

2020. január

PAXgene®

Blood RNA Kit kézikönyv

2. verzió



50 (katalógusszám: 762174)

R3 **MAT** 1120409HU

REF 762174

IVD



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Készítette a QIAGEN GmbH a PreAnalytiX részére

 **PreAnalytiX**
A QIAGEN / BD Company

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

A PAXgene Blood RNA Kitek nem kaphatók minden országban; kérjük, tájékozódjon.

Korlátozott licencmegállapodás

Ennek a terméknek a használatával a PAXgene Blood RNA Kit minden vásárlója és használója elfogadja az alábbi feltételeket:

1. A PAXgene Blood RNA Kit kizárólag a *PAXgene Blood RNA Kit kézikönyvben* leírtaknak megfelelően, és csak a kitben található komponensekkel együtt használható. A PreAnalytiX semmilyen szellemi tulajdonjoga alapján nem járul hozzá, hogy felhasználják az ezen kitben lévő komponenseket a kitben nem megtalálható más komponensekkel, vagy ilyenekbe beépítsék őket, kivéve abban az esetben, ha és ahogyan az szerepel a *PAXgene Blood RNA Kit kézikönyvben* vagy a www.PreAnalytiX.com honlapon található további protokollok valamelyikében.
2. A kifejezett licenceken kívül a PreAnalytiX nem vállal garanciát arra, hogy a kit és/vagy használata nem sérti harmadik fél jogait.
3. A kit és komponenseinek licence csak egyszeri használatra jogosít; a komponensek újrafelhasználása, felújítása vagy újraértékesítése tilos.
4. A PreAnalytiX a kifejezett licenceken kívül különösen kizár minden más konkrét vagy vélelmezett jogot.
5. A kit vásárlója és felhasználója elfogadja, hogy semmilyen olyan lépést nem tesz, és másnak sem engedélyezi semmilyen olyan lépés megtételét, amely a fentiekben előírtak megszegéséhez vezetne, vagy elősegíthetné azt.
6. A PreAnalytiX jogosult a jelen korlátozott licencszerződésben foglalt tilalmak bármely bíróságon keresztüli érvényesítésére, és az azzal kapcsolatban felmerülő összes vizsgálati és perköltség követelésére, beleértve a korlátozott licence vonatkozó jelen szerződés vagy a kittel és/vagy komponenseivel kapcsolatos bármilyen szellemi tulajdonjog érvényesítése céljából indított peres eljárás ügyvédi költségeit.

A legújabb licencfeltételekről a www.PreAnalytiX.com oldalon tájékozódhat.

Feltételes értékesítés

A jelen terméket az US-7,270,953, az US-7,682,790, valamint az EP-1820793 B1 szabadalom, illetve ezek külföldi megfelelői bizonyos jogcímei alá tartozó, a terméknek a PAXgene Blood RNA Tube mintacsőbe való mintavétel során képződött nukleinsav komplexek feldolgozását célzó használatára vonatkozó licenc védi.

HB-0101-006 BD-8945 1120409 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, minden jog fenntartva.

PreAnalytiX Company

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Svájc

www.PreAnalytiX.com

PreAnalytiX forgalmazók

A PreAnalytiX termékeket a QIAGEN vagy BD gyártja a PreAnalytiX részére, és a QIAGEN vagy BD forgalmazza a PreAnalytiX részére. A termékek nem rendelhetők meg közvetlenül a PreAnalytiX GmbH-től.

A PreAnalytiX helyi forgalmazójának kapcsolatfelvételi adataiért lapozzon az utolsó oldalra.

Tartalom

A kit tartalma	5
Szimbólumok.....	6
Tárolási körülmények	8
Alkalmazási terület	8
A termék használatának korlátai	9
Minőség-ellenőrzés	9
Műszaki segítségnyújtás	9
Biztonsági információk.....	10
Bevezetés	13
Alapelvek és eljárás	13
Mintavétel és -stabilizálás	14
RNS-koncentrálas és -tisztítás	19
Manuális RNS-tisztítás	19
Automatizált RNS-tisztítás	29
A felhasználó által biztosítandó eszközök és reagensek	35
Fontos megjegyzések.....	37
A QIAcube használata.....	37
A QIAcube készülék elindítása	37
Protokollok telepítése a QIAcube készülékre	37
A QIAcube készülék előkészítése.....	39
Protokoll: Teljes RNS manuális tisztítása PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekbe gyűjtött humán teljes vérből	48

Protokoll: Teljes RNS automatizált tisztítása PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekbe gyűjtött humán teljes vérből	55
Hibaelhárítási útmutató	62
„A” függelék: Általános megjegyzések az RNS kezeléséről	64
„B” függelék: A teljes RNS mennyiségi és minőségi meghatározása	65
„C” függelék: A PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek kezelése	66
Rendelési információk	68
A kézikönyv átdolgozási előzményei	70


A kit tartalma

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Katalógusszám			762174
Készítmények száma			50
BR1	Resuspension Buffer (Reszuszpenziós puffer)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Kötőpuffer)*	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (1. mosópuffer)*	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) (2. mosópuffer [tömény])†	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Eluáló puffer)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-free Water (bottle) (RNáz-mentes víz [palack])	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid) (Proteináz K [zöld kupak])	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (Spin oszlopok [vörös])	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (2 ml) (Feldolgozócsövek [2 ml])	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures (Másodlagos BD Hemogard™ zárókupakok)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (1.5 ml) (Mikrocentrifuga-csővek [1,5 ml])	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNáz I, RNáz-mentes [líoofilizált])	DNA REM	1500 Kunitz-egység‡
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (DNS emésztőpuffer [fehér kupak])	DNA DIG BUF	2 × 2 ml

*Nem használható hipót tartalmazó fertőtlenítőszerekkel. Guanidinsót tartalmaz. A biztonsági információkat lásd a 9. oldalon.

† A Wash Buffer 2 (2. mosópuffer) (BR4) tömény formában található a kitben. Az első használat előtt adjon hozzá 4-szeres térfogatú (96–100%-os, analitikai tisztaságú) etanolt a palackon feltüntetettek szerint a munkaoldat előállításához.

‡ A Kunitz-egység az általánosan használt egység a DNáz I mérésére, definíció szerint az a DNáz I mennyiség, amely 0,001 per perc per milliliter A_{260} növekedést okoz 25 °C-on, 5,0-s pH-n, erősen polimerizált DNS szubsztrát mellett (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 and 363. o.).

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Katalógusszám			762174
Készítmények száma			50
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (Dnáz resuszpenziós puffer [tesztcső, lila kupak])	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (Spin oszlopok [lila])	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Kézikönyv	PAXgene Blood RNA Kit kézikönyv (2. verzió)		1

Szimbólumok



<N>

<N> teszthez elegendő reagenst tartalmaz



Lásd a használati útmutatót



Lejárat dátum



In vitro diagnosztikai alkalmazásra szolgáló orvosi eszköz



Katalógusszám



Tételszám



Anyagszám



Komponensek











Szám



Sugárkezeléses sterilizálási módszer



Kunitz-egységek

ADD	Hozzáadva
CONT	Tartalom
RCNS	Feloldással előkészített
DNase	Dezoxi-ribonukleáz I
EtOH	Etanol
GITC	Guanidin-izotiocianát
RNase-Free DNase Set	RNase-Free DNase Set
GTIN	Globális kereskedelmi áruazonosító szám
	Tilos újrafelhasználni
	Hőmérsékleti korlát
	Felső hőmérsékleti korlát
	Gyártó
	Fontos megjegyzés
 _____	Az etanol üvegbe töltése után írja rá az aktuális dátumot
	Az áru beérkezését követően
	Elvezet ide

Tárolási körülmények

A PAXgene RNA spin oszlopok (PRC), a PAXgene Shredder spin oszlopok (PSC), a proteináz K (PK) és a pufferek (BR1, BR2, BR3, BR4 és BR5) száraz környezetben, a kit címkéjén feltüntetett hőmérsékleten tárolandók.

Az RNase-Free DNase Set készletet, amely DNáz I-et (RNFD), DNS emésztőpuffert (RDD) és DNáz reszuspenziós puffert (DRB) tartalmaz, környezeti hőmérsékleten szállítják. Megérkezése után haladéktalanul tegye az RNase-Free DNase Set készlet minden komponensét a termékcímkén feltüntetett hőmérsékletre. Megfelelő tárolás mellett a kit a dobozon feltüntetett lejárati dátumig marad stabil.

Alkalmazási terület

A PAXgene Blood RNA Kit a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsövekbe gyűjtött teljes vérből az intracelluláris RNS tisztítására szolgál. Amikor a kitet a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsövekkel együtt használják, a rendszer a teljesvér-mintából tisztított intracelluláris RNS-t biztosít a molekuláris diagnosztikai vizsgálatok során használt RT-PCR-hez. A PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek használatával kapcsolatos információkat lásd a *PAXgene Blood RNA Tube kézikönyvben* (PAXgene Blood RNA Tube Handbook).

A PAXgene Blood RNA System teljesítményjellemzőit csak FOS és IL1B gének transzkriptjeivel állapították meg. A felhasználó felelős a PAXgene Blood RNA System megfelelő teljesítményjellemzőinek megállapításáért más célgének transzkriptjei esetében.

A termék használatának korlátai

A PAXgene Blood RNA Kit a humán teljes vérből ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocita/ml) származó intracelluláris RNS tisztítására szolgál in vitro diagnosztikai alkalmazásokhoz. Nem alkalmas azonban genomiális DNS vagy vírus-nukleinsavak humán teljes vérből való tisztítására. A stabilizáció részletes leírásához validált géntranszkriptek korlátozott száma miatt (FOS és IL1B géntranszkriptek) a teljesítményjellemzőket nem állapították meg minden transzkriptre. A laboratórium dolgozóinak át kell tekinteniük a gyártó adatait és a saját adatokat annak eldöntéséhez, hogy szükséges-e más transzkriptek esetében is elvégezni a validálást.

A terméket csak az in vitro diagnosztikai eljárásokban képzett, tapasztalt szakemberek, pl. szaktechnikusok és orvosok használhatják.

Minőség-ellenőrzés

A QIAGEN ISO-minősített minőségirányítási rendszerének megfelelően a PAXgene Blood RNA Kit minden egyes gyártási tételét leellenőrzik, hogy az megfelel-e az előírt paramétereknek, ezzel biztosítva a termék állandó és kifogástalan minőségét.

Műszaki segítségnyújtás

A QIAGEN vállalatnál büszkék vagyunk az általunk nyújtott műszaki támogatás elérhetőségére és magas színvonalára. Műszaki ügyfélszolgálati részlegeinken a molekuláris biológia, illetve a PreAnalytiX termékek használata terén kiterjedt gyakorlati és elméleti ismeretekkel rendelkező, tapasztalt kutató szakemberek dolgoznak. Ha bármilyen kérdése lenne a PAXgene Blood RNA Kit használatával kapcsolatban, forduljon hozzánk bizalommal.

Műszaki segítségért és további információkért hívja a QIAGEN műszaki ügyfélszolgálatát.

Biztonsági információk

Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget.

A (pl. HIV vagy hepatitis B vírus általi) fertőzés vagy sérülés kockázatának elkerülése érdekében a biológiai és vegyi anyagokkal való munkálatok során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. A további tudnivalókat a megfelelő biztonsági adatlapok (SDS-ek) tartalmazzák. Ezek jól kezelhető, kompakt PDF formátumban elérhetők online, a **www.PreAnalytiX.com** weboldalon, ahol megtalálható, megtekinthető és kinyomtatható a jelen kit biztonsági adatlapja.

FIGYELEM



SOHA NE adjon hipót vagy savas oldatot közvetlenül a minta-előkészítés hulladékához.

A kötőpuffer (BR2) és az 1. mosópuffer (BR3) guanidin-tiocianátot tartalmaz, amely hipóval keverve rendkívül reakcióképes vegyületeket képezhet. Ha a kötőpuffer (BR2) vagy az 1. mosópuffer (BR3) kiömlik, tisztítsa fel megfelelő laboratóriumi tisztítószerrel és vízzel. Ha potenciálisan fertőző anyagot tartalmazó folyadék ömlik ki, az érintett területet először laboratóriumi tisztítószerrel és vízzel, majd 1%-os (v/v) nátrium-hipoklorit oldattal tisztítsa meg.

A PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsőből származó RNS-stabilizáló oldat és vér keveréke fertőtleníthető 1 térfogatnyi háztartási hipóoldat (5%-os nátrium-hipoklorit) 9 térfogatnyi RNS-stabilizáló oldat és vér keverékéhez adásával.

A minta-előkészítés hulladékát, például az RNS-tisztítási eljárás centrifugálási lépéseiben kapott felülúszókat potenciálisan fertőzőnek kell tekinteni. Kidobás előtt a hulladékot autoklávozni kell, vagy el kell égetni, hogy megsemmisüljön minden fertőző anyag. A hulladékkezelés során követni kell a hivatalos hatósági előírásokat.

A következő veszélyességi és biztonsági jelzések vonatkoznak a PAXgene Blood RNA Kit összetevőire. A PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek használatával kapcsolatos biztonsági információkat lásd a *PAXgene Blood RNA Tube kézikönyvben*.

BR2 puffer



Guanidin-tiocianátot tartalmaz. Veszély! Lenyelve ártalmas. Bőrrel érintkezve vagy belélegzés esetén ártalmas lehet. Súlyos szemkárosodást okoz. Ártalmas a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz. Savval érintkezve nagyon mérgező gázok képződnek. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező. SZEMBE KERÜLÉS esetén: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása. Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz.

BR3 puffer



Etanolt és guanidin-tiocianátot tartalmaz. Veszély! Tűzveszélyes folyadék és gőz. Súlyos szemkárosodást okoz. Savval érintkezve nagyon mérgező gázok képződnek. Hőtől/sziktától/nyílt lángtól/forró felületektől távol tartandó. Tilos a dohányzás. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező. SZEMBE KERÜLÉS esetén: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása. Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz.

DNáz I



DNáz enzimet tartalmaz. Veszély! Allergiás bőrreakciót válthat ki. Belélegezve allergiás és asztmás tüneteket, és nehéz légzést okozhat. Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező. Légzésvédelem használata kötelező. Expozíció vagy annak gyanúja esetén: Forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz. Az érintett személyt friss levegőre kell vinni és olyan nyugalmi testhelyzetbe kell helyezni, hogy könnyen tudjon lélegezni.

Proteináz K



Proteináz K enzimet tartalmaz. Veszély! Enyhén bőrirritáló hatású. Belélegezve allergiás és asztmás tüneteket, és nehéz légzést okozhat. Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező. Légzésvédelem használata kötelező. Expozíció vagy annak gyanúja esetén: Forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz. Az érintett személyt friss levegőre kell vinni és olyan nyugalmi testhelyzetbe kell helyezni, hogy könnyen tudjon lélegezni.

Bevezetés

A celluláris RNS tanulmányozásához használt számos molekuláris assay első lépése a teljes vér gyűjtése. Az ilyen kísérleteknél azonban komoly probléma a celluláris RNS profil in vitro instabilitása. A PreAnalytiX által elvégzett vizsgálatok kimutatták, hogy az egyedi mRNS fajták kópiaszáma a teljes vérben több mint 1000-szeresen változhat szoba-hőmérsékletű tárolás vagy szállítás során.* Ennek oka egyrészt a gyors RNS-lebomlás, másrészt bizonyos gének indukált expressziója a vérvételt követően. Az RNS expressziós profiljának ilyen mértékű változásai lehetetlenné teszik a génexpresszió megbízható vizsgálatát. Ezért elengedhetetlen egy olyan módszer használata a humán teljes vérben a génexpresszió pontos analíziséhez, amely megőrzi az RNS expressziós profilt vérvétel közben és után is.

Alapelvek és eljárás

A PreAnalytiX kifejlesztett egy új rendszert, amely lehetővé teszi a humán teljesvér-minták gyűjtését, stabilizálását, tárolását és szállítását, valamint egy gyors és hatékony protokollt biztosít az intracelluláris RNS tisztítására. Ez a rendszer megkívánja a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 6,602,718 és 6,617,170 számú szabadalmak, USA) mintacsövek használatát a vérvételhez és az RNS stabilizálásához, amelyet manuális vagy automatizált RNS-tisztítás követ a PAXgene Blood RNA Kit segítségével. A manuális és automatizált protokoll alapján véve azonos teljesítményt nyújt a kinyert RNS minőségét és hozamát illetően. A manuális protokoll (22–29. oldal) és az automatizált protokoll (32–34. oldal) teljesítményadatai megtalálhatók a jelen kézikönyvben.

