

Gennaio 2020

# Manuale del PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA Kit

Versione 2



50 (n. di catalogo 762174)

R3 **MAT** 1120409IT

**REF** 762174



PreAnalytiX GmbH  
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon  
Prodotto da QIAGEN GmbH per PreAnalytiX

 **PreAnalytiX**  
A QIAGEN / BD Company

Marchi commerciali: PAXgene®, PreAnalytiX™ [PreAnalytiX GmbH]; QIAGEN®, QIAcube® (Gruppo QIAGEN); BD Vacutainer®, BD Hemogard™, Safety-Lok™ (Becton, Dickinson and Company); Eppendorf® (Eppendorf AG).

I PAXgene Blood RNA Kit non sono disponibili in tutti i Paesi – si prega di richiedere maggiori informazioni.

#### **Contratto di licenza limitato**

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione da parte dell'acquirente o dell'utente del PAXgene Blood RNA Kit dei seguenti termini:

1. Il PAXgene Blood RNA Kit deve essere usato unicamente secondo le istruzioni contenute nel *Manuale del PAXgene Blood RNA Kit* e in combinazione con i componenti contenuti nel kit. PreAnalytiX non concede alcuna licenza, in relazione a qualunque proprietà intellettuale, per l'uso o l'aggiunta dei componenti del kit ad altri componenti non contenuti nel kit, ad eccezione di quanto descritto nel *Manuale del PAXgene Blood RNA Kit* e nei protocolli aggiuntivi disponibili sul sito [www.PreAnalytiX.com](http://www.PreAnalytiX.com).
2. Se non espressamente dichiarato nelle licenze, PreAnalytiX non garantisce in alcun modo che questi kit e/o il relativo impiego non violino i diritti di terze parti.
3. Questo kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per un solo utilizzo e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. PreAnalytiX esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit concordano nel non consentire a nessuno di intervenire o consentire ad altri di realizzare o contribuire a realizzare azioni proibite.
6. PreAnalytiX può imporre presso qualunque tribunale i divieti del presente Contratto di Licenza Limitato e recupererà tutte le spese di indagine e spese legali, comprese le parcelle degli avvocati, in qualunque azione per imporre il presente Contratto di Licenza Limitato o qualsiasi diritto di proprietà intellettuale correlato al kit e/o ai suoi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, consultare il sito [www.PreAnalytiX.com](http://www.PreAnalytiX.com).

#### **Vendita condizionale**

Questo prodotto viene fornito con licenza ai sensi di determinate rivendicazioni dei brevetti US-7,270,953 e US-7,682,790, nonché EP-1820793 B1 ed equivalenti esteri delle stesse, che definiscono l'uso del prodotto per la processazione del complesso di acidi nucleici formati durante il prelievo di campioni in una PAXgene Blood RNA Tube (provetta PAXgene Blood RNA).

HB-0101-006 BD-8945 1120409 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, tutti i diritti riservati.

**PreAnalytiX Company**

**PreAnalytiX GmbH**

**Feldbachstrasse**

**CH – 8634 Hombrechtikon**

**Svizzera**

**[www.PreAnalytiX.com](http://www.PreAnalytiX.com)**

#### **Distributori PreAnalytiX**

I prodotti PreAnalytiX vengono realizzati per PreAnalytiX da QIAGEN o da BD e distribuiti per conto di PreAnalytiX da QIAGEN. I prodotti non possono essere ordinati direttamente presso PreAnalytiX GmbH.

Per informazioni di contatto per il distributore PreAnalytiX locale, consultare l'ultima pagina.

# Sommario

Contenuto del kit .....	5
Simboli .....	6
Condizioni di conservazione.....	7
Uso previsto .....	8
Limiti per l'uso del prodotto.....	8
Controllo qualità.....	9
Assistenza tecnica .....	9
Informazioni sulla sicurezza .....	9
Introduzione.....	13
Principio e procedura.....	13
Prelievo e stabilizzazione del campione.....	13
Concentrazione e purificazione dell'RNA.....	19
Purificazione dell'RNA manuale .....	19
Purificazione dell'RNA in automatico .....	29
Strumenti e reagenti non forniti.....	35
Note importanti .....	37
Uso del QIAcube.....	37
Avviamento del QIAcube .....	37
Installazione dei protocolli sul QIAcube .....	37
Caricamento del QIAcube.....	38
Protocollo: Purificazione manuale dell'RNA totale da sangue umano intero raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	48

