. Zatvorite vratašca instrumenta QIAcube (pogledajte sliku 15, stranica 39).
14. Odaberite protokol „PAXgene Blood RNA Part B” i započnite protokol.

Slijedite upute navedene na dodirnom zaslonu instrumenta QIAcube.



Ovaj program inkubira uzorke pri 65 °C i denaturira RNK za postupke daljnje obrade. Čak i ako postupak daljnje obrade uključuje korak s denaturacijom toplinom, ne izostavljajte taj korak. Dovoljna denaturacija RNK ključna je za maksimalnu učinkovitost postupaka daljnje obrade.

15. Nakon što završi program „PAXgene Blood RNA Part B”, otvorite vratašca instrumenta QIAcube (slika 15, stranica 39). Odmah postavite epruvete za mikrocentrifugu (MCT) s pročišćenom RNK na led.



UPOZORENJE: vruća površina. Tresilica može dosegnuti temperaturu do 70 °C. Nemojte je dodirivati dok je vruća.



Nemojte ostavljati pročišćenu RNK u instrumentu QIAcube. Budući da uzorci nisu ohlađeni, može doći do degradacije pročišćene RNK. Stoga se ne preporučuje izvođenje procesa pripreme uzoraka preko noći i bez nadzora.

16. Ako se uzorci RNK neće odmah upotrebljavati, pohranite ih na -20 °C ili -70 °C.

Budući da RNK ostaje denaturirana nakon ponovljenog zamrzavanja i odmrzavanja, nije potrebno ponoviti protokol inkubacije toplinom („PAXgene Blood RNA Part B”). Ako upotrebljavate uzorke za dijagnostičko ispitivanje, slijedite upute proizvođača.

Za točnu kvantifikaciju RNK apsorpcijom pri 260 nm preporučujemo razrjeđivanje uzoraka u 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Razrjeđivanje uzoraka u vodi bez RNaze može dovesti do netočno niskih vrijednosti.

Postavite nultu vrijednost spektrofotometra s pomoću prazne otopine koja se sastoji od jednakog omjera pufera za eluiranje (BR5) i pufera Tris-HCl kao u uzorcima koji će se obraditi. Pufer za eluiranje (BR5) ima visoku apsorpciju pri 220 nm, što može dovesti do visokih pozadinskih razina apsorpcije ako spektrofotometar nije propisno postavljen na nultu vrijednost.



Za kvantifikaciju u puferu Tris-HCl koristite odnos

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Pogledajte Dodatak B, stranica 66.

17. Uklonite nosač za bočice za reagense s radne površine instrumenta QIAcube (pogledajte sliku 17, stranica 42) te zatvorite sve bočice propisno označenim poklopcima. Pufer u bočicama može se čuvati na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) do 3 mjeseca. Uklonite i zbrinite preostale reagense u epruvetama za obradu (PT) u utorima instrumenta QIAcube za epruvete za mikrocentrifugu (pogledajte sliku 17, stranica 42). Uklonite i zbrinite adaptore rotora iz centrifuge (pogledajte sliku 17, stranica 42). Ispraznite ladicu za otpad instrumenta QIAcube (pogledajte sliku 15, stranica 39). Zatvorite vratašca instrumenta QIAcube te isključite instrument sklopom za napajanje (vidi sliku 15, stranica 39).

* Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (SDS) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

Vodič za rješavanje problema

Ovaj vodič za rješavanje problema može biti koristan pri rješavanju bilo kojih problema koji mogu nastati. Za više informacija pogledajte i stranicu s najčešćim pitanjima u našem centru za tehničku podršku: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Znanstvenici u tehničkoj službi društva QIAGEN uvijek će rado odgovoriti na sva pitanja koja možda imate vezano uz informacije i protokole u ovom priručniku ili tehnologije uzorkovanja i ispitivanja (informacije za kontakt potražite na posljednjoj stranici ili posjetite www.qiagen.com).

Komentari i prijedlozi

Degradirana RNK

Kontaminacija RNaze



Pazite da ne unesete RNaze u reagense tijekom postupka ili kasnijeg rukovanja (pogledajte Dodatak A, stranica 65).