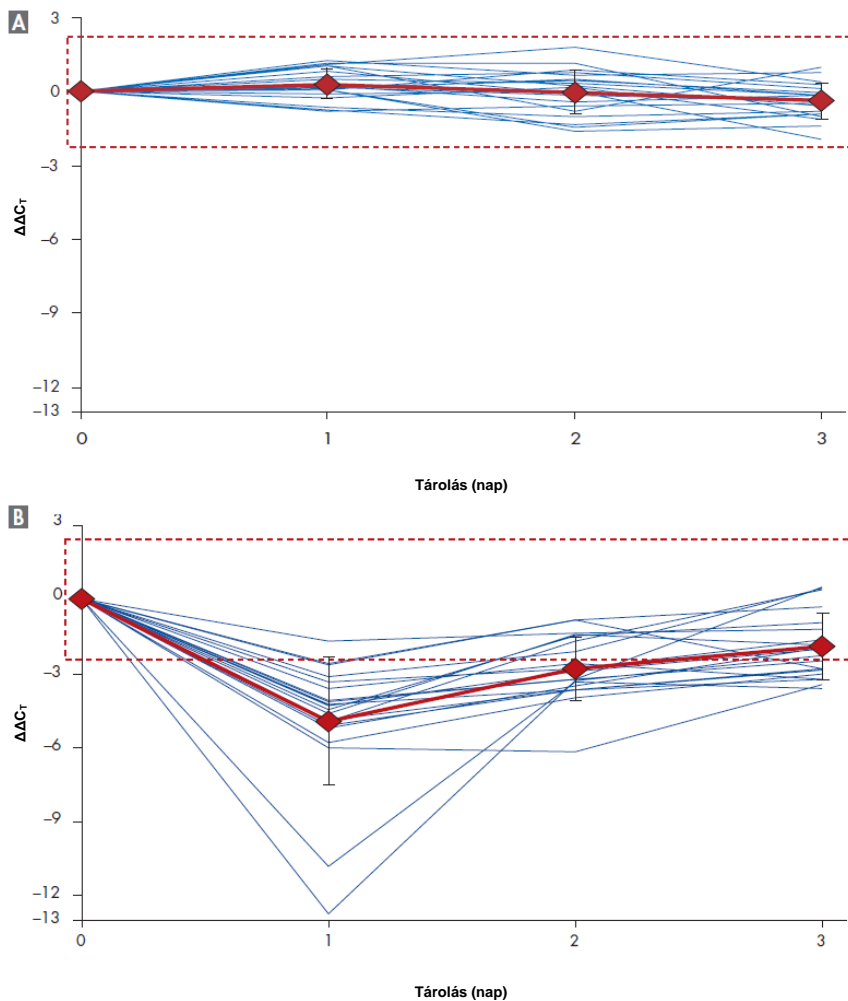
* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

Mintavétel és -stabilizálás

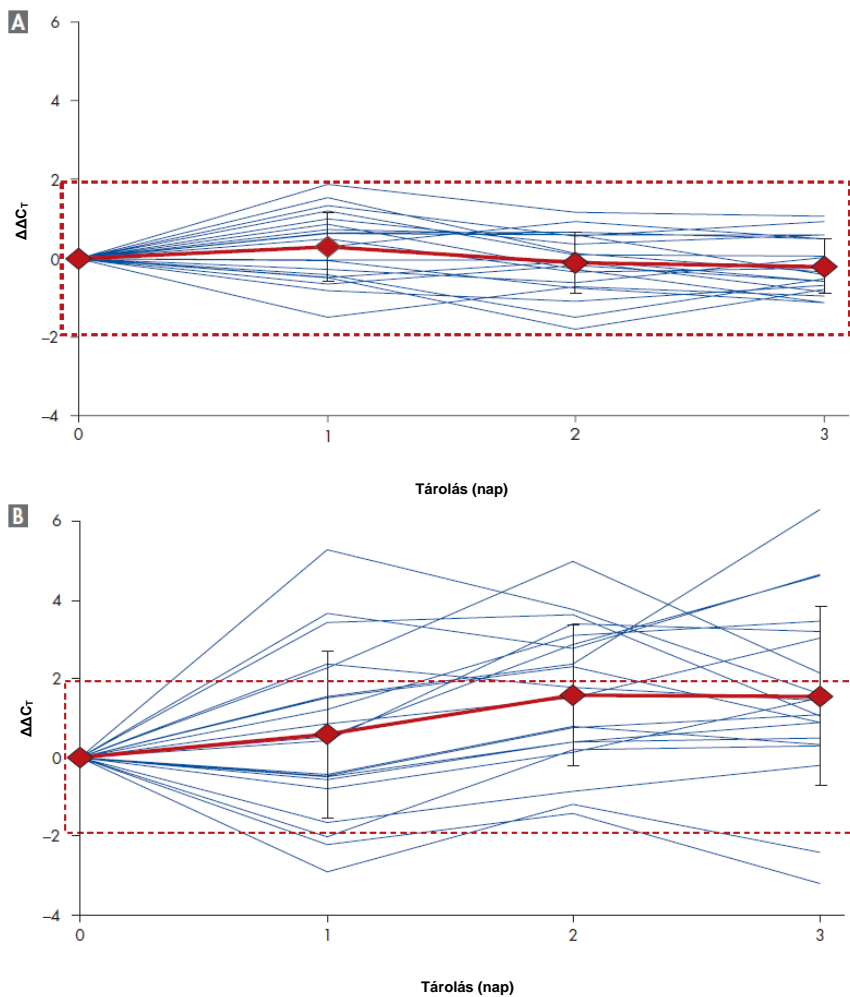
A PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek egy szabadalmazott RNS-stabilizálási technológián alapuló, védjegyzett reagenseleget tartalmaznak. Ez a reagenseleg megvédi az RNS molekulákat az RNázok általi lebomlástól, és minimalizálja a génexpresszió ex vivo változásait. A PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek rendeltetése a humán teljesvér-minták gyűjtése és a celluláris RNS stabilizálása 3 napig 18–25 °C-on (1. és 2. ábra, 15. és 16. oldal) vagy akár 5 napig 2–8 °C-on (3. és 4. ábra, 17. és 18. oldal). A jelenleg rendelkezésre álló adatok tanúsága szerint a celluláris RNS legalább 11 évre stabilizálható -20 °C-on vagy -70 °C-on*. A hosszabb időtartamú stabilitást kiértékelő, jelenleg is folyó vizsgálatokkal kapcsolatos további információkért forduljon a QIAGEN műszaki ügyfélszolgálatához.

Az RNS stabilizálás tényleges időtartama változhat a celluláris RNS típusától és a használt downstream alkalmazástól függően. A stabilizáció részletes leírásához validált géntranszkriptek korlátozott száma miatt (FOS és IL1B géntranszkriptek) a teljesítményjellemzőket nem állapították meg minden transzkriptre. A laboratórium dolgozóinak át kell tekinteniük a gyártó adatait és a saját adatokat annak eldöntéséhez, hogy szükséges-e más transzkriptek esetében is elvégezni a validálást.

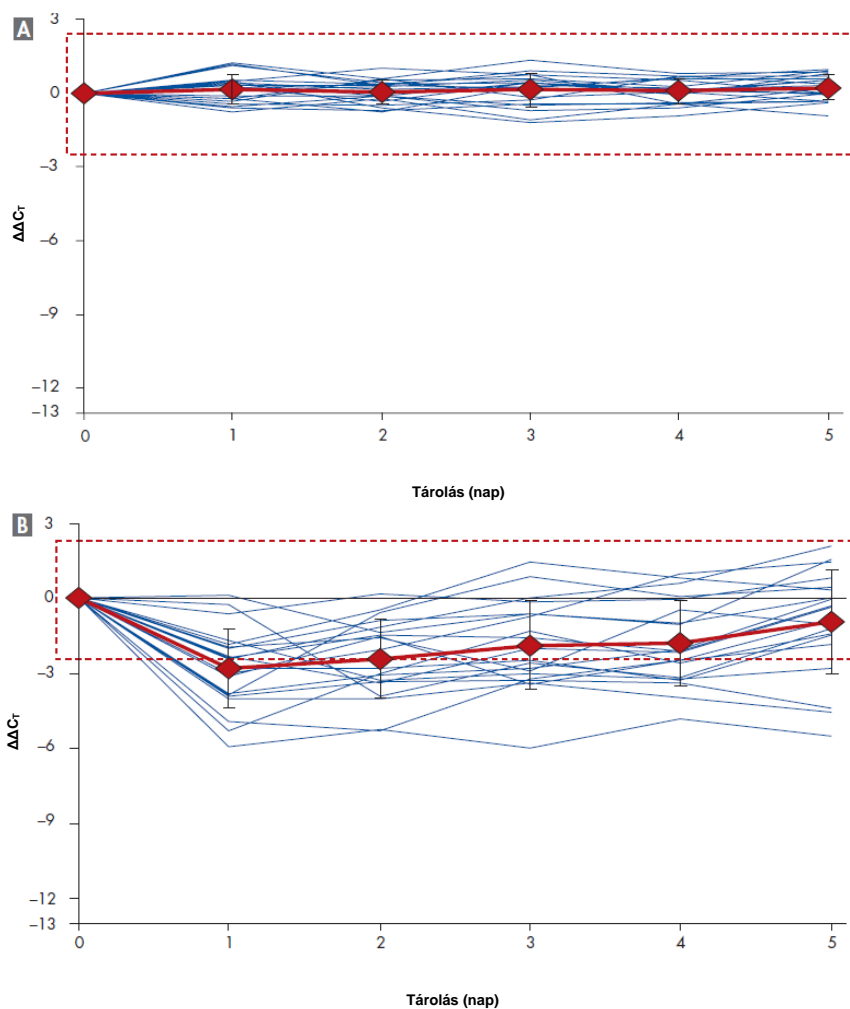
* Jelenleg is folyik a PAXgene Blood RNA Tubes mintacsövekben való vértárolás hosszú távú vizsgálata.



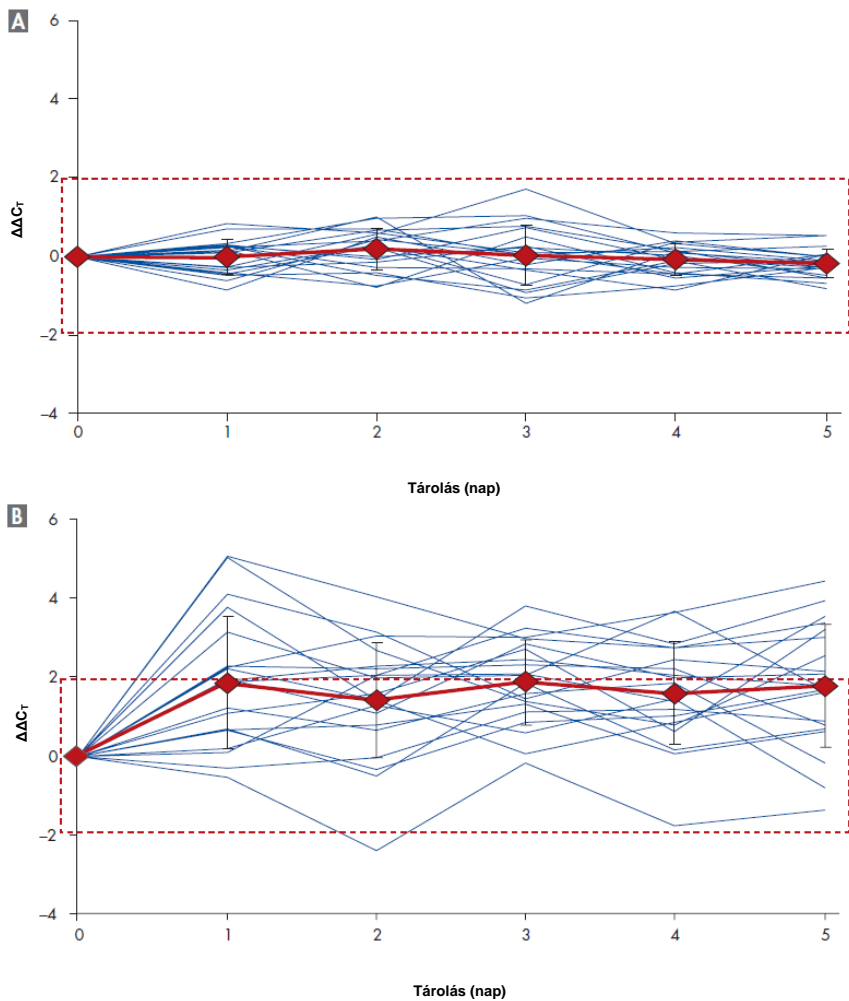
1. ábra: Az RNS stabilitása 18–25 °C-on tárolt vérmintákban: FOS. 10 donortól vettek két-két párhuzamos vérmintát, és 18–25 °C-on tárolták a mintákat a jelzett számú napon át, amit teljes RNS-tisztítás követett. **[A]** A levett vért PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekben gyűjtötték és tárolták, a teljes RNS-t pedig a PAXgene Blood RNA Kit használatával tisztították meg. **[B]** A levett vért szabványos mintacsövekben gyűjtötték és tárolták, véralvadásgátlóként EDTA hozzáadásával, a teljes RNS-t pedig egy standard szerves extrakciós módszer segítségével tisztították meg, szilikamembrán-alapú RNS-tisztítással. A FOS relatív transzkript szintjeit valós idejű, duplex RT-PCR segítségével határozták meg, 18S rRNS-t használva belső standardként. Minden egyes minta átlagértéke és az értékek szórása is látható a diagramokon. A szaggatott vonalak az assay $\pm 3x$ teljes precizitását jelzik ($2,34 C_T$).



2. ábra: Az RNS stabilitása 18–25 °C-on tárolt vérmintákban: IL1B. Vért vettek, és teljes RNS-t tisztítottak belőle 18–25 °C-on való tárolás után, az 1. ábránál feltüntetettek szerint. Az IL1B relatív transzkript szintjeit valós idejű, duplex RT-PCR segítségével határozták meg, 18S rRNS-t használva belső standardként. Minden egyes minta átlagértéke és az értékek szórása is látható a diagramokon. A szaggatott vonalak az assay $\pm 3\times$ teljes precizitását jelzik ($1,93 C_T$).



3. ábra: Az RNS stabilitása 2–8 °C-on tárolt vérmintákban: FOS. 10 donortól vettek két-két párhuzamos vérmintát, és 2–8 °C-on tárolták a mintákat a jelzett számú napon át, amit teljes RNS-tisztítás követett. **[A]** A levett vért PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekben gyűjtötték és tárolták, a teljes RNS-t pedig a PAXgene Blood RNA Kit használatával tisztították meg. **[B]** A levett vért szabványos mintacsövekben gyűjtötték és tárolták, véralvadástgátlóként EDTA hozzáadásával, a teljes RNS-t pedig egy standard szerves extrakciós módszer segítségével tisztították meg, szilikamembrán-alapú RNS-tisztítással. A FOS relatív transzkript szintjeit valós idejű, duplex RT-PCR segítségével határozták meg, 18S rRNS-t használva belső standardként. Minden egyes minta átlagértéke és az értékek szórása is látható a diagramokon. A szaggatott vonalak az assay $\pm 3\times$ teljes precizitását jelzik ($2,34 C_t$).



4. ábra: Az RNS stabilitása 2–8 °C-on tárolt vérmintákban: IL1B. Vért vettek, és teljes RNS-t tisztítottak belőle 2–8 °C-on való tárolás után, a 3. ábránál feltüntetettek szerint. Az IL1B relatív transzkript szintjeit valós idejű, duplex RT-PCR segítségével határozták meg, 18S rRNS-t használva belső standardként. Minden egyes minta átlagértéke és az értékek szórása is látható a diagramokon. A szaggatott vonalak az assay $\pm 3x$ teljes precizitását jelzik (1,93 C_T).

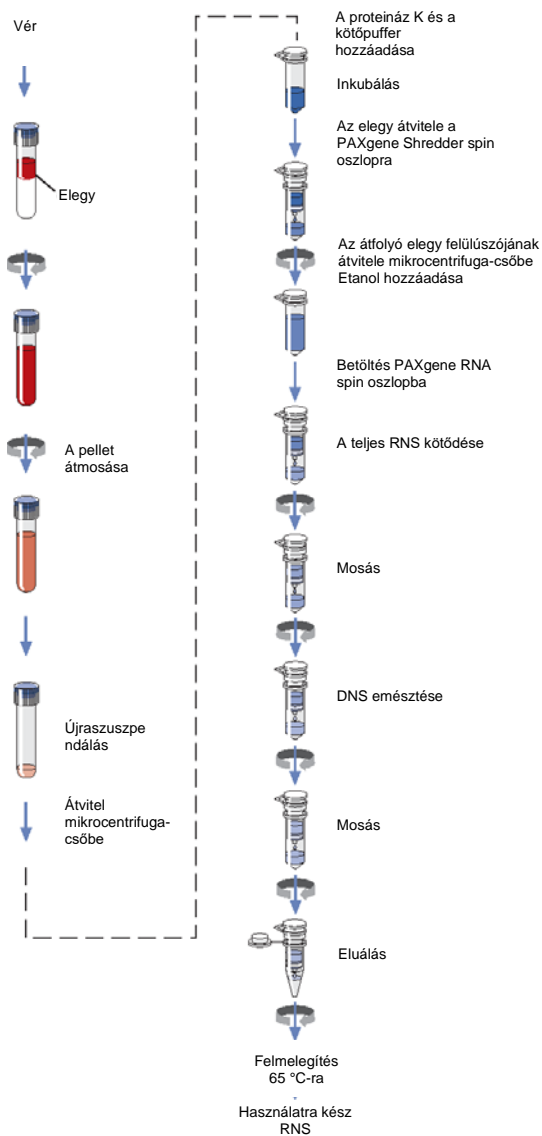
RNS-koncentráálás és -tisztítás

A PAXgene Blood RNA Kit a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsőbe gyűjtött 2,5 ml humán teljes vérből a teljes RNS tisztítására szolgál. Az eljárás egyszerű, és manuális vagy automatizált módon is kivitelezhető (lásd 5. és 10. ábra, 20. és 30. oldal). A tisztítási eljárás mindkét protokoll esetében egy centrifugálási lépéssel kezdődik, amely pelletet képez a nukleinsavakból a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsőben. A pellet mosását és újraszuszpendálását manuális vagy automatizált RNS-tisztítás követi. Az alapelveket tekintve mindkét protokoll ugyanazokat a lépéseket követi, ugyanazokat a kitkomponenseket felhasználva.