Protocollo: purificazione in automatico dell'RNA totale da sangue umano intero raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ..... 55

Guida alla risoluzione dei problemi ..... 62

Appendice A: Note generali per il trattamento dell'RNA ..... 65


Appendice B: Determinazione della concentrazione, resa e purezza dell'RNA totale ..... 66

Appendice C: Utilizzo delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ..... 68

Informazioni per gli ordini ..... 69

Cronologia delle revisioni del manuale ..... 71

# Contenuto del kit

<b>PAXgene Blood RNA Kit</b>			<b>(50)</b>
<b>N. di catalogo</b>			<b>762174</b>
<b>Numero di preparazioni</b>			<b>50</b>
BR1	Resuspension Buffer (Tampone di risospensione)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer* (Tampone di legame)	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1* (Tampone di lavaggio 1*)	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) <sup>†</sup> (Tampone di lavaggio 2 (concentrato))	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Tampone di eluizione)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-free Water (bottle) (Acqua priva di RNasi (flacone))	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid) (Proteinasi K (tappo verde))	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (Colonnine PAXgene RNA (rosse))	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (Provette di reazione) (2 ml)	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures (Chiusure secondarie BD Hemogard™)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (Provette per microcentrifuga) (1.5 ml)	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNasi I, priva di RNasi (liofilizzata))	DNA REM	1500 unità Kunitz <sup>‡</sup>
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (Tampone di digestione DNA (tappo bianco))	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (Tampone di risospensione DNasi (provetta, tappo lilla))	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (Colonnine PAXgene Shredder (lilla))	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Manuale	Manuale del PAXgene Blood RNA Kit (Versione 2)		1

\*Non compatibile con disinfettanti a base di candeggina. Contiene un sale di guanidina. Per le informazioni di sicurezza, consultare pag.9.

<sup>†</sup> Il tampone di lavaggio 2 (BR4) viene fornito come concentrato. Per ottenere una soluzione di lavoro, al primo utilizzo aggiungere 4 volumi di etanolo (96-100%, grado di purezza p. a. – per analisi), come indicato sul flacone.

<sup>‡</sup> L'unità Kunitz viene normalmente utilizzata per misurare la DNasi I. Un'unità Kunitz si definisce come la quantità di DNasi I che provoca in A<sub>260</sub> un aumento dell'assorbanza di 0,001 per minuto e millilitro a 25°C e pH 5,0, utilizzando come substrato DNA altamente polimerizzato (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 e 363).

# Simboli



Contenuto sufficiente per <N> test



Consultare le istruzioni per l'uso



Data di scadenza



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Numero di catalogo



Numero di lotto



Numero di materiale



Componenti



Numero



Metodo di sterilizzazione con radiazioni



Unità Kunitz



Aggiunta



Contiene



Ricostituito



Desossiribonucleasi I



Etanolo



Guanidina isotiocianato

## RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

## GTIN

Global Trade Item Number



Non riutilizzare



Limite di temperatura



Limite superiore di temperatura



Produttore



Nota importante



Annotare la data corrente dopo aver aggiunto etanolo al flacone



Al momento della consegna



Porta a

## Condizioni di conservazione

Le colonnine PAXgene RNA (PRC), le colonnine PAXgene Shredder (PSC), nonché la proteinasi K (PK) e i tamponi (BR1, BR2, BR3, BR4 e BR5) possono essere conservati in un luogo asciutto alla temperatura indicata sull'etichetta del kit.

L'RNase-Free DNase Set, che contiene DNasi I (RNFD), tampone di digestione DNA (RDD) e tampone di risospensione della DNasi (DRB), viene fornito a temperatura ambiente. Alla consegna, conservare tutti i componenti dell'RNase-Free DNase Set alla temperatura indicata in etichetta. Se conservato correttamente, il kit è stabile fino alla data di scadenza riportata sulla rispettiva scatola.