Niski prinos RNK

a) Manje od 2,5 ml krvi prikupljeno u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



Pobrinite se da je 2,5 ml krvi prikupljeno u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT; pogledajte *Priručnik za PAXgene Blood RNA Tube*).

b) Koncentracija RNK mjerena u vodi



RNK mora biti razrijeđena u 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* za točnu kvantifikaciju (pogledajte Dodatak B, stranica 66).



c) Ostatak stanica prenesen u spin kolonu PAXgene RNA (PRC) u koracima 9 i 10 ručnog protokola





Izbjegnite prenošenje velikih čestica prilikom pipetiranja supernatanta u koraku 7 ručnog protokola (prijenos malih ostataka neće utjecati na postupak).

* Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (SDS) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

Komentari i prijedlozi

- | | |
|--|---|
| d) Supernatant nije potpuno uklonjen u koraku 3 |  <p>Pobrinite se da je cijeli supernatant uklonjen. Ako je supernatant pretočen, uklonite kapljice s ruba epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT) papirnatim ručnikom. Poduzmite odgovarajuće mjere opreza kako biste spriječili križnu kontaminaciju.</p> |
| e) Nakon prikupljanja u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT), krv se inkubira manje od 2 sata |  <p>Inkubirajte krv u epruveti PAXgene Blood RNA Tube (BRT) najmanje 2 sata nakon prikupljanja.</p> |

Niska vrijednost A_{260}/A_{280}

- | | |
|---|--|
| a) Voda upotrijebljena za razrjeđivanje RNK za mjerenje vrijednosti A_{260}/A_{280} |  <p>Upotrijebite 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 za razrjeđivanje RNK prije mjerenja čistoće* (pogledajte Dodatak B, stranica 66).</p> |
| b) Nulta vrijednost spektrofotometra nije propisno postavljena |  <p>Postavite nultu vrijednost spektrofotometra s pomoću prazne otopine koja se sastoji od jednakog omjera pufera za eluiranje (BR5) i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, kao u uzorcima koji će se obraditi. Puffer za eluiranje (BR5) ima visoku apsorpciju pri 220 nm, što može dovesti do visokih pozadinskih razina apsorpcije ako spektrofotometar nije propisno postavljen na nultu vrijednost.</p> |

Kvar instrumenta

Instrumentom QIAcube ne rukuje se propisno

Pročitajte *Korisnički priručnik za QIAcube* i obratite posebnu pažnju na odjeljak Rješavanje problema. Pobrinite se da je instrument QIAcube propisno održavan, kako je opisano u *Korisničkom priručniku za QIAcube*.

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

Dodatak A: Opće napomene o rukovanju s RNK

Rukovanje s RNK



Ribonukleaze (RNaze) su vrlo stabilni i aktivni enzimi koji uglavnom ne trebaju kofaktore za funkcioniranje. Budući da se RNaze teško inaktiviraju, a za degradaciju RNK su dovoljne su i minute, ne upotrebljavajte plastični ili stakleni pribor, a da pritom niste eliminirali moguću kontaminaciju RNazama. Posebnu pažnju treba obratiti na izbjegavanje nenamjernog uvođenja RNaza u uzorak RNK tijekom ili nakon postupka pročišćavanja. Kako bi se stvorila i održala okolina bez RNaza, moraju se poduzeti određene mjere opreza tijekom predobrade te uporabe jednokratnih i višekratnih posuda i otopina tijekom rada s RNK.

Općenito rukovanje



Prilikom rada s RNK potrebno je uvijek upotrebljavati propisnu mikrobiološku i aseptičku tehniku. Ruke i čestice prašine prenose bakterije i plijesni te su najčešći izvori kontaminacije RNazom. Uvijek nosite rukavice od lateksa ili vinila prilikom rukovanja reagensima i uzorcima RNK kako biste spriječili kontaminaciju RNazom s površine kože ili s prašnjave laboratorijske opreme. Često mijenjajte rukavice i održavajte epruvete zatvorenima kad god je to moguće. Držite pročišćenu RNK na ledu za vrijeme pipetiranja alikvota za postupke daljnje obrade.