Manuális RNS-tisztítás

Az újraszuszpendált pelletet optimalizált pufferekben inkubálják proteináz K (PK) jelenlétében, hogy végbemenjen a protein megemésztése. Egy további centrifugálási lépés a PAXgene Shredder spin oszlopon (PSC) át homogenizálja a sejt-lizátumot, és eltávolítja a maradék sejttörmelékét, az átfolyó frakció felülúszója pedig ezután átkerül egy új mikrocentrifuga-csőbe. Ehhez etanolt adnak, hogy beállítsák a kötődési feltételeket, és a lizátumot egy PAXgene RNA spin oszlopra (PRC) viszik. A rövid centrifugálás során az RNS szelektíven rákötődik a PAXgene szilikamembránra, miközben a szennyező anyagok áthatolnak rajta. A maradék szennyező anyagokat több hatékony mosási lépéssel távolítják el. Az első és második mosási lépés között a membránt DNáz I (RNFD) reagenssel kezelik, hogy eltávolítsák a nyomnyi mennyiségben odakötődött DNS-t. A mosási lépések után az RNS-t az eluáló pufferben (BR5) eluálják, és hődenaturálják.

A PAXgene Blood RNA System használatával megtisztított teljes RNS tiszta és szennyeződésmentes. A manuális protokoll használatával a kapott A_{260}/A_{280} értékek 1,8 és 2,2 közé esnek, és $\leq 1\%$ (w/w) genomiális DNS van jelen az összes minta $\geq 95\%$ -ában, a béta-aktin gén egy szekvenciájának kvantitatív, valós idejű PCR-rel történő mérése alapján. A minták legalább 95%-a nem mutat gátlást RT-PCR-ben, az eluátum max. 30%-ának használatával.

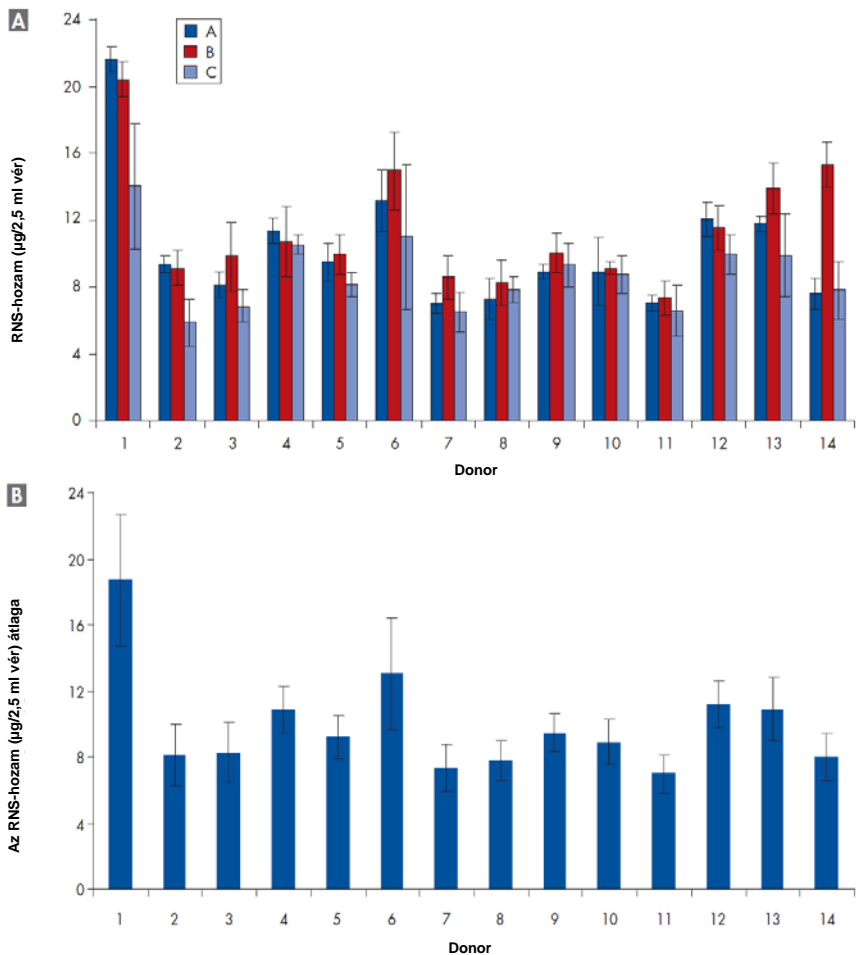


5. ábra: A manuális PAXgene Blood RNA eljárás.

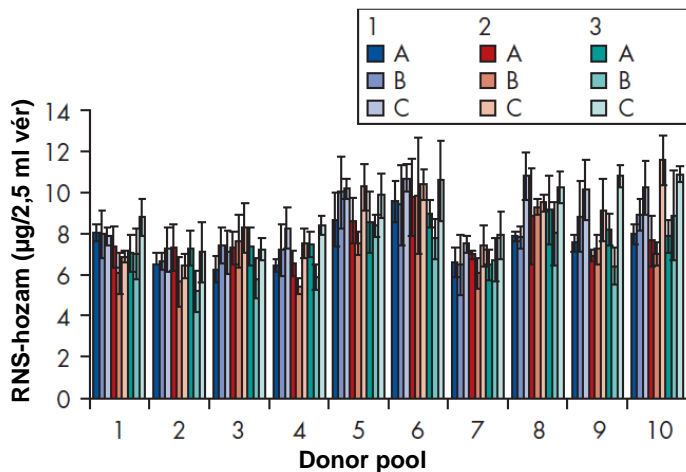
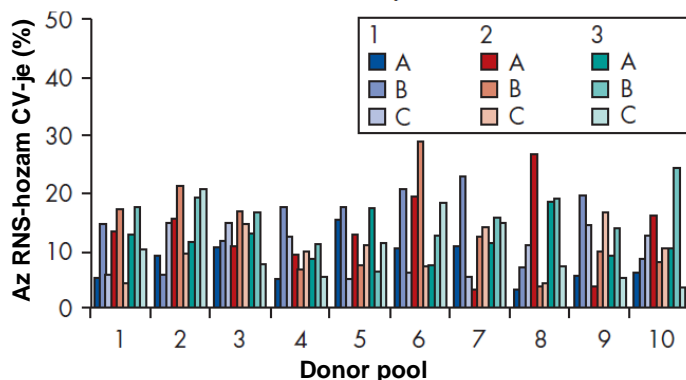
A manuális protokoll használatával az átlagos minta-előkészítési idő (12 minta-előkészítés futtatásának adatai alapján) körülbelül 90 perc*, amelyből csupán 40 perc a ténylegesen manuális munkával töltött idő. Az RNS-hozam 2,5 ml egészséges humán teljes vérből $\geq 3 \mu\text{g}$ a feldolgozott minták $\geq 95\%$ -ánál. Mivel a hozam erősen donorfüggő, az egyes hozamok mértéke változó lehet. Az egyes donorok esetében a PAXgene Blood RNA system igen jól reprodukálható és megismételhető hozamokat biztosít (6. és 7. ábra, 22. és 23. oldal), és reprodukálható és megismételhető RT-PCR reakciót eredményez (8. és 9. ábra, 27. és 28. oldal), ami igen robusztus eljárásá teszi a klinikai diagnosztikai vizsgálatokban.

A 6. ábra (22. oldal) mutatja a PAXgene Blood RNA System teljes megismételhetőségét és reprodukálhatóságát. További tanulmányokat végeztek, hogy kimutassák, milyen hatással vannak a különböző PAXgene Blood RNA Kit tételek és a kísérletet végző különböző személyek az RNS-hozam és a valós idejű RT-PCR futtatás teljesítményének reprodukálhatóságára. Ezen vizsgálatokhoz poolozott vérmintákat használtak az egyedi PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek mintái helyett, így a kapott eredmények nem tükrözik a rendszer megismételhetőségét – az egyes vérvételek közötti ingadozásokat is beleértve –, csupán a minta-előkészítés megismételhetőségét (lásd 7. ábra, 23. oldal).

* A teljes protokoll futási ideje, beleértve a PAXgene Blood RNA Tubes mintacsövek tényleges kezelését is (centrifugálások, pelletmosás és -újrasuszpendálás).



6. ábra: Reprodukálható és megismételhető RNS-tisztítás. Összesen 14 donortól vettek négy-négy párhuzamos vérmintát, amelyeket manuálisan dolgozott fel 3 szaktechnikus (A, B, C). Három külön eszközkészletet használtak, és az egyes technikusok által előkészített mintákat ugyanazon eszközökkel dolgozták fel. **[A]** Az ábrán az azonos donortól származó párhuzamos minták különböző szaktechnikusok által nyert RNS-hozamának átlagértékei és szórásai láthatók. **[B]** A 14 donor mindegyikétől vett tizenkét párhuzamos vérmintát a 3 különböző szaktechnikus dolgozta fel. Az ábrán az azonos donortól származó minták és az összes szaktechnikus által nyert RNS-hozamok átlagértékei és szórásai láthatók. Az A_{260}/A_{280} arányok az összes RNS-minta esetében 1,8 és 2,2 közé estek.

A**B**

7. ábra: Az RNS-hozam megismételhetősége és reprodukálhatósága a különböző kezelők és PAXgene Blood RNA Kit tételek esetében, poolozott vérminták használatával. 30 különböző donortól származó vérmintákat PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekbe gyűjtöttek; (12 tesztsző donoronként, összesen 360 tesztsző). 3 donoronként a tesztszővek tartalmát egybeöntötték, majd azt követően újra szétadagolták 36 alikvotba. A 3 donortól származó 36 minta poolját azután manuálisan dolgozta fel 3 különböző kezelő. Minden egyes kezelő 3 különböző tételből származó PAXgene Blood RNA Kitet használt az extraháláshoz, és a 10 donor mintapool mindegyikéből négy párhuzamos mintát dolgozott fel. **[A]** Az RNS-hozam átlaga és szórása az összes kezelő-tétel kombináció esetében. 3 különböző kezelő (A, B, C) dolgozta fel a 10 donor mintapool négy párhuzamos vérmintáját a 3 tételből származó kitek (1, 2, 3) mindegyikével. Az ábrán az ugyanazon donor pooljából származó négy párhuzamos minta átlag hozamai (oszlopok) és szórásai (hibasávok) láthatók a különböző kezelők és különböző tételek esetében. **[B]** A donor poolonkénti RNS-hozam CV-je az összes kezelő-tétel kombináció (A, B, C; 1, 2, 3) esetében, a 7A. ábrán látható átlag hozamok és szórásaik alapján számolva.

1A. táblázat: Reprodukálhatóság az egyes tételeken és az egyes felhasználókon belül, kiválasztott donor mintapoolok (1, 6, 9, 10) esetében

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

1B. táblázat: Reprodukálhatóság az egyes felhasználókon belül az összes tétel között, kiválasztott donor mintapoolok (1, 6, 9, 10) esetében

Adatkombináció	1. donor pool 5,1 x 10 ⁶ sejt/ml			6. donor pool 6,5 x 10 ⁶ sejt/ml		
	Átlag hozam (µg)	Szórás (µg)	CV (%)	Átlag hozam (µg)	Szórás (µg)	CV (%)
A felhasználó, az összes tétel	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
B felhasználó, az összes tétel	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
C felhasználó, az összes tétel	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Adatkombináció	9. donor pool 8,4 x 10 ⁶ sejt/ml			10. donor pool 10,2 x 10 ⁶ sejt/ml		
	Átlag hozam (µg)	Szórás (µg)	CV (%)	Átlag hozam (µg)	Szórás (µg)	CV (%)
A felhasználó, az összes tétel	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
B felhasználó, az összes tétel	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
C felhasználó, az összes tétel	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

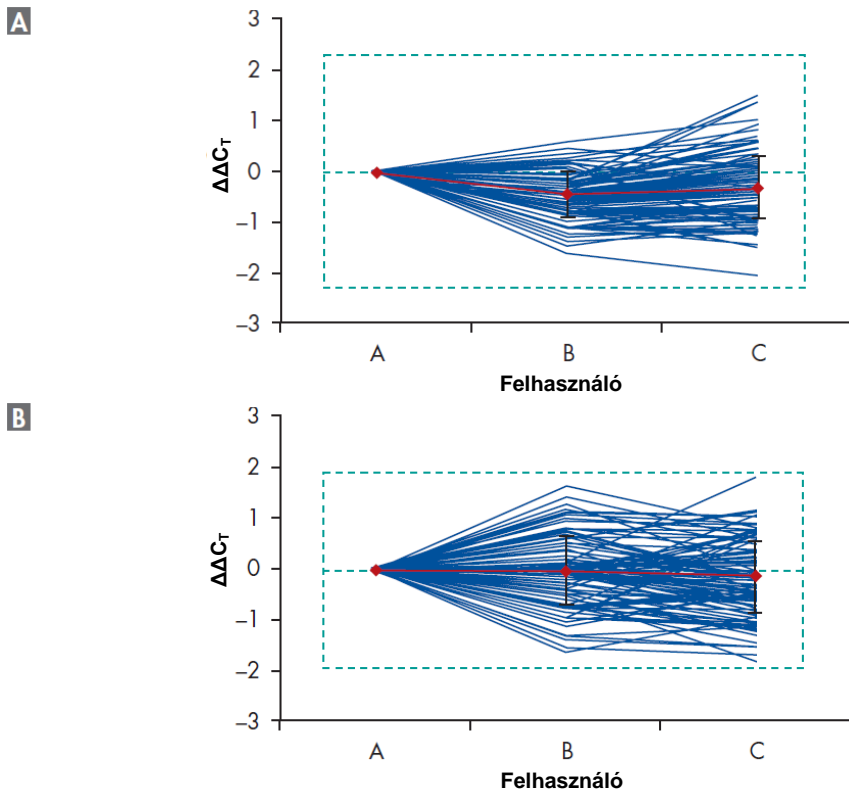
1C. táblázat: Reprodukálhatóság az egyes tételeken belül az összes felhasználó között, kiválasztott donor mintapoolok (1, 6, 9, 10) esetében

Adatkombináció	1. donor pool 5,1 x 10 ⁶ sejt/ml			6. donor pool 6,5 x 10 ⁶ sejt/ml		
	Átlag hozam (µg)	Szórás (µg)	CV (%)	Átlag hozam (µg)	Szórás (µg)	CV (%)
1. tétel, az összes felhasználó	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
2. tétel, az összes felhasználó	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
3. tétel, az összes felhasználó	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Adatkombináció	9. donor pool 8,4 x 10 ⁶ sejt/ml			10. donor pool 10,2 x 10 ⁶ sejt/ml		
	Átlag hozam (µg)	Szórás (µg)	CV (%)	Átlag hozam (µg)	Szórás (µg)	CV (%)
1. tétel, az összes felhasználó	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
2. tétel, az összes felhasználó	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
3. tétel, az összes felhasználó	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

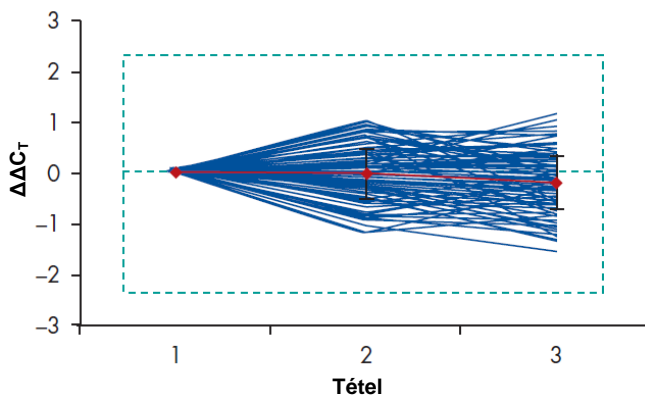
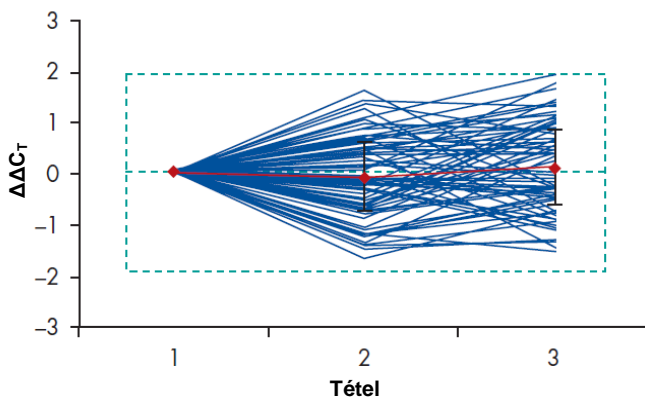
1D. táblázat: Reprodukálhatóság az összes tétel és az összes felhasználó között, kiválasztott donor mintapoolok (1, 6, 9, 10) esetében

Adatkombináció	1. donor pool 5,1 x 10 ⁶ sejt/ml			6. donor pool 6,5 x 10 ⁶ sejt/ml		
	Átlag hozam (µg)	Szórás (µg)	CV (%)	Átlag hozam (µg)	Szórás (µg)	CV (%)
1. tétel, az összes felhasználó	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
Adatkombináció	9. donor pool 8,4 x 10 ⁶ sejt/ml			10. donor pool 10,2 x 10 ⁶ sejt/ml		
	Átlag hozam (µg)	Szórás (µg)	CV (%)	Átlag hozam (µg)	Szórás (µg)	CV (%)
1. tétel, az összes felhasználó	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

A 4 reprezentatív donor pool részletes analízise. A poolok a fehérvérsejt-számlálás eredményei alapján lettek kiválasztva, úgy, hogy a fehérvérsejtszám normál tartományának ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocita/ml) felső, közép- és alsó értékeit tükrözzék. A feltüntetett fehérvérsejtszám a donor poolonkénti 3 donor 3 fehérvérsejt-számlálásának átlagértéke.



8. ábra: Az RT-PCR reprodukálhatósága — a felhasználók között. A valós idejű RT-PCR-hez a 7. ábránál vázolt kísérlet során tisztított RNS-t használták fel. Az **[A]** FOS és **[B]** IL1B relatív transzkript szintjeit valós idejű, duplex RT-PCR segítségével határozták meg, 18S rRNS-t használva belső standardként. A diagramok az összes minta értékeit ábrázolják az 1. felhasználó értékeinek függvényében (10 donor pool x 3 kit-tétel x 4 párhuzamos minta = 120 adatsor génenként), feltüntetve az összes minta átlagait (vörös vonalak) és szórásait (fekete sávok). A szaggatott vonalak az assay-k $\pm 3x$ teljes precizitását jelzik (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).