# Uso previsto

Il PAXgene Blood RNA Kit è destinato alla purificazione del RNA intracellulare da sangue intero, raccolto nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Usando il kit in combinazione con la PAXgene Blood RNA Tube (BRT) il sistema fornisce RNA intracellulare purificato da sangue intero umano per i test di diagnostica clinica molecolare basati sulla RT PCR. Per informazioni sull'impiego di PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), vedere il manuale PAXgene Blood RNA Tube (*PAXgene Blood RNA Tube Handbook*).

**Le caratteristiche di performance di PAXgene Blood RNA System indicate in questo manuale valgono per i trascritti genetici FOS e IL1B. È responsabilità di chi utilizza il prodotto stabilire per il PAXgene Blood RNA System relative caratteristiche di performance per altri trascritti target.**

## Limiti per l'uso del prodotto

Il PAXgene Blood RNA Kit è concepito per la purificazione dell'RNA intracellulare da sangue intero umano ( $4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$  leucociti/ml) per applicazioni di diagnostica in vitro. Non è destinato alla purificazione del DNA genomico o di acidi nucleici virali da sangue intero umano. A causa del numero limitato di trascritti validati per le specifiche di stabilizzazione (trascritti genetici FOS e IL1B), le caratteristiche di performance del kit non sono state definite per tutti i trascritti. È compito di chi utilizza il prodotto verificare se per altri trascritti sia necessaria una validazione.

Questo prodotto è rivolto a utenti professionisti, quali tecnici e medici esperti nelle procedure diagnostiche in vitro.



# Controllo qualità

In conformità al sistema di gestione della qualità secondo le norme ISO di QIAGEN, ogni lotto del PAXgene Blood RNA Kit viene testato in base a criteri di controllo prestabiliti, rispetto a specifiche prestabilite, per garantire la costante qualità del prodotto.

# Assistenza tecnica

QIAGEN è orgogliosa della qualità e della disponibilità del proprio supporto tecnico. Personale qualificato e di grande esperienza nel settore della biologia molecolare è a vostra disposizione per qualsiasi domanda riguardante i prodotti PreAnalytiX. In caso di dubbi sul PAXgene Blood RNA Kit non esitate a contattarci.

Per ottenere assistenza tecnica e altre informazioni, rivolgersi al servizio di assistenza tecnica QIAGEN.

# Informazioni sulla sicurezza

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi.

Per ridurre il rischio di infezione (ad esempio, da HIV o dai virus dell'epatite B) o lesioni, quando si opera con materiali biologici o sostanze chimiche, indossare sempre un adeguato camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione. Per maggiori informazioni, consultare le schede di sicurezza sul prodotto (SDS) appropriate. Le schede sono disponibili online nel pratico formato PDF sul sito **[www.PreAnalytiX.com](http://www.PreAnalytiX.com)**, dove è possibile cercare, visualizzare e stampare le schede SDS di questo kit.

**ATTENZIONE** NON aggiungere candeggina o soluzioni acide direttamente nelle preparazioni di campione da eliminare.



Il tampone di legame (BR2) e quello di lavaggio 1 (BR3) contengono guanidina tiocianato, che può formare composti altamente reattivi in combinazione con la candeggina. Se si rovescia liquido contenente questi tamponi, pulire con un idoneo detergente da laboratorio e acqua. Se il liquido contiene agenti potenzialmente infettivi, innanzitutto pulire l'area interessata con acqua e detergente da laboratorio, e successivamente con una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% (v/v).

La soluzione di stabilizzazione per l'RNA e il sangue contenuto nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT) possono essere disinfettati utilizzando 1 volume di una soluzione di candeggina disponibile in commercio (ipoclorito di sodio al 5%) per 9 volumi di soluzione di stabilizzazione per l'RNA e di sangue.

I residui della preparazione del campione, ad esempio i sovrantanti provenienti dalle fasi di centrifugazione delle procedure di purificazione dell'RNA, devono essere considerati sempre potenzialmente infettivi. Per questo devono essere autoclavati o inceneriti per distruggere qualsiasi materiale infettivo. Lo smaltimento deve essere effettuato in conformità alle normative ufficiali vigenti.

Ai componenti del PAXgene Blood RNA Kit sono associate le seguenti informazioni su rischi e misure precauzionali. Per informazioni sulla sicurezza relative a PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), consultare il manuale PAXgene Blood RNA Tube.