Protokoli za uklanjanje kontaminacije RNazom iz staklenog pribora i otopina mogu se pronaći u općim vodičima za molekularnu biologiju, kao što je Sambrook, J. i Russell, D. W. (2001.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Dodatak B: Kvantifikacija i određivanje kvalitete ukupne RNK

Kvantifikacija RNK

Koncentracija RNK treba se odrediti mjerenjem apsorpcije pri 260 nm (A_{260}) u spektrofotometru. Kako bi se osigurala valjanost rezultata, očitavanja trebaju biti unutar linearnog raspona spektrofotometra. Apsorpcija 1 jedinice pri 260 nm odgovara 44 µg RNK po ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$). Ovaj je odnos valjan samo za mjerenja u 10 mM Tris-HCl,* pH 7,5. Stoga je potrebno razrijediti uzorak RNK, a to se mora obaviti u 10 mM Tris-HCl. Kako je obrađeno u nastavku (pogledajte „Čistoća RNK”, stranica 67), omjer između vrijednosti apsorpcije pri 260 i 280 nm daje procjenu čistoće RNK. Prilikom mjerenja uzoraka RNK osigurajte da su kivete bez RNaze. Postavite nultu vrijednost spektrofotometra s pomoću prazne otopine koja se sastoji od jednakog omjera pufera za eluiranje (BR5) i pufera Tris-HCl kao u uzorcima koji će se obraditi. Pufer za eluiranje (BR5) ima visoku apsorpciju pri 220 nm, što može dovesti do visokih pozadinskih razina apsorpcije ako spektrofotometar nije propisno postavljen na nultu vrijednost. U nastavku je prikazan primjer izračuna uključenog u kvantifikaciju RNK.

| | | |
|--|---|--|
| Volumen uzorka RNK | = | 80 µl |
| Razrjeđivanje (1/15) | = | 10 µl uzorka RNK + 140 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 |
| Mjerite apsorpciju razrijeđenog uzorka u kiveti (bez RNaze). | | |
| A_{260} | = | 0,3 |
| Koncentracija uzorka | = | $44 \times A_{260} \times \text{faktor razrjeđivanja}$ |
| | = | $44 \times 0,3 \times 15$ |
| | = | 198 µg/ml |
| Ukupni prinos | = | koncentracija x volumen uzorka u mililitrima |
| | = | $198 \mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml}$ |
| | = | 15,8 µg RNK |

* Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (SDS) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

Čistoća RNK

Na temelju omjera očitavanja pri 260 nm i 280 nm (A_{260}/A_{280}) procjenjuje se čistoća RNK u pogledu kontaminanata koji se apsorbiraju u UV spektru, kao što su proteini. Međutim, na omjer vrijednosti A_{260}/A_{280} znatno utječe pH. Niži pH dovodi do nižeg omjera A_{260}/A_{280} i smanjene osjetljivosti na kontaminaciju proteinima.* Za dobivanje točnih vrijednosti preporučujemo mjerenje apsorpcije u 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Čista RNK ima omjer vrijednosti A_{260}/A_{280} od 1,8 – 2,2 u 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Postavite nultu vrijednost spektrofotometra s pomoću prazne otopine koja se sastoji od jednakog omjera pufera za eluiranje (BR5) i pufera Tris-HCl kao u uzorcima koji će se obraditi. Pufer za eluiranje (BR5) ima visoku apsorpciju pri 220 nm, što može dovesti do visokih pozadinskih razina apsorpcije ako spektrofotometar nije propisno postavljen na nultu vrijednost.

Dodatak C: Rukovanje epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Sljedeće preporuke društva BD mogu biti korisne prilikom rukovanja epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes. Više informacija o epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) potražite u *Priručniku za PAXgene Blood RNA Tube*.

Upute za uklanjanje poklopca BD Hemogard

1. Uhvatite epruvetu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) jednom rukom, postavljajući palac ispod poklopca BD Hemogard. (Za dodatnu stabilnost postavite ruku na čvrstu

* 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.

površinu.) Drugom rukom okrenite poklopac BD Hemogard dok ga istovremeno gurate palcem prve ruke prema gore SAMO DOK SE ČEP NE OLABAVI.

2. Odmaknite palac prije podizanja poklopca. NE upotrebljavajte palac kako biste odgurnuli poklopac s epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Oprez: ako epruveta PAXgene Blood RNA Tube (BRT) sadržava krv, postoji rizik od izlaganja. Kako bi se pomogla spriječiti ozljeda prilikom uklanjanja poklopca, važno je da se palac kojim se poklopac gura prema gore odmakne od epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT) čim se poklopac BD Hemogard olabavi.
3. Podignite poklopac s epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT). U malo vjerojatnom slučaju da se plastična zaštita odvoji od gumenog čepa, NE SASTAVLJAJTE PONOVO POKLOPAC. Pažljivo uklonite gumeni čep s epruvete PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Upute za umetanje sekundarnog poklopca BD Hemogard

1. Ponovno postavite poklopac na epruvetu PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Okrenite i pogurajte čvrsto prema dolje dok čep potpuno ne sjedne na mjesto. Potpuno ponovno umetanje čepa nužno je kako bi poklopac ostao sigurno postavljen na epruvetu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tijekom rukovanja epruvetom.