A**B**

9. ábra: Az RT-PCR reprodukálhatósága — a kit-tételek között. A valós idejű RT-PCR-hez a 7. ábránál vázolt kísérlet során tisztított RNS-t használták fel. Az **[A]** FOS és **[B]** IL1B relatív transzkript szintjeit valós idejű, duplex RT-PCR segítségével határozták meg, 18S rRNS-t használva belső standardként. A diagramok az összes minta értékeit ábrázolják az 1. kit-tétel értékeinek függvényében (10 donor pool x 3 felhasználó x 4 párhuzamos minta = 120 adatsor génenként), feltüntetve az összes minta átlagait (vörös vonalak) és szórásait (fekete sávok). A szaggatott vonalak az assay-k $\pm 3\times$ teljes precizitását jelzik (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).

2. táblázat: A 8. és 9. ábra RT-PCR adatainak összefoglalása

Tesztrendszer	FOS/18S rRNS assay		IL1B/18S rRNS assay	
	Átlag ($\Delta\Delta C_T$)	\pm Szórás ($\Delta\Delta C_T$)	Átlag ($\Delta\Delta C_T$)	\pm Szórás ($\Delta\Delta C_T$)
Reprodukálhatóság az egyes felhasználókon belül az összes tétel között				
Minden felhasználó, 1. tétel–1. tétel	0,00	0,00	0,00	0,00
Minden felhasználó, 1. tétel–2. tétel	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Minden felhasználó, 1. tétel–3. tétel	-0,21	0,52	0,11	0,71
Reprodukálhatóság az egyes felhasználókon belül az összes tétel között				
Minden tétel, A felhasználó–A felhasználó	0,00	0,00	0,00	0,00
Minden tétel, A felhasználó–B felhasználó	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Minden tétel, A felhasználó–C felhasználó	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Felhasználó: Az a szaktechnikus, aki elvégezte a vizsgálatot.

Tétel: A vizsgálat során használt kit-tétel száma.

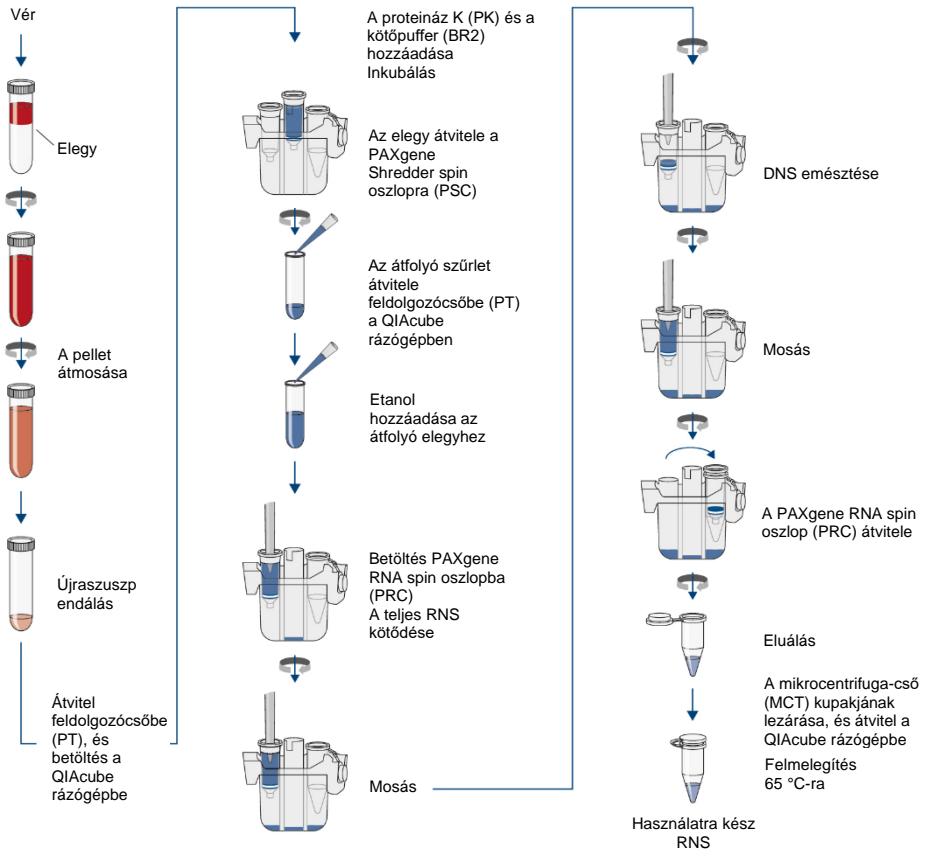
Szórás: Standard deviáció (SD).

Az átlag $\Delta\Delta C_T$ értékek (N = 120) és a szórások a 8. és 9. ábra adataira vonatkoznak.

Automatizált RNS-tisztítás

A minta-előkészítés automatizálható a standard QIAcube® készülék (katalógusszám: 9001882 [110 V], katalógusszám: 9001293 [230 V]; nem tartalmazza a QIAcube Connect elemet) használatával, ugyanazokat a lépéseket követve, mint a manuális eljárás – ez lehetővé teszi, hogy továbbra is a PAXgene Blood RNA Kitet használja a jó minőségű RNS tisztítása céljából. A QIAcube készülékkel kapcsolatos további információkért lásd a *QIAcube felhasználói kézikönyv* (QIAcube User Manual) kézikönyvet és a www.qiagen.com/MyQIAcube weboldalt.

Az automatizált RNS-tisztítási protokoll 2 részből (vagy alprotokollból) áll, a „PAXgene Blood RNA Part A” és a „PAXgene Blood RNA Part B” részből, és a 2 rész között rövid manuális beavatkozás szükséges (lásd 10. ábra, 30. oldal).



10. ábra: Az automatizált PAXgene Blood RNA eljárás.

A lecentrifugált, mosott és újraszuszpendált nukleinsav pelletet (lásd „RNS-koncentráció és -tisztítás”, 19. oldal) átviszik a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsőből feldolgozócsővekbe (PT), amelyeket behelyeznek a QIAcube munkaasztalán elhelyezkedő rázótermosztát egységbe. A kezelő kiválasztja és elindítja a „PAXgene Blood RNA Part A” protokollt a menüből. A QIAcube végrehajtja a protokoll lépéseit egészen az RNS eluáló pufferben való (BR5) eluálásáig. A kezelő átrakja a tisztított RNS-t tartalmazó

mikrocentrifuga-csőveket (MCT) a QIAcube készülék rázótermosztát egységébe. A kezelő kiválasztja és elindítja a „PAXgene Blood RNA Part B” protokollt a menüből, és a QIAcube elvégzi a hődenaturálást.

Az átlagos minta-előkészítési idő (12 minta-előkészítés futtatásának adatai alapján) 151 perc*, amelyből szignifikánsan kevesebb a ténylegesen manuális munkával töltött idő a manuális protokollhoz képest.

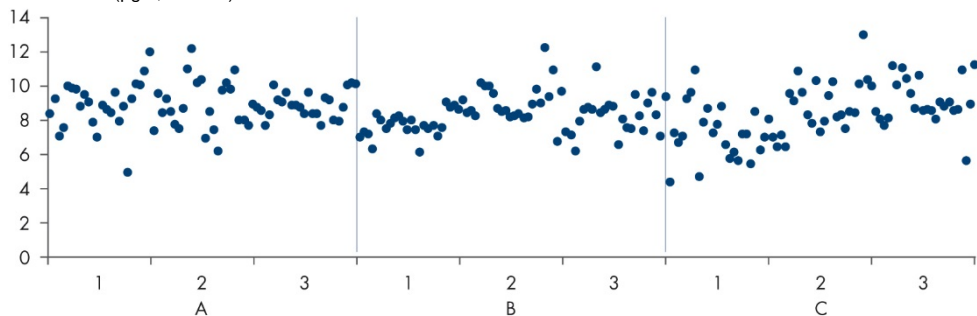
Az RNS-hozam 2,5 ml egészséges humán teljes vérből $\geq 3 \mu\text{g}$ a feldolgozott minták $\geq 95\%$ -ánál. A 11. ábra (32. oldal) mutatja az automatizált protokoll alkalmazásával, 3 kezelő által és 3 kit-tétel használatával előkészített, összesen 216 db mintából származó RNS-hozamokat. Mivel az egyedi PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek helyett poolozott vérmintákat használtak ezekhez a vizsgálatokhoz, az eredmények nem tükrözik az egyedi vérvételek mintáiból várható RNS-hozamot. Mivel a hozam erősen donorfüggő, az egyes hozamok mértéke változó lehet (11. ábra, 32. oldal).

A minták legalább 95%-a nem mutat gátlást RT-PCR-ben, az eluátum max. 30%-ának használatával. Az automatizált protokoll használatával nem detektálható a minták között keresztzennyeződés ABL1 és FOS transzkriptek szekvenciáinak kvantitatív, valós idejű RT-PCR vizsgálata alapján, ahol RNS-negatív minták (víz) RNS-pozitív mintákkal (humán teljes vér) lettek párosítva ugyanabban a futtatásban.

A PAXgene Blood RNA System és az automatizált protokoll által tisztított RNS tiszta, amint azt az RT-PCR inhibíció hiánya (lásd 11. ábra, 32. oldal), valamint az A_{260}/A_{280} értékek 1,8 és 2,2 közötti értéke is mutatja. Genomiális DNS $\leq 1\%$ (w/w) mértékben van jelen az összes minta $\geq 95\%$ -ában, a béta-aktin gén egy meghatározott szekvenciájának kvantitatív, valós idejű PCR-rel való mérése alapján. A 12. és 13. ábra (32. és 33. oldal) bemutatja az automatizált protokoll alkalmazásával, 3 kezelő által és 3 kit-tétel használatával előkészített, összesen 216 db minta A_{260}/A_{280} értékeit és relatív genomiális DNS-eit.

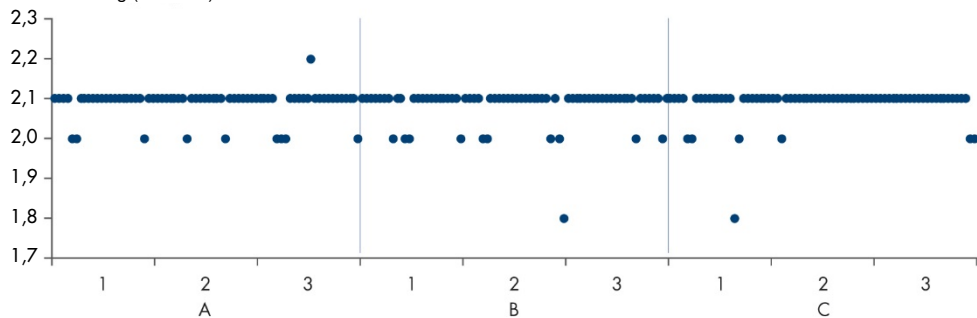
* A teljes protokoll futási ideje, beleértve a PAXgene Blood RNA Tubes mintacsövek tényleges kezelését is (centrifugálások, pelletmosás és -újrasszuszpendálás).

RNS-hozam ($\mu\text{g}/2,5 \text{ ml}$ vér)



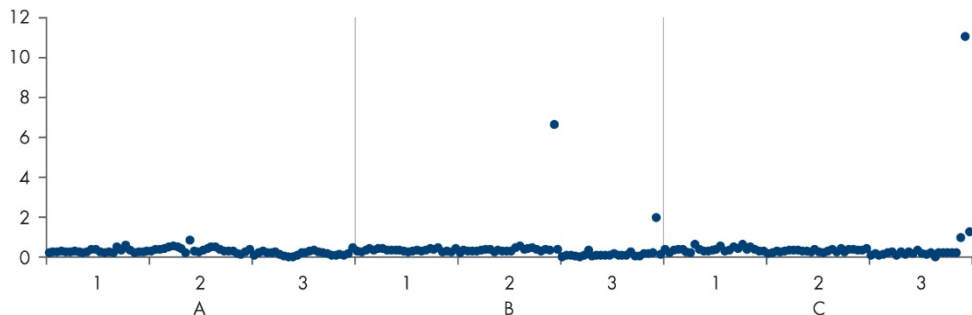
11. ábra: RNS-hozam — automatizált feldolgozás. 36 különböző donortól származó vérmintákat PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekbe gyűjtötték; (6 tesztcső donoronként, összesen 216 tesztcső). 6 donoronként a tesztcsövek tartalmát egybeöntötték, majd azt követően újra szétadagolták 36 alikotba. A 6 donortól származó 36 minta poolját azután 3 különböző kezelő dolgozta fel (A, B, C). Minden egyes kezelő 3 különböző tételből (1, 2, 3) származó PAXgene Blood RNA Kitet használt az automatizált extraháláshoz, és a 6 donor mintapool mindegyikéből négy párhuzamos mintát dolgozott fel. Az ábrán látható az összes egyedi minta RNS-hozama minden kezelő–tétel kombináció esetén.

RNS-tisztaság (A_{260}/A_{280})



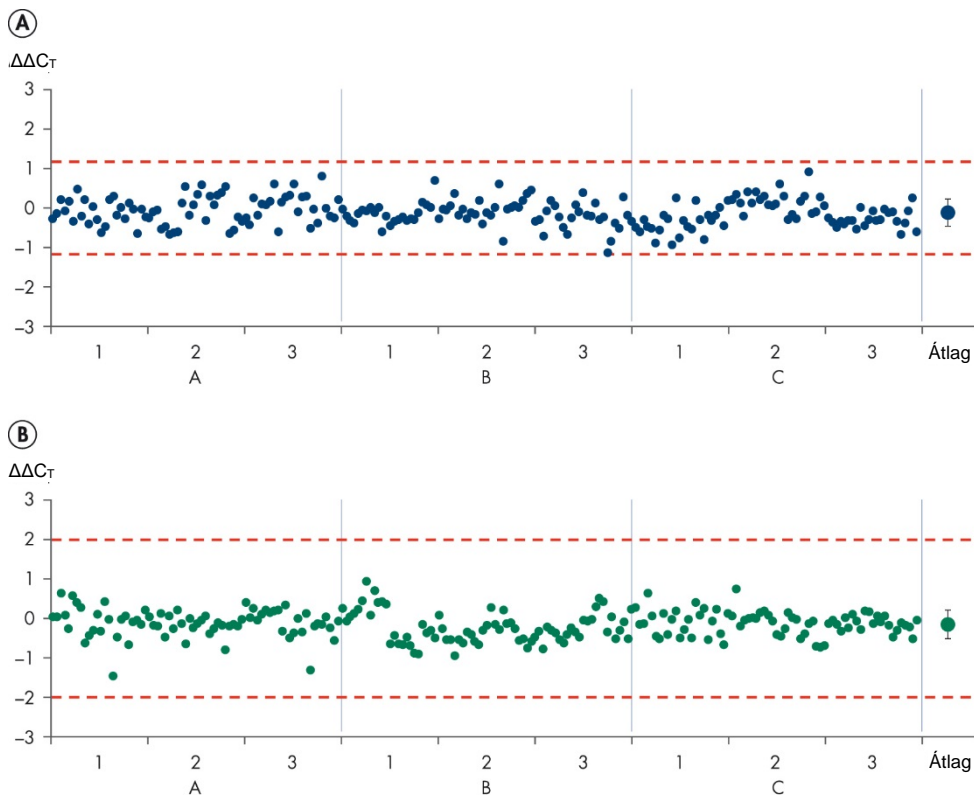
12. ábra: RNS-tisztaság (A_{260}/A_{280} értékek) — automatizált feldolgozás. A minta RNS-t 3 különböző kezelő (A, B, C) tisztította meg, a PAXgene Blood RNA Kit 3 különböző tétele (1, 2, 3) használatával, a 11. ábránál leírt kísérlet során. Az ábrán látható az összes egyedi minta A_{260}/A_{280} értéke minden kezelő–tétel kombináció esetén.

Genomiális DNS (%) (w/w)



13. ábra: RNS-tisztaság (%-os genomiális DNS fertőzöttség) — automatizált feldolgozás. A minta RNS-t 3 különböző kezelő (A, B, C) tisztította meg, a PAXgene Blood RNA Kit 3 különböző tétele (1, 2, 3) használatával, a 11. ábránál leírt kísérlet során. Az ábrán látható az összes egyedi minta genomiális DNS mennyisége (w/w) minden kezelő–tétel kombináció esetén.

A PAXgene Blood RNA System automatizált protokollját használó RNS-tisztítás jól reprodukálható és megismételhető RT-PCR eredményeket biztosít – amint az a 14. ábrán (34. oldal) is látható –, ami igen robusztus eljárássá teszi a klinikai diagnosztikai vizsgálatokban.



14. ábra: Az RT-PCR reprodukálhatósága — az automatizált és manuális protokoll között. A minta RNS-t 3 különböző kezelő (A, B, C) tisztította meg, a PAXgene Blood RNA Kit 3 különböző tétele (1, 2, 3) használatával, az automatizált protokoll alkalmazásával, a 11. ábránál leírt kísérlet során. Ezzel párhuzamosan a manuális protokoll alkalmazásával is végeztek RNS-tisztítást a megfelelő párhuzamos mintacsövekből. Az **[A]** FOS és **[B]** IL1B relatív transzkript szintjeit valós idejű, duplex RT-PCR segítségével határozták meg, 18S rRNS-t használva belső standardként. A két extrakciós protokoll (automatizált és manuális) használatával, párosított vérmintákból előállított RNS-ek transzkript szintjei közötti lehetséges különbségeket a $\Delta\Delta C_T$ módszerrel számították ki. Minden egyes mintapár (4 párhuzamos x 6 donor pool x 3 kit-tétel x 3 kezelő = 216 pár génenként) egyedi $\Delta\Delta C_T$ értékei különálló pontként láthatók az ábrán, és a mintaátlagok (nagyobb pontok), illetve szórások (fekete sávok) is fel vannak tüntetve. A szaggatott vonalak az assay-k $\pm 3x$ teljes precizitását jelzik (FOS: 1,16 C_T ; IL1B: 1,98 C_T ; az 1–4., 8. és 9. ábrához viszonyított különböző precizitások oka az assayverziók különbözősége).