### Tampone BR2



Contiene guanidina tiocianato. Pericolo! Nocivo se ingerito. Può essere nocivo in caso di contatto con la pelle o se inalato. Causa grave danno oculare. Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. A contatto con acidi libera gas molto tossico. Indossare guanti/Indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

### Tampone BR3



Contiene etanolo, guanidina tiocianato. Pericolo! Liquido e vapore infiammabile. Causa grave danno oculare. A contatto con acidi libera gas molto tossico. Conservare lontano da fonti di calore/scintille/fiamme libere/superfici molto calde. Non fumare. Indossare guanti/Indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

### DNasi I



Contiene: DNasi. Pericolo! Può provocare una reazione allergica cutanea. Se inalato, può causare sintomi di asma e allergia o difficoltà respiratorie. Evitare di respirare le polveri/i fumi/i gas/il prodotto nebulizzato/i vapori/gli aerosol. Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso. Indossare una protezione per la respirazione. IN CASO di esposizione o di possibile esposizione: Contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Portare la vittima all'aria aperta e mantenerla tranquilla in posizione confortevole per la respirazione.

## Proteinasi K



Contenuto: proteinasi K. Pericolo! Provoca irritazione cutanea lieve. Se inalato, può causare sintomi di asma e allergia o difficoltà respiratorie. Evitare di respirare le polveri/i fumi/i gas/il prodotto nebulizzato/i vapori/gli aerosol. Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso. Indossare una protezione per la respirazione. IN CASO di esposizione o di possibile esposizione: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Portare la vittima all'aria aperta e mantenerla tranquilla in posizione confortevole per la respirazione.

# Introduzione

La raccolta del sangue intero è la prima fase di molti test molecolari utilizzati per lo studio dell'RNA cellulare. Tuttavia, uno dei problemi principali in questi casi è l'instabilità del profilo dell'RNA cellulare in vitro. Studi effettuati da PreAnalytiX hanno mostrato che il numero di copie delle singole specie di mRNA nel sangue intero può variare di oltre 1.000 volte durante la conservazione e il trasporto a temperatura ambiente.\* Ciò è provocato dalla rapida degradazione dell'RNA e dall'espressione indotta di alcuni geni dopo il prelievo ematico. Tali modifiche nel profilo dell'RNA impediscono di effettuare studi attendibili sull'espressione genica. Per un'analisi accurata dell'espressione genica nel sangue intero umano è quindi essenziale un metodo per conservare il profilo di espressione dell'RNA durante e dopo la flebotomia.

## Principio e procedura

PreAnalytiX ha sviluppato un nuovo sistema che consente il prelievo, la stabilizzazione, la conservazione e il trasporto di campioni di sangue intero umano nonché un rapido ed efficiente protocollo per la purificazione dell'RNA intracellulare. Il sistema richiede l'uso di PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; brevetti USA 6,602,718 e 6,617,170) per il prelievo del sangue e la stabilizzazione dell'RNA, seguiti da una purificazione manuale o automatica mediante PAXgene Blood RNA Kit. Entrambi i protocolli, manuale e in automatico, forniscono sostanzialmente un'analogia performance per quanto riguarda la qualità e la resa dell'RNA. I dati di performance per il protocollo manuale (pag. 22–29) e il protocollo in automatico (pag. 32–34) sono inclusi in questo manuale.