Informacije za naručivanje

| Proizvod | Sadržaj | Kat. br. |
|---|---|----------|
| PAXgene Blood RNA Kit (50) | 50 spin kolona PAXgene, 50 spin kolona Shredder, epruvete za obradu, DNaza I bez RNaze, reagensi i puferi bez RNaze. Za uporabu uz epruvete PAXgene Blood RNA Tubes | 762174 |
| PAXgene Blood RNA Tubes (100) | 100 epruveta za prikupljanje krvi | 762165 |
| Povezani proizvodi koji se mogu naručiti od društva QIAGEN | | |
| Starter Pack, QIAcube | Paket uključuje: nosače za bočice za reagense (3); trake za označavanje nosača (8); vrhove s filtrom od 200 µl (1024); vrhove s filtrom od 1000 µl (1024); vrhove s filtrom od 1000 µl, široke (1024); bočice za reagensa od 30 ml (18); adaptere rotora (240); nosač adaptera rotora | 990395 |
| Filter-Tips, 1000 µl (1024) | Sterilni, jednokratni vrhovi s filtrom, u nosaču | 990352 |
| Reagent Bottles, 30 ml (6) | Bočice za reagense (30 ml) s poklopcima; paket od 6; za uporabu s nosačem za bočice za reagense QIAcube | 990393 |
| Rotor Adapters (10 x 24) | Za 240 pripremanja: 240 jednokratnih adaptera rotora; za uporabu s instrumentom QIAcube | 990394 |
| Reagent Bottle Rack | Nosač za bočice za reagense 6 x 30 ml na radnoj površini instrumenta QIAcube | 990390 |

| | | |
|----------------------|---|--------|
| Rotor Adapter Holder | Držač za 12 jednokratnih adaptera rotora; za uporabu s instrumentom QIAcube | 990392 |
|----------------------|---|--------|

Povezani proizvodi koji se mogu naručiti od društva BD*

| | | |
|--------------------------------|---|--------|
| Blood Collection Set | BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: igla od 21 G, 0,75 inča (0,8 x 19 mm), epruvete od 12 inča (305 mm) s luer adapterom; 50 po pakiranju, 200 po kutiji | 367286 |
| BD Vacutainer One-Use Holder | Kutija samo za epruvete promjera 13 mm i 16 mm; 1000/kutija | 364815 |
| BD Vacutainer Plus Serum Tubes | Epruvete od 4,0 ml i 13 x 75 mm s crvenim BD Hemogard poklopcem i papirnatom oznakom; 100/pakiranje, 1000/kutija | 368975 |

* Ova dodatna oprema za prikupljanje krvi predstavlja tipične proizvode koji se mogu upotrebljavati s epruvetama PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Kako biste saznali više o ovoj dodatnoj opremi, uključujući kako je naručiti, posjetite www.preanalytix.com.

Ažurirane informacije o licenciranju i izjave specifične za proizvod pogledajte u odgovarajućem priručniku za komplet tvrtke PreAnalytiX ili QIAGEN ili priručniku za korisnika. Priručnici za komplet tvrtke PreAnalytiX i QIAGEN te priručnici za korisnike dostupni su na www.preanalytix.com i www.qiagen.com ili se mogu zatražiti od tehničke službe društva PreAnalytiX.

Povijest revizija priručnika

| Dokument i izmjene | Izmjene | Datum |
|--------------------|--|----------------|
| HB-0101-004, R2 | Promjene radi usklađivanja s propisima GHS-a u dokumentu | lipanj 2015. |
| HB-0101-005, R3 | Novi predložak; izmjene u automatiziranom protokolu i podacima o radnom učinku; ažuriranje Sigurnosnih informacija kako bi bile u skladu s propisima GHS-a; izmjene u podacima o instrumentu i izjavi o Ograničenjima uporabe proizvoda. | Veljača 2019. |
| HB-0101-006, R3 | Ispravak naziva kompleta u tablici sa sadržajem kompleta, str. 5. | Siječanj 2020. |

PreAnalytiX Worldwide

Proizvode PreAnalytiX distribuiraju društva QIAGEN i BD

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

www.qiagen.com

www.PreAnalytiX.com

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

www.bd.com

www.PreAnalytiX.com