A felhasználó által biztosítandó eszközök és reagensek

Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. További információkat a megfelelő biztonsági adatlapok (SDS-ek) tartalmaznak, amelyek az adott termék gyártójától szerezhetők be.

Mindkét protokollhoz szükséges

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek (katalógusszám: 762165)
- Etanol (96–100%, analitikai tisztaságú)
- Pipetták* (10 µl – 4 ml)
- Steril, aeroszolgátas, RNáz-mentes pipettahegyek†
- Mérőhenger‡
- 3000–5000 x g elérésére képes, kilendülő fejes rotorral és a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekhez alkalmazandó tartókosárral felszerelt centrifuga*
- Vortex keverő*
- Jégzúzalék
- Alkoholos filctoll a címkézéshez

* Ügyeljen rá, hogy a műszerek a gyártó javaslatai szerint rendszeresen legyenek ellenőrizve, karbantartva és kalibrálva.

† Győződjön meg róla, hogy ismeri az RNS kezelésének irányelveit („A” függelék, 64. oldal).

‡ Az etanol BR4 puffer koncentrációjához adásához.

A manuális protokollhoz szükséges

- Változtatható sebességű mikrocentrifuga*, amely képes elérni legalább az 1000–8000 x *g* tartományt, bár alacsonyabb és magasabb *g*-erőhatások is alkalmazhatók (a részletekért lásd a protokoll lépéseit), és fel van szerelve 2 ml-es mikrocentrifugacsövek tartására alkalmas rotorral
- Rázóinkubátor*, amely képes 55 °C-on és 65 °C-on inkubálni, és ≥400 rpm, de 1400 rpm alatti sebességgel rázatni (pl. Eppendorf® Thermomixer Compact vagy azzal egyenértékű készülék)

Az automatizált protokollhoz szükséges

- QIAcube* (QIAGEN, katalógusszám: 9001882 [110 V], katalógusszám: 9001293 [230 V])
- Olló

QIAcube fogyóeszközök

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

QIAcube tartozékok

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

* Ügyeljen rá, hogy a műszerek a gyártó javaslatai szerint rendszeresen legyenek ellenőrizve, karbantartva és kalibrálva.

[†] Része a Starter Pack, QIAcube indulócsomagnak is (QIAGEN, katalógusszám: 990395)

Fontos megjegyzések

A QIAcube használata

Győződjön meg róla, hogy ismeri a QIAcube készülék működtetésének módját. Kérjük, olvassa el a *QIAcube felhasználói kézikönyvet* és a QIAcube készülékhez mellékelt bármely további tájékoztatót, különös figyelmet fordítva a biztonsági információkra, mielőtt nekikezdené az automatizált PAXgene Blood RNA protokoll használatának.

A QIAcube készülék elindítása

Zárja be a QIAcube ajtaját, és kapcsolja be a QIAcube készüléket a főkapcsolóval (lásd 15. ábra, 38. oldal).

Sípoló hang hallatszik, és megjelenik az indulóképernyő. A készülék automatikusan elvégzi az inicializálási teszteket.

Protokollok telepítése a QIAcube készülékre

Először telepíteni kell a protokollokat, mielőtt futtathatná az első RNS-előkészítést a QIAcube készüléken. Telepítse a „PAXgene Blood RNA Part A” és „PAXgene Blood RNA Part B” protokollt egyaránt.

A protokollokat megtalálja a **www.qiagen.com/MyQIAcube** címen; le kell őket tölteni a QIAcube készülék mellé biztosított USB-adathordozóra, és át kell őket tenni a QIAcube készülékre az USB-porton keresztül.

A védőlemez mögött található USB-port (lásd 15. ábra, 38. oldal) lehetővé teszi, hogy csatlakoztasson a QIAcube készülékhez egy USB-adathordozót (a QIAcube készülékhez mellékelve). Az USB-porton keresztül adatfájlok, például naplófájlok vagy jelentésfájlok is átvihetők a QIAcube készülékről az USB-adathordozóra.



Az USB-portot kizárólag a QIAGEN által biztosított USB-adathordozóval használja. Ne csatlakoztasson más eszközöket ehhez a porthoz.



Ne távolítsa el az USB-adathordozót, miközben protokollokat tölt le, adatfájlokat másol át, vagy protokollt futtat.



15. ábra: A QIAcube előlnézetben.



Érintőképernyő



Ajtó



RS232 soros port a védőlemez mögött (kizárólag a QIAGEN képesített képzélszervizes szakemberei számára)



USB-port a védőlemez mögött



Főkapcsoló



Hulladékfiók

A QIAcube készülék előkészítése

Hogy időt takarítson meg, az előkészítést az egyik vagy mindkét 10 perces centrifugálási lépés alatt is elvégezheti (3. és 5. lépés), lásd „Protokoll: Teljes RNS automatizált tisztítása PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekbe gyűjtött humán teljes vérből”, 55. oldal.

Reagenspalackok

A QIAcube készüléken való minden futtatás előtt gondosan töltsse fel a 4 db reagenspalackot a 3. táblázatban felsorolt reagensekkel a maximum szintet jelző vonalig, vagy ha ez nem lehetséges, akkor addig a szintig, amit a PAXgene Blood RNA Kitben kapott puffertérfogatok lehetővé tesznek. Világosan és egyértelműen tüntesse fel a palackokon és kupakjukon az adott puffer nevét, és helyezze a feltöltött reagenspalackokat a megfelelő pozícióba a reagenspalackok tartóállványán. Helyezze rá a tartóállványt a QIAcube munkaasztalára, amint azt a 16. és 17. ábra mutatja (40. és 41. oldal).



A kitben található BR2 puffer térfogata nem elegendő ahhoz, hogy a jelig feltöltse a reagenspalackot. A BR3 és BR4 pufferek nem feltétlenül elegendők ahhoz, hogy a jelig feltöltsék a reagenspalackokat, ha a korábbi futtatásokban már számos mintát feldolgoztak.



Ügyeljen rá, hogy eltávolítsa a palackok kupakját, mielőtt ráhelyezi őket a munkaasztalra.

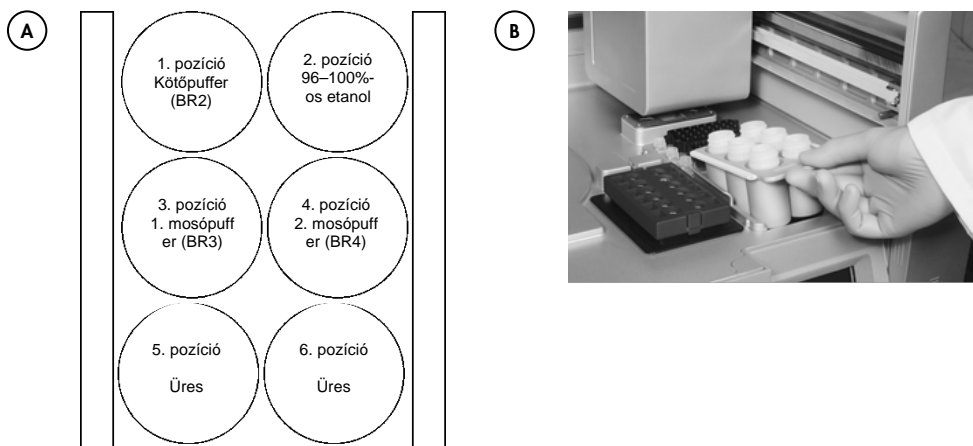


A PAXgene Blood RNA Kitben (50) rendelkezésre álló puffertérfogatok maximum 7 RNS-tisztítási futtatásra elegendők a QIAcube készüléken, futtatásonként 2 és 12 közötti mintaszám mellett. Általában véve az alacsonyabb mintaszámú futtatások kerülendők annak érdekében, hogy kitenként összesen 50 minta feldolgozható legyen maximum 7 RNS-tisztítási futtatással. A több mint 7 RNS-tisztítási futtatás ahhoz vezethet, hogy az utolsó minták feldolgozásához már nem marad elegendő térfogatú puffer.

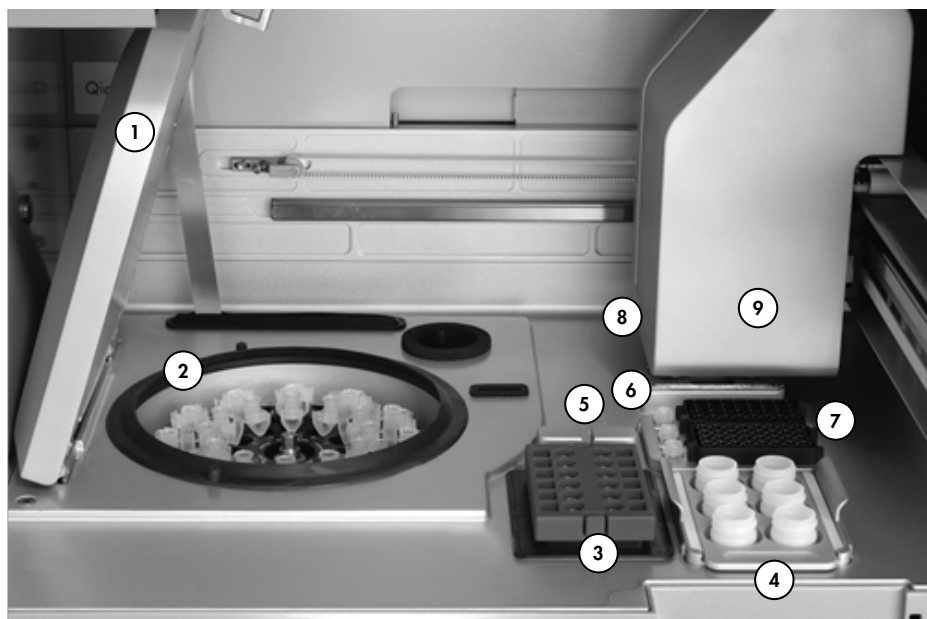
3. táblázat: Pozíciók a reagenspalackok tartóállványán

Pozíció	Reagens
1	Kötőpuffer (BR2)
2	96–100%-os etanol
3	1. mosópuffer (BR3)
4	2. mosópuffer (BR4)*
5	– (hagyja üresen)
6	– (hagyja üresen)

* A 2. mosópuffer (BR4) tömény formában található a kitben. Az első használat előtt adjon hozzá 4-szeres térfogatú (96–100%-os, analitikai tisztaságú) etanolt a palackon feltüntetettek szerint a munkaoldat előállításához.



16. ábra: A reagenspalackok tartóállványának betöltése. [A] A reagenspalackok tartóállványán elhelyezendő palackok pozíciójának és tartalmának sematikus ábrája. [B] A tartóállvány ráhelyezése a QIAcube munkaasztalára.



17. ábra: A QIAcube belseje.

- | | | | |
|---|-------------------------------|---|--|
| 1 | Centrifugafedél | 6 | Mikrocentrifuga-csövek lyukai |
| 2 | Centrifuga | 7 | Hegytartó állványok |
| 3 | Rázógép | 8 | Pipettahegyek és oszlopok kidobására szolgáló nyílások |
| 4 | Reagenspalackok tartóállványa | 9 | Robotkar |
| 5 | Pipettahegyszenzor | | |

Spin oszlopok (PRC, PSC), mikrocentrifuga-csővek (MCT) és QIAcube műanyag eszközök

Helyezzen 2 db, 1000 µl-es szűrős pipettahegyekkel megtöltött hegytartó állványt a QIAcube munkaasztalára (lásd 17. ábra, 41. oldal). Amikor szükséges, töltsse fel újra pipettahegyekkel a tartóállványokat.



Kizárólag a QIAcube készülékkel való használatra tervezett, 1000 µl-es szűrős pipettahegyeket használjon.

Alkoholos filctollal jelölje meg minden egyes mintához a rotoradaptereket és mikrocentrifuga-csőveket (MCT). Nyissa fel a használandó PAXgene Shredder spin oszlopokat (PSC), és ollóval vágja le teljesen a kupakjukat (lásd 18. ábra, 43. oldal).



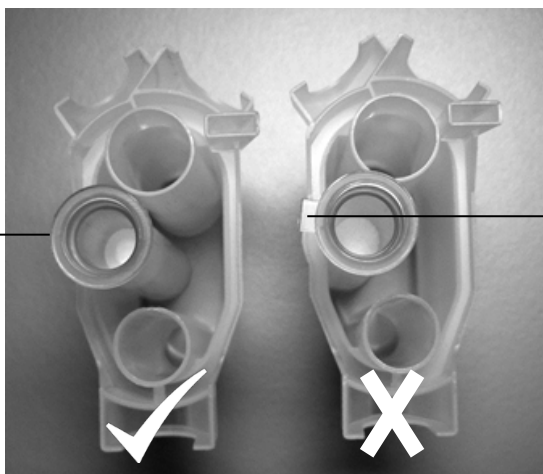
A QIAcube robotkar megfelelő működése érdekében teljesen távolítsa el (vágja le) a kupakokat és a kupakot a PAXgene Shredder spin oszlopokhoz (PSC) rögzítő minden műanyag részt (lásd 16. ábra). Máskülönben a robotkar nem tudja megfelelően megragadni a spin oszlopokat (PSC, PRC).

Helyezze be a PAXgene RNA spin oszlopot (PRC), a PAXgene Shredder spin oszlopot (PSC, kupak nélkül) és a feliratozott mikrocentrifuga-csövet (MCT) minden egyes jelölt rotoradapter megfelelő pozíciójába, a 4. táblázatban és a 19. ábrán (43. oldal) feltüntetettek szerint.



Ügyeljen rá, hogy a spin oszlop (PRC) és a mikrocentrifuga-cső (MCT) kupakjai egészen le legyenek nyomva a rotoradapter szélén lévő lyukak aláig, máskülönben a kupakok le fognak törni a centrifugálás közben.

Az oszlop kupakja helyesen eltávolítva



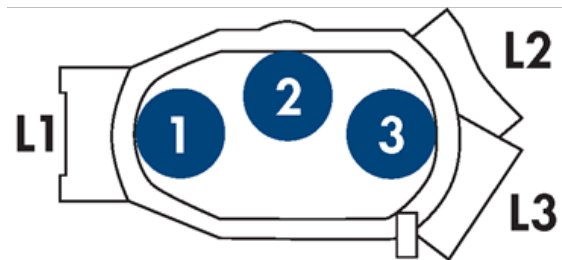
Az oszlop kupakja helytelenül eltávolítva; a kupak egy része az oszlopon maradt

18. ábra: A PAXgene Shredder spin oszlop (PSC) behelyezése. A PAXgene Shredder spin oszlopot (PSC) a rotoradapter középső pozíciójába kell behelyezni. Az oszlop (PSC) behelyezése előtt vágja le a kupakját.

4. táblázat: Laboreszközök a rotoradapterben

Pozíció	Reagens	Kupakpozíció
1	PAXgene RNA spin oszlop (vörös, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder spin oszlop (lila, PSC) (vágja le a kupakját, mielőtt behelyezi a rotoradapterbe)	–
3	Mikrocentrifuga-cső (MCT)*	L3

* A PAXgene Blood RNA Kitben található (1,5 ml-es) mikrocentrifuga-csőveket használja.



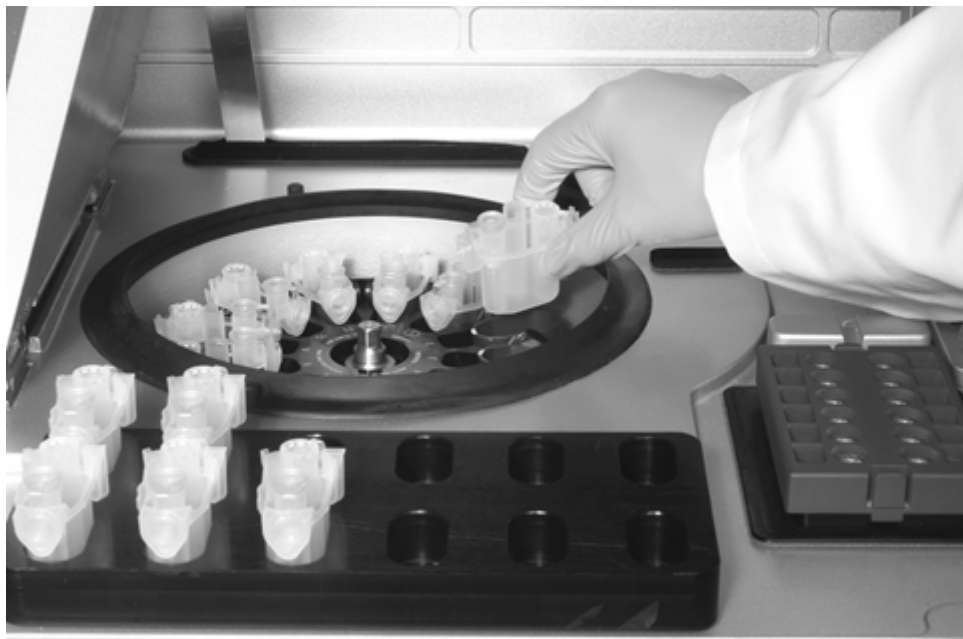
19. ábra: Pozíciók a rotoradapterben. A rotoradapterben három csőpozíció (1–3) és három kupakpozíció (L1–L3) van.