## Prelievo e stabilizzazione del campione

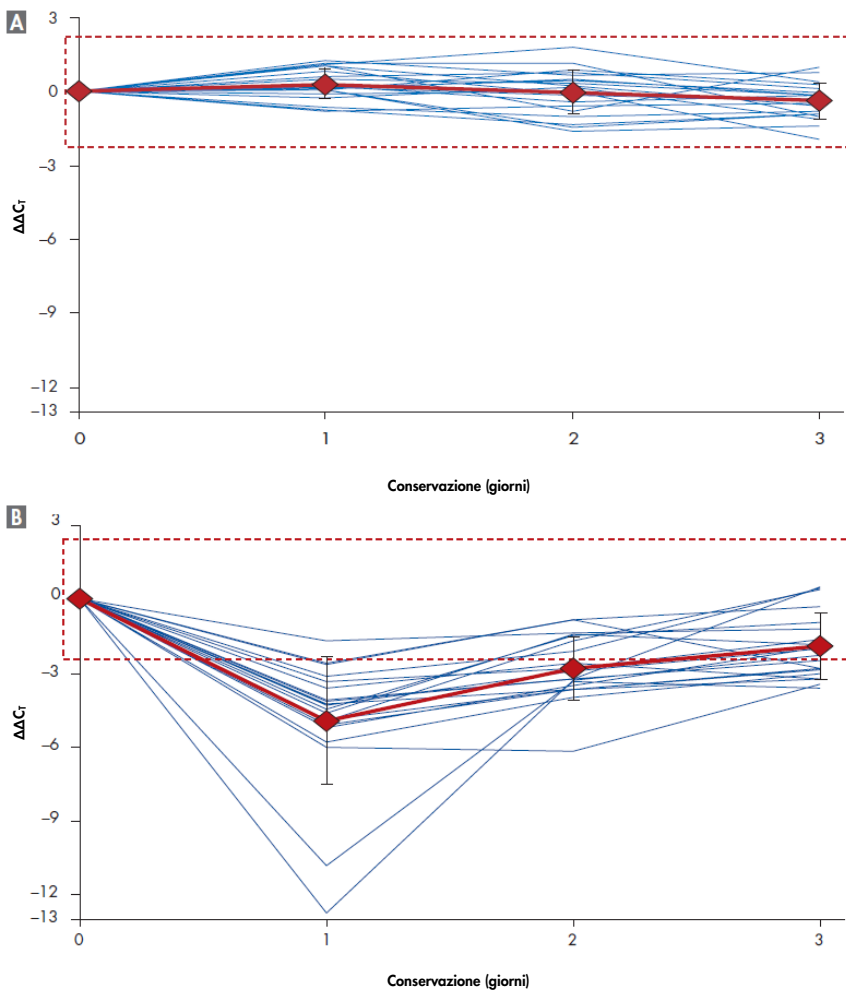
Le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) contengono un reagente basato su una tecnologia di stabilizzazione dell'RNA coperta da brevetto. Questa composizione di reagenti protegge le molecole dalla degradazione causata dalla RNasi e minimizza i cambiamenti ex vivo nell'espressione genica. Le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) per il prelievo di sangue umano

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

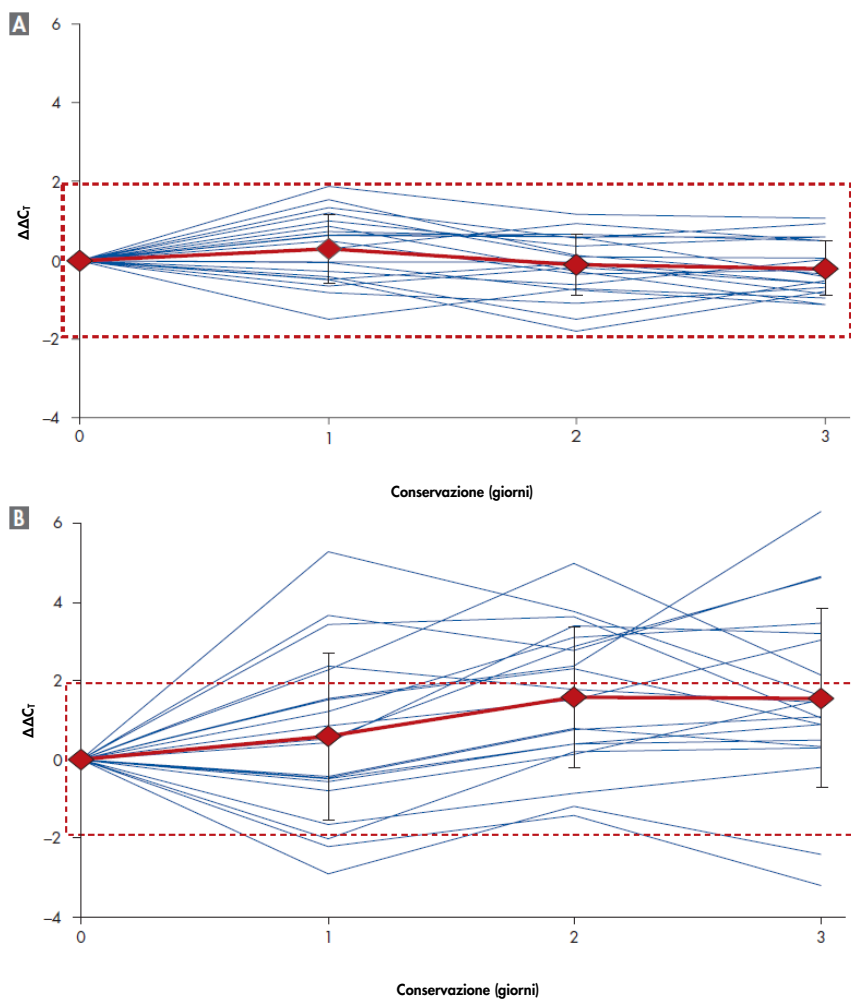
intero garantiscono la stabilizzazione dell'RNA cellulare fino a 3 giorni a 18–25°C (Figure 1 e 2, pag. 15 e 16) o fino a 5 giorni a 2–8°C (Figure 3 e 4, pag. 17 e 18). I dati attualmente disponibili mostrano che a –20°C o –70°C\* l'RNA cellulare rimane stabile per almeno 11 anni. Per ulteriori informazioni su periodi di stabilizzazione più lunghi contattare il servizio di assistenza tecnica QIAGEN.