A centrifuga előkészítése

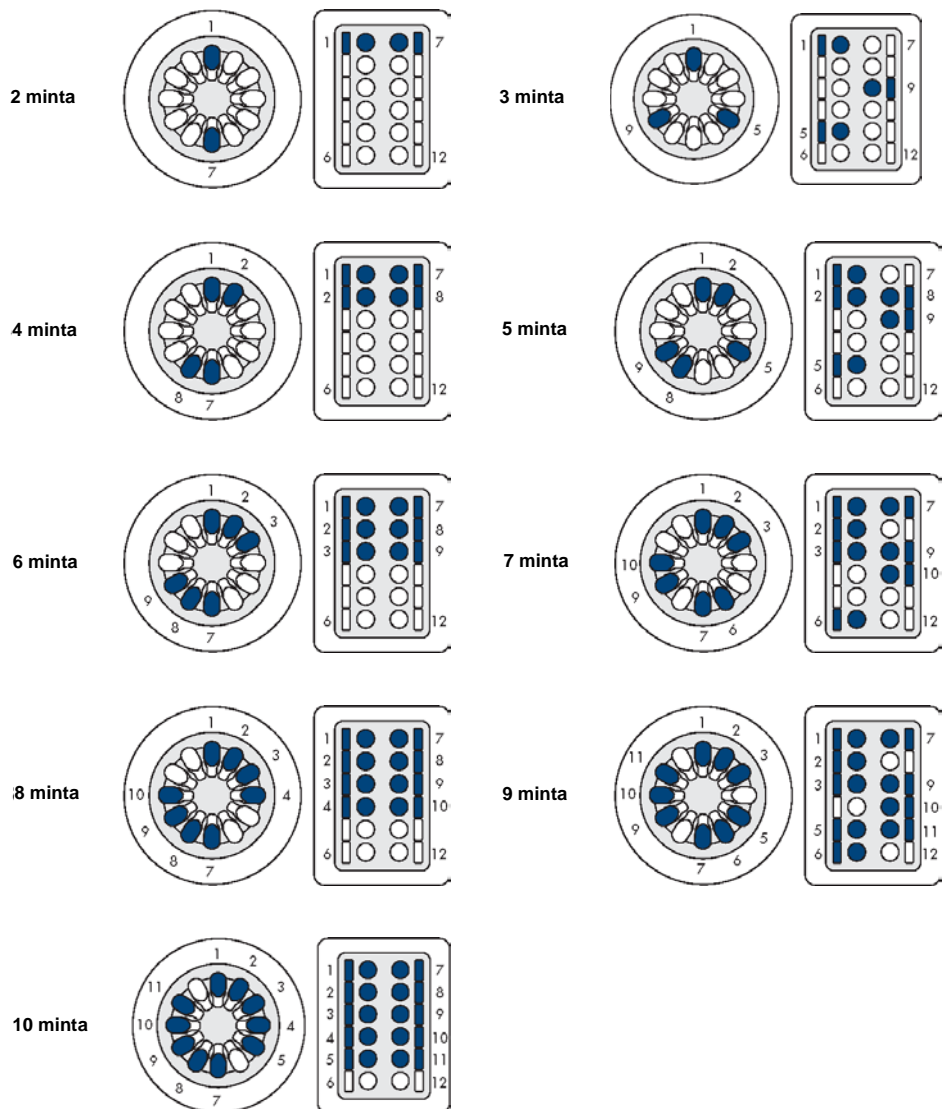
Helyezze be az összeszerelt rotoradaptereket a centrifuga kosaraiba, az alábbi 20. ábrán látottak szerint.



Ha 12 db mintánál kevesebbet dolgoz fel, ügyeljen rá, hogy sugarasan kiegyensúlyozva töltsse be az adaptereket a centrifuga rotorjába (lásd 21. ábra, 45. oldal). Az összes centrifugakosarat be kell helyezni, mielőtt elindítana egy protokollfuttatást, még akkor is, ha kevesebb mint 12 mintát kell feldolgoznia. Egyetlen (egy) minta vagy 11 minta nem dolgozható fel.



20. ábra: A centrifuga előkészítése. Helyezze be az összeszerelt rotoradaptereket a centrifuga kosaraiba.



21. ábra: A centrifuga és a rázógép előkészítése. Az ábrán láthatók a centrifuga és rázógép alkalmazandó pozíciói két (2 db) és tíz (10 db) közötti minta feldolgozásához. Egy vagy 11 minta nem dolgozható fel.

Feldolgozócsövek (PT)

Távolítsa el az előző futtatások után esetleg a mikrocentrifuga-csövek lyukaiban hagyott feldolgozócsöveket (PT) (lásd 17. ábra, 41. oldal). Töltsön fel 3 db feldolgozócsövet (PT) az 5. táblázatban megadott mennyiségű reagensekkel, a futtatás során feldolgozandó minták számának megfelelően.

A DNáz I inkubációs elegy elkészítéséhez pipettázza bele a jelzett térfogatú DNS emésztőpuffert (RDD) egy feldolgozócsőbe (PT), és adja hozzá a jelzett térfogatú DNáz I (RNFD) törzsoldatot. Egy 1000 µl-es pipettahegy segítségével 3-szor felszívva és kinyomva finoman keverje össze az elegyet.

A PAXgene Blood RNA Kitben található 2 ml-es feldolgozócsöveket (PT) használja. Egyértelműen tüntesse fel a (PT) csöveken a bennük lévő reagens nevét, és helyezze őket a mikrocentrifuga-csöveknek kialakított lyukak megfelelő pozícióiba, a 6. táblázatban jelzettek szerint (47. oldal).



A DNáz I (RNFD) különösen érzékeny a fizikai denaturációra. Kizárólag óvatos pipettázással keverje össze, széles belső átmérőjű pipettahegyeket használva, hogy csökkentse a nyíróerőt. Ne vortexelje.



Ügyeljen rá, hogy csak a kívánt térfogatot pipettázza, az 5. táblázatban feltüntetetteknek megfelelően.

5. táblázat: A mikrocentrifuga-csövek lyukaiba helyezett feldolgozócsövekbe pipettázandó szükséges reagenstérfogatok

Reagenstérfogat a jelzett mintaszám esetén (µl)			
Minták száma	Proteináz K (PK)	DNáz I inkubációs elegy	Eluáló puffer (BR5)
2	126	187 (23 DNáz I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNáz I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNáz I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNáz I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNáz I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNáz I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNáz I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNáz I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNáz I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNáz I + 806 Buffer RDD)	1177

6. táblázat: Mikrocentrifuga-csövek lyukai

	Pozíció		
	A	B	C
Tartalom	Proteináz K (PK)	DNáz I inkubációs elegy	Eluáló puffer (BR5)
Edény	Feldolgozócső (PT)*	Feldolgozócső (PT)*	Feldolgozócső (PT)*

* A PAXgene Blood RNA Kitben található 2 ml-es feldolgozócsöveket (PT) használja.

Protokoll: Teljes RNS manuális tisztítása PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekbe gyűjtött humán teljes vérből

A kezdés előtt figyelembe veendő fontos szempontok

- Győződjön meg róla, hogy a kit doboza bontatlan és sértetlen, és hogy a pufferek nem szívárogtak ki a palackokból. Ne használjon sérült kitet.
- Automata pipetta használatakor ügyeljen rá, hogy a helyes térfogati értékre legyen beállítva, és hogy a folyadék óvatosan és teljes mértékben legyen felszívva és kiadagolva.
- A minták rossz tesztcsőbe vagy spin oszlopba való pipettázásának elkerülése érdekében gondoskodjon róla, hogy az összes tesztcső és spin oszlop megfelelően meg legyen jelölve alkoholos filctollal. Feliratozza minden egyes (PT, MCT) tesztcső oldalát és kupakját. A spin oszlopok esetében a feldolgozócsövek (PT) oldalát feliratozza. Zárjon le minden egyes tesztcsövet és spin oszlopot, miután folyadékot juttatott beléjük.
- Az eljárás során a minták és pufferek kicsorgása, kiömlése csökkentheti a kapott RNS-hozamát és tisztaságát.
- Hacsak nincs másként jelezve, a jelen protokoll minden lépése – a centrifugálási lépéseket is beleértve – szobahőmérsékleten (15–25 °C) végzendő.

A nukleinsav-amplifikációs technikák szenzitivitása miatt az alábbi óvintézkedések szükségesek a minták kezelésekor a keresztszennyeződések elkerülése érdekében:

- Óvatosan pipettázza a mintát a spin oszlopba (PRC, PSC), anélkül, hogy megnedvesítené az oszlop peremét.

- Az egyes folyadékátvitel között mindig cseréljen pipettahegyet. Használjon aeroszolgátas pipettahegyeket.
- Ne érjen hozzá a pipetta hegyével a spin oszlop (PRC, PSC) membránjához.
- A mikrocentrifuga-cső (MCT) vortexelése vagy melegítése után röviden centrifugálja le, hogy eltávolítsa a cseppeket a kupak belső faláról.
- A teljes eljárás során viseljen gumikesztyűt. Amennyiben a kesztyű mintával érintkezik, haladéktalanul cseréljen kesztyűt.
- Zárja le a spin oszlopot (PRC, PSC), mielőtt a mikrocentrifugába helyezné. A centrifugálást az eljárásban leírtaknak megfelelően végezze.
- Egyszerre csak egy spin oszlopot (PRC, PSC) nyisson ki, és ügyeljen arra, hogy ne képződjenek aeroszol részecskék.
- Több minta hatékony párhuzamos feldolgozásához azt javasoljuk, hogy töltsön meg egy tartóállványt feldolgozócsövekkel (PT), amelyekbe a centrifugálás után áthelyezheti a spin oszlopokat (PRC, PSC). Dobja ki a használt, átfolyó szűrletet tartalmazó feldolgozócsöveket (PT), és helyezze a spin oszlopokat (PRC, PSC) tartalmazó új feldolgozócsöveket (PT) közvetlenül a mikrocentrifugába.

Kezdés előtti teendők

- A vért a *PAXgene Blood RNA Tube kézikönyvben* található instrukcióknak megfelelően kell levenni a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekbe. Szükség esetén a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek kezelésével kapcsolatos javaslatokért lásd a „C” függelékét (66. oldal).
- Gondoskodjon róla, hogy a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsöveket legalább 2 órán át inkubálja szobahőmérsékleten a vérvételt követően, hogy biztosítsa a vörsejtek teljes lízisét. A PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsövek másnapig tartó inkubálásával megnőhet a tisztítás hozama. Ha a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsöveket 2–8 °C között, -20 °C-on vagy -70 °C-on tárolták a vér levételét követően, először hagyja a csöveket szoba-hőmérsékletűre melegedni, majd tárolja a csöveket szobahőmérsékleten 2 órán át, mielőtt elkezdené az eljárást.

- Olvassa el a biztonsági információkat a 10. oldalon.
- Olvassa el az RNS kezelésével kapcsolatos irányelveket („A” függelék, 64. oldal).
- Gondoskodjon róla, hogy az eszközöket, úgymint a pipettákat és a rázóinkubátort a gyártó javaslatai szerint rendszeresen ellenőrizték és kalibrálják.
- A rázóinkubátorra az 5. és 20. lépésben van szükség. Állítsa be a rázóinkubátor hőmérsékletét 55 °C-ra.
- A kötőpuffer (BR2) csapadékot képezhet a tárolás során. Szükség esetén melegítse fel 37 °C-ra, hogy feloldja a csapadékot.
- A 2. mosópuffer (BR4) tömény formában található a kitben. Az első használat előtt adjon hozzá 4-szeres térfogatú (96–100%-os, analitikai tisztaságú) etanolt a palackon feltüntetettek szerint a munkaoldat előállításához.
- Ha először használja az RNase-Free DNase Set készletet, készítsen DNáz I törzsoldatot. Oldja fel a szilárd DNáz I (RNFD; 1500 Kunitz-egység)* komponens 550 µl DNáz reszuszenziós pufferben (DRB), amely a készlet részét képezi. Ügyeljen rá, hogy ne vesszen el semennyi DNáz I (RNFD) az üveg kinyitásakor. Ne vortexelje a feloldott DNáz I (RNFD) oldatot. A DNáz I különösen érzékeny a fizikai denaturációra. A keverést kizárólag a tesztcső finom megfordításával végezze.
- A jelenlegi adatok szerint a feloldott DNáz I (RNFD) enzim legfeljebb 6 héten át tárolható 2–8 °C-on. A DNáz I (RNFD) hosszabb távú tárolása esetén távolítsa el a törzsoldatot az üvegből, ossza szét egy-egy használathoz szükséges mennyiségű alikvotokra (használja ehhez a kit részét képező 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csöveket [MCT]; ezek 5 alikvotához elegendők), és tárolja őket -20 °C-on legfeljebb 9 hónapig. A felolvasztott alikvotok 2–8 °C-on legfeljebb 6 hétig tárolhatók. Felolvasztás után ne fagyassza le újra az alikvotokat.
- A DNáz I (RNFD) feloldása és alikvotokba szétosztása során ügyeljen rá, hogy kövesse az RNS kezelésének irányelveit („A” függelék, 64. oldal).

* A Kunitz-egység az általánosan használt egység a DNáz I mérésére, definíció szerint az a DNáz I mennyiség, amely 0,001 per perc per milliliter A_{260} növekedést okoz 25 °C-on, 5,0-s pH-n, erősen polimerizált DNS szubsztrát mellett (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 and 363. o.).

Eljárás

1. Centrifugálja a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsöveket 10 percig 3000–5000 x g-vel, kilendülő fejes rotor használatával.



A vörsejtek teljes lízise érdekében ügyeljen rá, hogy a vérminta minimum 2 órán át inkubálódjon szobahőmérsékleten (15–25 °C-on) a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsövekben.



A rotorba lekerekített aljú csövekhez való tesztcsőadaptereket kell helyezni. Ha másféle típusú tesztcsőadaptert használ, a tesztcsövek eltörhetnek a centrifugálás során.

2. Leöntéssel vagy pipettázással távolítsa el a felülúszót. Adjon hozzá 4 ml RNáz-mentes vizet (RNFV) a pellethez, és egy új, második BD Hemogard zárókupak (a kit része) segítségével zárja le a tesztcsövet.

Ha leönti a felülúszót, ügyeljen rá, hogy ne kavard fel a pelletet, és tiszta papírtörölő segítségével törölje szárazra a tesztcső peremét.

3. Vortexelje, amíg a pellet szemmel láthatóan feloldódik, és centrifugálja 10 percig 3000–5000 x g-vel, kilendülő fejes rotor használatával. Távolítsa el és dobja ki a felülúszó teljes mennyiségét.

A vortexelés után, de a centrifugálás előtt a felülúszóban maradt apró törmelék nem befolyásolja az eljárás sikerességét.



A felülúszó tökéletlen eltávolítása gátolja a lízist, és felhígítja a lizátumot, ennél fogva befolyásolja az RNS molekulák PAXgene membránhoz való kötődésének feltételeit.

4. Adjon hozzá 350 µl reszuszenziós puffert (BR1), és vortexelje, amíg a pellet szemmel láthatóan feloldódik.
5. Pipettázza a mintát egy 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csőbe (MCT). Adjon az elegyhez 300 µl kötőpuffert (BR2) és 40 µl proteináz K (PK) reagenst. Keverje össze: vortexelje 5 másodpercig, majd inkubálja 10 percig 55 °C-on a rázóinkubátorban, 400–1400 rpm fokozaton. Inkubálás után állítsa át a rázóinkubátor hőmérsékletét 65 °C-ra (a 20. lépéshez).



Ne keverje össze a kötőpuffert (BR2) és a proteináz K (PK) reagenst, mielőtt hozzáadná őket a mintához.

6. Pipettázza a lizátumot közvetlenül egy 2 ml-es feldolgozócsőbe (PT) helyezett PAXgene Shredder spin oszlopba (PSC; lila), és centrifugálja 3 percig maximális sebességgel (de ne lépje túl a 20 000 x g-t).



Óvatosan pipettázza a lizátumot a spin oszlopba (PSC), és szabad szemmel ellenőrizze, hogy a lizátum teljesen átkerült-e a spin oszlopba (PSC).

Az oszlopok (PSC) és tesztsővek (PT) sérülésének megelőzése érdekében ne lépje túl a 20 000 x g-t.



Egyes minták centrifugálás nélkül is átfolyhatnak a PAXgene Shredder spin oszlopon (PSC). Ez az adott minta alacsony viszkozitásával magyarázható, és nem tekintendő a termék hibájának.

7. Óvatosan helyezze át az átfolyási frakció teljes felülűszoját egy új 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csőbe (MCT) anélkül, hogy közben felkavarná a pelletet a feldolgozócsőben.
8. Adjon hozzá 350 µl etanolt (96–100%-os, analitikai tisztaságú). Keverje el: vortexelje és centrifugálja röviden (1–2 másodperc, 500–1000 x g), hogy eltávolítsa a cseppeket a tesztsőkupak belső felületéről.



A centrifugálás hossza nem haladhatja meg az 1–2 másodpercet, mivel ellenkező esetben a nukleinsavak pelletté tömörülését, ezáltal pedig a teljes RNS csökkent hozamát eredményezhetné.

9. Pipetázzon 700 µl mintát egy 2 ml-es feldolgozócsőbe (PT) helyezett PAXgene RNA spin oszlopba (PRC; vörös), és centrifugálja 1 percig 8000–20 000 x g-vel. Ezután helyezze a spin oszlopot (PRC) egy új 2 ml-es feldolgozócsőbe (PT), és dobja el az átfolyó részt tartalmazó régi feldolgozócsövet (PT).
10. Pipettázza a maradék mintát a PAXgene RNA spin oszlopba (PRC), és centrifugálja 1 percig 8000–20 000 x g-vel. Ezután helyezze a spin oszlopot (PRC) egy új 2 ml-es feldolgozócsőbe (PT), és dobja el az átfolyó részt tartalmazó régi feldolgozócsövet (PT).



Óvatosan pipettázza a mintát a spin oszlopba (PRC), és szabad szemmel ellenőrizze, hogy a minta teljesen átkerült-e a spin oszlopba (PRC).

11. Pipetázzon 350 µl 1. mosópuffert (BR3) a PAXgene RNA spin oszlopba (PRC). Centrifugálja 1 percig 8000–20 000 x g-vel. Ezután helyezze a spin oszlopot (PRC) egy új 2 ml-es feldolgozócsőbe (PT), és dobja el az átfolyó részt tartalmazó régi feldolgozócsövet (PT).

12. Adjon 10 µl DNáz I (RNFD) törzsoldatot 70 µl DNS emésztőpufferhez (RDD) egy 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csőben (MCT). Keverje össze: finoman kocogtassa meg párszor a tesztcsövet, és röviden centrifugálja le, hogy összegyűjtse a maradék folyadékot a cső oldaláról.

Ha például 10 mintát dolgoz fel, adjon 100 µl DNáz I (RNFD) törzsoldatot 700 µl DNS emésztőpufferhez (RDD). Használja a kitben található 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csöveket (MCT).



A DNáz I különösen érzékeny a fizikai denaturációra. A keverést kizárólag a tesztcső finom kocogtatásával végezze. Ne vortexelje.

13. Pipettázza a DNáz I (RNFD) inkubációs elegyet (80 µl) közvetlenül a PAXgene RNA spin oszlop (PRC) membránjára, és helyezze a munkaasztalra (20–30 °C) 15 percre.



Ügyeljen rá, hogy a DNáz I (RNFD) inkubációs elegy közvetlenül a membránra kerüljön. A DNázos emésztés tökéletlen lesz, ha az elegynek egy része nem a membránra, hanem a spin oszlop (PRC) falára vagy O-gyűrűjére kerül, és ott is marad.

14. Pipetázzon 350 µl 1. mosópuffert (BR3) a PAXgene RNA spin oszlopba (PRC), és centrifugálja 1 percig 8000–20 000 x g-vel. Ezután helyezze a spin oszlopot (PRC) egy új 2 ml-es feldolgozócsőbe (PT), és dobja el az átfolyó részt tartalmazó régi feldolgozócsövet (PT).

15. Pipetázzon 500 µl 2. mosópuffert (BR4) a PAXgene RNA spin oszlopba (PRC), és centrifugálja 1 percig 8000–20 000 x g-vel. Ezután helyezze a spin oszlopot (PRC) egy új 2 ml-es feldolgozócsőbe (PT), és dobja el az átfolyó részt tartalmazó régi feldolgozócsövet (PT).



A 2. mosópuffer (BR4) tömény formában található a kitben. Ügyeljen rá, hogy használat előtt hozzáadja az etanolt a 2. mosópufferhez (BR4) (lásd „Kezdés előtti teendők”, 49. oldal).

16. Adjon újabb 500 µl 2. mosópuffert (BR4) a PAXgene RNA spin oszlopba (PRC). Centrifugálja 3 percig 8000–20 000 x g-vel.

17. Dobja el az átfolyó részt tartalmazó feldolgozócsövet (PT), és helyezze a PAXgene RNA spin oszlopot (PRC) egy új 2 ml-es feldolgozócsőbe (PT). Centrifugálja 1 percig 8000–20 000 x g-vel.

18. Dobja el az átfolyó részt tartalmazó feldolgozócsövet (PT). Helyezze a PAXgene RNA spin oszlopot (PRC) egy 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csőbe (MCT), és pipetázzon 40 µl eluáló puffert (BR5) közvetlenül a PAXgene RNA spin oszlop (PRC) membránjára. Az RNS eluálásához centrifugálja 1 percig 8000–20 000 x g-vel.

A maximális elúciós hatásfok elérése érdekében fontos, hogy az egész membránt megnedvesítse az eluáló pufferrel (BR5).

19. Ismételje meg az elúciós lépést (18. lépés) a fentebb leírtak szerint, 40 µl eluáló puffer (BR5) és ugyanazon mikrocentrifuga-cső (MCT) használatával.

20. Inkubálja az eluátumot 5 percig 65 °C-on a rázóinkubátorban (az 5. lépésből), ezúttal rázatás nélkül. Az inkubációt követően azonnal helyezze jégre.

Ez a 65 °C-on végzett inkubáció denaturálja az RNS-t a downstream alkalmazások számára. Ne lépje túl a megadott inkubációs időt vagy hőmérsékletet.

21. Ha az RNS mintákat nem használja fel azonnal, tárolja őket -20 °C-on vagy -70 °C-on.

Mivel az RNS ismételt felolvasztás és visszafagyasztás után is denaturált marad, nem szükséges megismételni az inkubálást 65 °C-on. Ha diagnosztikai assay-hez használja az RNS mintákat, kövesse a gyártótól kapott instrukciókat.

Az RNS 260 nm-en mért abszorbancia általi mennyiségi meghatározásának pontossága érdekében azt javasoljuk, hígítsa a mintákat 10 mM-os, 7,5 pH-jú Tris-HCl oldattal.* A minták RNáz-mentes vízben való hígítása pontatlan, túl alacsony értékekhez vezethet.

Nullázza le a spektrofotométert egy vak minta segítségével, amely ugyanolyan arányban tartalmaz eluáló puffert (BR5) és Tris-HCl puffert, mint a mérendő minták. Az eluáló puffer (BR5) abszorbanciája magas 220 nm-en, ami magas háttér abszorbanciaszintekhez vezethet, ha a spektrofotométer nem lett megfelelően lenullázva.

Megjegyzés: A Tris-HCl pufferben történő mennyiségi meghatározáshoz használja az alábbi összefüggést:

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$. Lásd „B” függelék, 65. oldal.

* Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. További információkat a megfelelő biztonsági adatlapok (SDS-ek) tartalmaznak, amelyek az adott termék gyártójától szerezhetők be.

Protokoll: Teljes RNS automatizált tisztítása PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekbe gyűjtött humán teljes vérből

A kezdés előtt figyelembe veendő fontos szempontok

- Győződjön meg róla, hogy a kit doboza bontatlan és sértetlen, és hogy a pufferek nem szívárogtak ki a palackokból. Ne használjon sérült kitet.
- Automata pipetta használatakor ügyeljen rá, hogy a helyes térfogati értékre legyen beállítva, és hogy a folyadék óvatosan és teljes mértékben legyen felszívva és kiadagolva.
- A minták rossz tesztcsőbe és műanyag fogyóeszközökbe való pipettázásának elkerülése érdekében gondoskodjon róla, hogy az összes feldolgozócső (PT), mikrocentrifuga-cső (MCT) és rotoradapter megfelelően meg legyen jelölve alkoholos filctollal. Feliratozza minden egyes mikrocentrifuga-cső (MCT) oldalát és kupakját, minden egyes feldolgozócső (PT) oldalát és minden egyes rotoradapter külső falát.
- Az eljárás során a minták és pufferek kicsorgása, kiömlése csökkentheti a kapott RNS-hozamát és tisztaságát.
- Hacsak nincs másként jelezve, a jelen protokoll minden lépése – a centrifugálási lépéseket is beleértve – szobahőmérsékleten (15–25 °C) végzendő.

A nukleinsav-amplifikációs technikák szenzitivitása miatt az alábbi óvintézkedések szükségesek a minták kezelésekor a keresztszennyeződések elkerülése érdekében:

- Óvatosan pipettázza a mintát a feldolgozócsőbe (PT), a cső aljába anélkül, hogy megnedvesítené a tesztcső peremét.
- Az egyes folyadékvitelek között mindig cseréljen pipettahegyet. Használjon aeroszolgátas pipettahegyeket.

- Ne érjen hozzá a pipetta hegyével a spin oszlop (PRC, PSC) membránjához.
- A mikrocentrifuga-cső (MCT) vortexelése vagy melegítése után röviden centrifugálja le, hogy eltávolítsa a cseppeket a kupak belső faláról.
- A teljes eljárás során viseljen gumikesztyűt. Amennyiben a kesztyű mintával érintkezik, haladéktalanul cseréljen kesztyűt.

Kezdés előtti teendők

- A vért a *PAXgene Blood RNA Tube kézikönyvben* található instrukcióknak megfelelően kell levenni a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövekbe. Szükség esetén a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek kezelésével kapcsolatos javaslatokért lásd a „C” függelékét (66. oldal).
- Gondoskodjon róla, hogy a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsöveket legalább 2 órán át inkubálja szobahőmérsékleten a vérvételt követően, hogy biztosítsa a vörsejtek teljes lízisét. A PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsövek másnapig tartó inkubálásával megnőhet a tisztítás hozama. Ha a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsöveket 2–8 °C között, -20 °C-on vagy -70 °C-on tárolták a vér levételét követően, először hagyja a csöveket szoba-hőmérsékletűre melegedni, majd tárolja a csöveket szobahőmérsékleten 2 órán át, mielőtt elkezdené az eljárást.
- Olvassa el a biztonsági információkat a 10. oldalon.
- Olvassa el a „Fontos megjegyzések” fejezetet a 37. oldalon.
- Olvassa el az RNS kezelésével kapcsolatos irányelveket („A” függelék, 64. oldal).
- Olvassa el a *QIAcube felhasználói kézikönyvet* és a QIAcube készülékhez mellékelt bármely további tájékoztatót, különös figyelmet fordítva a biztonsági információkra.
- Gondoskodjon róla, hogy az eszközöket, úgymint a pipettákat és a QIAcube készüléket a gyártó javaslatai szerint rendszeresen ellenőrizték és kalibrálják.
- A kötőpuffer (BR2) csapadékot képezhet a tárolás során. Szükség esetén melegítse fel 37 °C-ra, hogy feloldja a csapadékot.

- A 2. mosópuffer (BR4) tömény formában található a kitben. Az első használat előtt adjon hozzá 4-szeres térfogatú (96–100%-os, analitikai tisztaságú) etanolt a palackon feltüntetettek szerint a munkaoldat előállításához.
- Ha először használja az RNase-Free DNase Set készletet, készítsen DNáz I törzsoldatot. Oldja fel a szilárd DNáz I (RNFD; 1500 Kunitz-egység)* komponens 550 µl DNáz reszuszpenziós pufferben (DRB), amely a készlet részét képezi. Ügyeljen rá, hogy ne vesszen el semennyi DNáz I (RNFD) az üveg kinyitásakor. Ne vortexelje a feloldott DNáz I (RNFD) oldatot. A DNáz I különösen érzékeny a fizikai denaturációra. A keverést kizárólag a tesztcső finom megfordításával végezze.
- A jelenlegi adatok szerint a feloldott DNáz I (RNFD) enzim legfeljebb 6 héten át tárolható 2–8 °C-on. A DNáz I (RNFD) hosszabb távú tárolása esetén távolítsa el a törzsoldatot az üvegből, ossza szét egy-egy használathoz szükséges mennyiségű alikvotokra (használja ehhez a kit részét képező 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csöveket [MCT]; ezek 5 alikvotához elegendők), és tárolja őket -20 °C-on legfeljebb 9 hónapig. A felolvasztott alikvotok 2–8 °C-on legfeljebb 6 hétig tárolhatók. Felolvasztás után ne fagyassza le újra az alikvotokat.
- A DNáz I (RNFD) feloldása és alikvotokba szétosztása során ügyeljen rá, hogy kövesse az RNS kezelésének irányelveit („A” függelék, 64. oldal).
- Helyezze be a megfelelő rázógép adaptert (a QIAcube készülékhez mellékelve; használja a 2 ml-es biztonsági záras tesztcsövekhez való „2” jelzésű adaptert), és helyezze a rázógép tartóállványát az adapter tetejére.
- Ellenőrizze a hulladéktartályt, és szükség esetén ürítse ki.
- Telepítse a protokollokat, ha nem tette még meg a korábbi futtatásokhoz. Telepítse a „PAXgene Blood RNA Part A” és „PAXgene Blood RNA Part B” protokollt egyaránt. Lásd „Protokollok telepítése a QIAcube készülékre”, 37. oldal.

* A Kunitz-egység az általánosan használt egység a DNáz I mérésére, definíció szerint az a DNáz I mennyiség, amely 0,001 per perc per milliliter A_{260} növekedést okoz 25 °C-on, 5,0-s pH-n, erősen polimerizált DNS szubsztrát mellett (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 and 363. o.).

Eljárás

1. Zárja be a QIAcube ajtaját, és kapcsolja be a QIAcube készüléket a főkapcsolóval (lásd 15. ábra, 38. oldal).

Sípoló hang hallatszik, és megjelenik az indulóképernyő. A készülék automatikusan elvégzi az inicializálási teszteket.

2. Nyissa ki a QIAcube ajtaját, és helyezze be a szükséges reagenseket és műanyag eszközöket a QIAcube készülékbe. Lásd „A QIAcube készülék előkészítése”, 39. oldal.

Hogy időt takarítson meg, az előkészítést az egyik vagy mindkét 10 perces centrifugálási lépés alatt is elvégezheti (3. és 5. lépés).

3. Centrifugálja a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsöveket 10 percig 3000–5000 x g-vel, kilendülő fejes rotor használatával.



A vörsejtek teljes lízise érdekében ügyeljen rá, hogy a vérminta minimum 2 órán át inkubálódjon szobahőmérsékleten (15–25 °C-on) a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsövekben.



A rotorba lekerekített aljú csövekhez való tesztcsőadaptereket kell helyezni. Ha másféle típusú tesztcsőadaptert használ, a tesztcsövek eltörhetnek a centrifugálás során.

4. Leöntéssel vagy pipettázással távolítsa el a felülúszót. Adjon hozzá 4 ml RNáz-mentes vizet (RNFV) a pellethez, és egy új, második BD Hemogard zárókupak (a kit része) segítségével zárja le a tesztcsövet.

Ha leönti a felülúszót, ügyeljen rá, hogy ne kavarodjon fel a pellet, és tiszta papírtörő segítségével törölje szárazra a tesztcső peremét.

5. Vortexelje, amíg a pellet szemmel láthatóan feloldódik, és centrifugálja 10 percig 3000–5000 x g-vel, kilendülő fejes rotor használatával. Távolítsa el és dobja ki a felülúszó teljes mennyiségét.

A vortexelés után, de a centrifugálás előtt a felülúszóban maradt apró törmelék nem befolyásolja az eljárás sikerességét.



A felülúszó tökéletlen eltávolítása gátolja a lízist, és felhígítja a lízátumot, ennél fogva befolyásolja az RNS molekulák PAXgene membránhoz való kötődésének feltételeit.

6. Adjon hozzá 350 µl reszuszenziós puffert (BR1), és vortexelje, amíg a pellet szemmel láthatóan feloldódik.

7. Pipettázza a mintát egy 2 ml-es feldolgozócsőbe (PT).



A PAXgene Blood RNA Kitben található 2 ml-es feldolgozócsöveket (PT) használja.

8. Helyezze be a mintákat tartalmazó, nyitott feldolgozócsöveket (PT) a QIAcube rázógépbe (lásd 17. ábra, 41. oldal). A mintapozíciók meg vannak számozva a könnyebb betölthetőség kedvéért. Helyezze be a rázógép-tartóállvány dugós csatlakozóit (a QIAcube készülékhez mellékelve) a rázógép-tartóállvány peremén a lyukakba, az egyes feldolgozócsövek mellé. Ez lehetővé teszi a minták detektálását a betöltés ellenőrzése során.



Ügyeljen rá, hogy a helyes rázógép adapter legyen behelyezve (2 ml-es rázógép adapter biztonsági záras tesztcsövekhez, „2” jelzéssel ellátva, a QIAcube készülékhez mellékelve).



Ha 12 db mintánál kevesebbet dolgoz fel, ügyeljen rá, hogy a 21. ábra, 45. oldal szerint töltsen meg a rázógép állványát. Egy vagy 11 minta nem dolgozható fel.

9. Csukja be a QIAcube készülék ajtaját (lásd 15. ábra, 38. oldal).

10. Válassza ki a „PAXgene Blood RNA Part A” protokollt, és indítsa el.

Kövessen a QIAcube készülék érintőképernyőjén megjelenő utasításokat.



Ügyeljen rá, hogy mindkét programrész (A és B rész) telepítve legyen a QIAcube készülékre (lásd „Protokollok telepítése a QIAcube készülékre”, 37. oldal).



A QIAcube elvégzi a minták, pipettahegyek, rotoradapterek és reagenspalackok megfelelő betöltésének ellenőrzését.

11. Miután a „PAXgene Blood RNA Part A” protokoll befejeződött, nyissa ki a QIAcube készülék ajtaját (lásd 15. ábra, 38. oldal). Távolítsa el és dobja ki a PAXgene RNA spin oszlopokat (PRC) a rotoradapterekből, és az üres feldolgozócsöveket (PT) a rázógépből.



A futtatás közben a készülék áthelyezi a spin oszlopokat a rotoradapter 1. pozíciójából (L1 kupakpozíció) a rotoradapter 3. pozíciójába (L2 kupakpozíció) (lásd 19. ábra, 43. oldal).

12. Csukja le a tisztított RNS-t tartalmazó összes 1,5 ml-es mikrocentrifuga-cső (MCT) kupakját a rotoradapterekben (3. pozíció, L3 kupakpozíció, lásd 19. ábra, 43. oldal). Helyezze át az 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csöveket (MCT) a QIAcube rázógép adapterére (lásd 17. ábra, 41. oldal).

13. Csukja be a QIAcube készülék ajtaját (lásd 15. ábra, 38. oldal).

14. Válassza ki a „PAXgene Blood RNA Part B” protokollt, és indítsa el.

Kövesse a QIAcube készülék érintőképernyőjén megjelenő utasításokat.



Ez a program 65 °C-on inkubálja a mintákat, és denaturálja az RNS-t a downstream alkalmazások számára. Még ha a későbbi, downstream alkalmazásnak része is egy hődenaturációs lépés, akkor se hagyja ki ezt a lépést. Az elégséges RNS-denaturáció elengedhetetlen a maximális hatékonysághoz a downstream alkalmazásokban.