La durata reale della stabilizzazione dell'RNA può variare in base alla specie di RNA cellulare e dall'applicazione downstream. A causa del numero limitato di trascritti validati per le specifiche di stabilizzazione (trascritti genetici FOS e IL1B), le caratteristiche di performance del kit non sono state definite per tutti i trascritti. È compito di chi utilizza il prodotto verificare se per altri trascritti sia necessaria una validazione.

\* È in corso uno studio a lungo termine sulla conservazione del sangue nelle PAXgene Blood RNA Tubes.

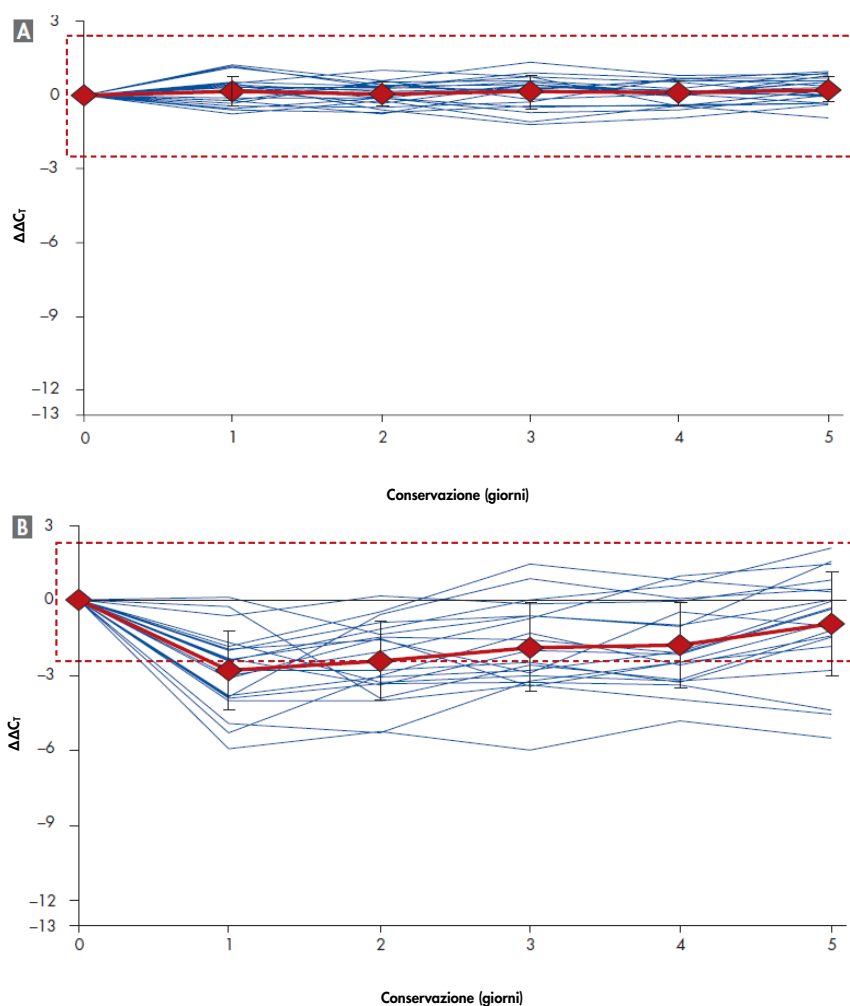


**Figura 1. Stabilità dell'RNA in campioni di sangue a 18–25°C: FOS.** Il sangue è stato prelevato da 10 donatori, con campioni in duplicato, e conservato a 18–25°C per il numero di giorni indicato. Quindi è stata eseguita la purificazione dell'RNA totale. **[A]** Il sangue è stato prelevato e conservato nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) e