15. Miután a „PAXgene Blood RNA Part B” program befejeződött, nyissa ki a QIAcube készülék ajtaját (lásd 15. ábra, 38. oldal). Haladéktalanul helyezze jégre a tisztított RNS-t tartalmazó mikrocentrifuga-csöveket (MCT).



VIGYÁZAT: Forró felület. A rázógép akár 70 °C hőmérsékletűre is felforrósodhat. Ne érjen a felforrósodott eszközkhöz.



Ne hagyja benne a tisztított RNS-t a QIAcube készülékben. Mivel a minták nincsenek hűtve, a tisztított RNS lebomolhat. Ezért nem ajánlott felügyelet nélkül hagyott, éjszakai mintafuttatásokat elindítani.

16. Ha az RNS mintákat nem használja fel azonnal, tárolja őket -20 °C-on vagy -70 °C-on.

Mivel az RNS ismételt felolvasztás és visszafagyasztás után is denaturált marad, nem szükséges megismételni a hőinkubációs protokollt („PAXgene Blood RNA Part B”). Ha diagnosztikai assay-hez használja az RNS mintákat, kövesse a gyártótól kapott instrukciókat.

Az RNS 260 nm-en mért abszorbancia általi mennyiségi meghatározásának pontossága érdekében azt javasoljuk, hígítsa a mintákat 10 mM-os, 7,5 pH-jú Tris-HCl oldattal.* A minták RNáz-mentes vízben való hígítása pontatlan, túl alacsony értékekhez vezethet.

Nullázza le a spektrofotométert egy vak minta segítségével, amely ugyanolyan arányban tartalmaz eluáló puffert (BR5) és Tris-HCl puffert, mint a mérendő minták. Az eluáló puffer (BR5) abszorbanciája magas 220 nm-en, ami magas háttér abszorbanciaszintekhez vezethet, ha a spektrofotométer nem lett megfelelően lenullázva.



A Tris-HCl pufferben történő mennyiségi meghatározáshoz használja az alábbi összefüggést:

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Lásd „B” függelék, 65. oldal.

17. Távolítsa el a reagenspalackok tartóállványát a QIAcube készülék munkasztaláról (lásd 17. ábra, 41. oldal), és zárja le az összes palackot a megfelelően feliratozott kupakkal. A palackban lévő pufferek szobahőmérsékleten (15–25 °C-on) legfeljebb 3 hónapig tárolhatók. Távolítsa el és dobja ki a feldolgozócsövekben (PT) és a QIAcube mikrocentrifuga-csővek lyukaiban lévő maradék reagenseket (lásd 17. ábra, 41. oldal). Távolítsa el és dobja ki a rotoradaptereket a centrifugából (lásd 17. ábra, 41. oldal). Ürítse ki a QIAcube készülék hulladéktartályát (lásd 15. ábra, 38. oldal). Zárja be a QIAcube készülék ajtaját, és kapcsolja ki a QIAcube készüléket a főkapcsolóval (lásd 15. ábra, 38. oldal).

* Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. További információkat a megfelelő biztonsági adatlapok (SDS-ek) tartalmaznak, amelyek az adott termék gyártójától szerezhetők be.

Hibaelhárítási útmutató

Ez a hibaelhárítási útmutató bármely felmerülő hiba esetén segíthet a megoldásban. További információkért kérjük, olvassa el műszaki támogatási oldalunkon a gyakran ismételt kérdéseket: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. A QIAGEN műszaki szolgálat kutató szakemberei örömmel állnak rendelkezésére, ha bármilyen kérdése van akár ennek a kézikönyvnek a tartalmával és a benne szereplő protokollokkal kapcsolatban, akár a mintafeldolgozási és vizsgálati módszerekkel kapcsolatban (az elérhetőség a kézikönyv utolsó oldalán vagy a következő címen található: www.qiagen.com).

Megjegyzések és javaslatok

Lebomlott RNS

RNáz-szennyezettség



Ügyeljen rá, hogy ne vigyen be semennyi RNáz-t a reagensekbe az eljárás vagy a későbbi kezelés során (lásd „A” függelék, 64. oldal).

Alacsony RNS-hozam

a) Kevesebb mint 2,5 ml vért vettek a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsőbe



Ügyeljen rá, hogy 2,5 ml vér legyen véve a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsőbe (lásd a *PAXgene Blood RNA Tube* kézikönyvet).

b) Az RNS-koncentráció vízben lett mérve



Az RNS-t 10 mM-os, 7,5* pH-jú Tris-HCl oldatban kell mérni a pontos mennyiségi meghatározáshoz (lásd „B” függelék, 65. oldal).



c) Sejttörmelék került a PAXgene RNA spin oszlopra (PRC) a manuális protokoll 9. és 10. lépésében





Igyekezzen elkerülni a nagyobb részecskék átvitelét, amikor a manuális protokoll 7. lépésében pipettázza a felülúszót (az apró szemcsés törmelék átvitele nem befolyásolja hátrányosan az eljárást).

* Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. További információkat a megfelelő biztonsági adatlapok (SDS-ek) tartalmaznak, amelyek az adott termék gyártójától szerezhetők be.

Megjegyzések és javaslatok

- d) A felülúszó nem lett teljesen eltávolítva a 3. lépésben  Ügyeljen rá, hogy a teljes felülúszó el legyen távolítva. Ha leönti a felülúszót, távolítsa el a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacső pereméről a cseppeket papírtörölő segítségével. Tegye meg a megfelelő óvintézkedéseket a keresztszennyeződés megelőzése érdekében.
- e) Miután a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsőbe levették, kevesebb mint 2 órán át inkubálták a vért  Inkubálja a vért a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsőben legalább 2 órán át a levételt követően.

Alacsony A_{260}/A_{280} érték

- a) Vizet használtak az RNS A_{260}/A_{280} méréshez való hígításához  Használjon 10 mM-os, 7,5 pH-jú Tris-HCl oldatot az RNS hígításához, mielőtt megmérné a tisztaságát* (lásd „B” függelék, 65. oldal).
- b) A spektrofotométer nem lett megfelelően lenullázva  Nullázza le a spektrofotométert egy vak minta segítségével, amely ugyanolyan arányban tartalmaz eluáló puffert (BR5) és 10 mM-os, 7,5 pH-jú Tris-HCl puffert, mint a mérendő minták. Az eluáló puffer (BR5) abszorbanciája magas 220 nm-en, ami magas háttér abszorbanciaszintekhez vezethet, ha a spektrofotométer nem lett megfelelően lenullázva.

A készülék hibás működése

A QIAcube készüléket nem megfelelően működtetik

Olvassa el a *QIAcube felhasználói kézikönyvet*, különös figyelmet fordítva a Hibaelhárítás című fejezetre. Ügyeljen rá, hogy a QIAcube készülék megfelelően karban legyen tartva, a *QIAcube felhasználói kézikönyvben* leírtaknak megfelelően.

* 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.

„A” függelék: Általános megjegyzések az RNS kezeléséről

Az RNS kezelése



A ribonukleázok (RNázok) nagyon stabil és aktív enzimek, amelyekhez általában nincsen szükség kofaktorokra. Mivel az RNázokat nehéz inaktíválni, és még parányi mennyiségben is képesek lebontani az RNS-t, soha ne használja úgy a műanyag- vagy üvegeszközöket, hogy előtte nem távolította el a lehetséges RNáz-szennyeződések. Nagy gondossággal kell eljárni, nehogy véletlenül RNáz-t vigyen be egy RNS mintába a tisztítási eljárás alatt vagy után. Az RNáz-mentes környezet létrehozása és fenntartása érdekében óvintézkedések szükségesek az eldobható és többször használható edények és oldatok előkezelése és használata során, amikor RNS-sel dolgozik.

Általános kezelés



Mindig megfelelő aseptikus mikrobiológiai technikát kell alkalmazni az RNS-sel való munkálatok során. A kéz és a porrészcsek baktériumokat és penészgombákat hordoznak, és ezek az RNáz-szennyeződés legáltalánosabb forrásai. A bőrfelületről vagy a poros laboratóriumi eszközökről származó RNáz-szennyeződések átvitelének megakadályozása céljából a reagensek és RNS-minták kezelésekor mindig viseljen latex- vagy vinilkesztyűt. Gyakran váltson kesztyűt, és amikor csak lehetséges, tartsa lezárva a csöveket. Tartsa jégen a tisztított RNS-t, amikor alikvotákat pipettáz downstream alkalmazások számára.

Az üvegeszközök és oldatok RNáz-szennyezettségének megszüntetésére szolgáló protokollok megtalálhatók az általános molekuláris biológiai kézikönyvekben, mint például: Sambrook, J. és Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

„B” függelék: A teljes RNS mennyiségi és minőségi meghatározása

Az RNS mennyiségi meghatározása

Az RNS koncentrációját spektrofotométerrel, a minta 260 nm-en (A_{260}) mért abszorbanciája alapján kell meghatározni. A szignifikancia biztosítása érdekében a leolvasásokat a spektrofotométer lineáris mérési tartományában kell végezni. A 260 nm-en mért 1 egységnyi abszorbanca megfelel 44 µg RNS per ml koncentrációnak ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$). Ez az összefüggés csak a 10 mM-os, 7,5 pH-jú Tris-HCl* oldatban végzett mérésekre érvényes. Ezért ha hígítani kell az RNS mintát, azt 10 mM-os Tris-HCl oldattal tegye. Az alább tárgyaltaknak megfelelően (lásd „Az RNS tisztasága”, 66. oldal) a 260 és 280 nm-en mért abszorbancaértékek aránya alapján megbecsülhető az RNS tisztasága. Az RNS minták mérésekor ügyeljen rá, hogy a küvelták RNáz-mentesek legyenek. Nullázza le a spektrofotométert egy vak minta segítségével, amely ugyanolyan arányban tartalmaz eluáló puffert (BR5) és Tris-HCl puffert, mint a mérendő minták. Az eluáló puffer (BR5) abszorbanciája magas 220 nm-en, ami magas háttér abszorbanciaszintekhez vezethet, ha a spektrofotométer nem lett megfelelően lenullázva. Alább láthatja az RNS mennyiségi meghatározásához szükséges számítások egy példáját.

Az RNS minta térfogata	=	80 µl
Hígítás (1/15)	=	10 µl RNS minta + 140 µl 10 mM-os Tris-HCl, pH 7,5
Mérje meg a hígított minta abszorbanciáját egy (RNáz-mentes) küveltában.		
A_{260}	=	0,3
A minta koncentrációja	=	$44 \times A_{260} \times \text{hígítási faktor}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 µg/ml
Teljes hozam	=	koncentráció x mintatérfogat milliliterben
	=	$198 \text{ µg/ml} \times 0,08 \text{ ml}$
	=	15,8 µg RNS

* Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. További információkat a megfelelő biztonsági adatlapok (SDS-ek) tartalmaznak, amelyek az adott termék gyártójától szerezhetők be.

Az RNS tisztasága

A 260 nm-en és 280 nm-en végzett leolvasások eredményeinek aránya (A_{260}/A_{280}) alapján megbecsülhető az RNS tisztasága olyan szennyezőanyagok vonatkozásában, amelyek elnyelik az UV-fényt, mint például a proteinek. Az A_{260}/A_{280} arányt azonban jelentős mértékben befolyásolja a pH. Az alacsonyabb pH-érték alacsonyabb A_{260}/A_{280} arányt, és a proteinszennyezettség iránti csökkent érzékenységet eredményez.* Annak érdekében, hogy pontos értékeket kapjon, azt javasoljuk, hogy 10 mM-os, 7,5 pH-jú Tris-HCl oldatban mérje az abszorbanciát. A tiszta RNS A_{260}/A_{280} aránya 10 mM-os, 7,5 pH-jú Tris-HCl oldatban 1,8–2,2 közé esik. Nullázza le a spektrofotométert egy vak minta segítségével, amely ugyanolyan arányban tartalmaz eluáló puffert (BR5) és Tris-HCl puffert, mint a mérendő minták. Az eluáló puffer (BR5) abszorbanciája magas 220 nm-en, ami magas háttér abszorbanciaszintekhez vezethet, ha a spektrofotométer nem lett megfelelően lenullázva.

„C” függelék: A PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek kezelése



A BD alábbi javaslati hasznosak lehetnek a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) mintacsövek kezelése során. A PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsövek használatával kapcsolatos további információkat lásd a *PAXgene Blood RNA Tube kézikönyvben*.

Instrukciók a BD Hemogard zárókupak eltávolításához

1. Egyik kezével fogja meg a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) csövet, és helyezze a hüvelykujját a BD Hemogard zárókupak alá. (A stabilitás növelése érdekében támassza

* 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.

a karját egy szilárd felületre.) A másik kezével csavarja el a BD Hemogard zárókupakot, és ezzel egyidejűleg nyomja felfelé a hüvelykujját, de CSAK ADDIG, AMÍG A MINTACSŐ GUMIDUGÓJA MEG NEM LAZUL.

2. Mozdítsa el a hüvelykujját, mielőtt felemelné a zárókupakot. NE HASZNÁLJA a hüvelykujját a zárókupak PAXgene Blood RNA Tube (BRT) mintacsőről való letolásához. Figyelem: Ha a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) cső vért tartalmaz, számolni kell a fertőzésveszélynek való expozíció kockázatával. A zárókupak eltávolítása közbeni egészségkárosodás megelőzése érdekében fontos, hogy a zárókupak felnyomásához használt hüvelykujjat azonnal vegye el a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) csőről, amint a BD Hemogard zárókupak meglazul.
3. Emelje le a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) cső zárókupáját. Abban a valószínűtlen esetben, ha a műanyag kupak elválna a gumidugótól, NE SZERELJE ÚJRA ÖSSZE A ZÁRÓKUPAKOT. Óvatosan távolítsa el a gumidugót a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) cső szájáról.

Instrukciók egy második BD Hemogard zárókupak felhelyezéséhez

1. Cserélje ki a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) cső zárókupáját.
2. Csavaró mozdulattal határozottan nyomja lefelé, amíg a gumidugó újra teljesen illeszkedik. A gumidugó teljes illeszkedése szükséges ahhoz, hogy a zárókupak stabilan és biztonságosan rajta maradjon a PAXgene Blood RNA Tube (BRT) csövön a kezelés közben.

Rendelési információk

Termék	Tartalom	Katalógusszám
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 db PAXgene spin oszlop, 50 db Shredder spin oszlop, feldolgozócsövek, RNáz-mentes DNáz I, RNáz-mentes reagensek és pufferek. A PAXgene Blood RNA Tubes mintacsövekkel együtt használandók	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 db vérvételi cső	762165
A QIAGEN-től rendelhető kapcsolódó termékek		
Starter Pack, QIAcube	A csomag tartalma: reagenspalack tartóállványok (3); tartóállvány-címkéző csíkok (8); 200 µl-es szűrős pipettahegyek (1024); 1000 µl-es szűrős pipettahegyek (1024); 1000 µl-es, széles belső átmérőjű szűrős pipettahegyek (1024); 30 ml-es reagenspalackok (18); rotoradapterek (240); rotoradaptertartó	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Steril, egyszer használatos szűrős pipettahegyek, tartóállványban	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Reagenspalackok (30 ml) kupakkal; 6-os csomagban; a QIAcube reagenspalackok tartóállványával való használatra	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	240 minta-előkészítéshez: 240 db egyszer használatos rotoradapter; a QIAcube készülékkel való használatra	990394
Reagent Bottle Rack	Tartóállvány 6 x 30 ml-es reagenspalack tárolására a QIAcube munkaasztalon	990390

Rotor Adapter Holder	Tartóelem 12 db egyszer használatos rotoradapterhez; a QIAcube készülékkel való használatra	990392
----------------------	---	--------

A BD-től rendelhető kapcsolódó termékek*

Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 21G, 0,75 hüvelykes (0,8 x 19 mm) tű, 12 hüvelykes (305 mm) tömlő luer adapterrel; 50 db/ doboz, 200 db/csomag	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Csomag csak 13 mm és 16 mm átmérő esetén; 1000 db/csomag	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm 4,0 ml-es vérvételi cső vörös BD Hemogard zárókupakkal és papírcímkével; 100 db/doboz, 1000 db/csomag	368975

* Ezek a vérvételi kiegészítők olyan tipikus termékek, amelyek nyugodtan használhatók a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) csövekkel. Ezen kiegészítőkkal kapcsolatos további információkért, a rendelés menetét is beleértve, látogasson el a www.PreAnalytiX.com honlapra.

A licenccel kapcsolatos legfrissebb információk és a termékspecifikus jogi nyilatkozatok a megfelelő PreAnalytiX vagy QIAGEN kit kézikönyvében vagy felhasználói útmutatójában található. A PreAnalytiX és QIAGEN kit kézikönyvek és felhasználói útmutatók elérhetők a www.PreAnalytiX.com és www.qiagen.com címen, vagy kérheti őket a PreAnalytiX műszaki ügyfélszolgálatától.

A kézikönyv átdolgozási előzményei

Dokumentum és átdolgozás	Módosítások	Dátum
HB-0101-004, R2	A GHS előírásoknak való megfeleléshez szükséges módosítások a dokumentum egészében	2015. június
HB-0101-005, R3	Új sablon; az automatizált protokoll és a teljesítményadatok felülvizsgálása; a Biztonsági információk frissítése, hogy eleget tegyenek a GHS előírásoknak; módosítások a készülékleírás részleteiben és A termék használatának korlátai nyilatkozatban.	2019. február
HB-0101-006, R3	A készlet nevének javítása A kit tartalma c. táblázatban az 5. oldalon.	2020. január

PreAnalytiX Worldwide

A PreAnalytiX termékeket a QIAGEN és BD vállalatok forgalmazzák

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