l'RNA totale è stato purificato con il PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Il sangue è stato prelevato e conservato in provette standard per il prelievo ematico trattate con EDTA come anticoagulante. L'RNA totale è stato purificato utilizzando un metodo standard di estrazione organica con purificazione basata su membrane di silice. I livelli relativi di trascrizione del gene FOS sono stati determinati mediante RT PCR duplex in tempo reale utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Nel grafico sono riportati i valori per tutti i campioni analizzati, con le medie e le deviazioni standard. Le linee tratteggiate indicano la precisione totale  $\pm 3x$  del test (2,34  $C_t$ ).

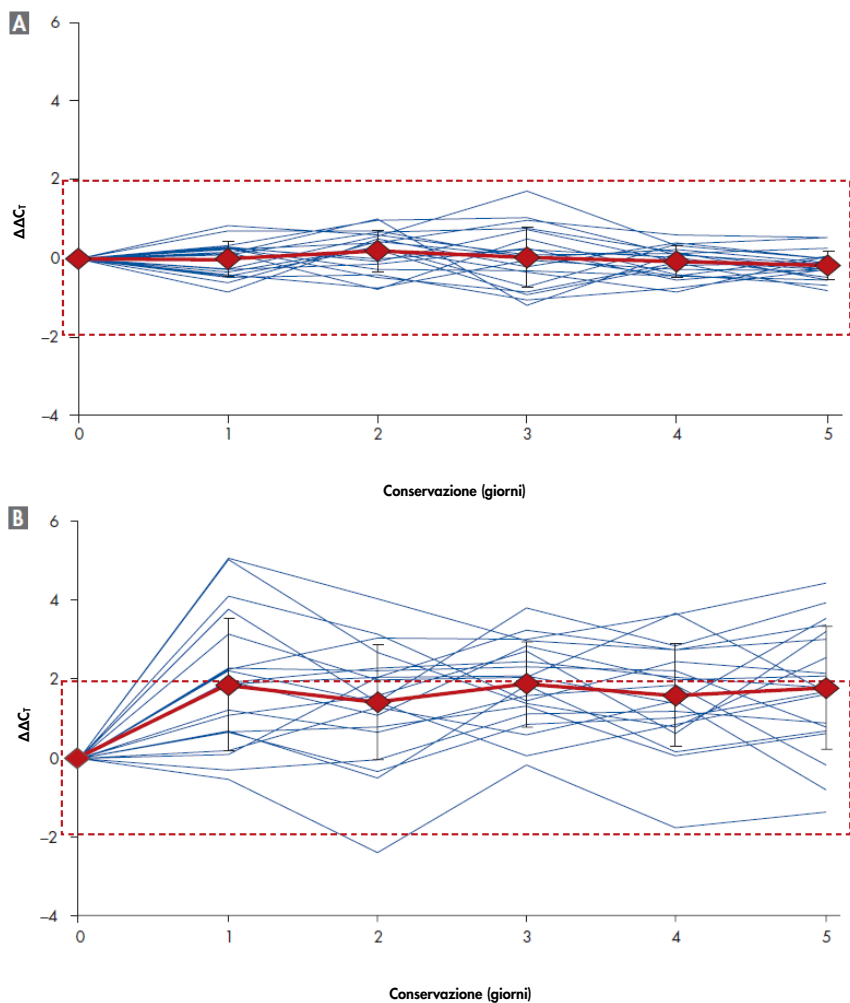


**Figura 2. Stabilità dell'RNA in campioni di sangue a 18–25°C: IL1B.** Il prelievo del sangue e la purificazione dell'RNA sono avvenuti, dopo conservazione a 18–25°C, come descritto nella Figura 1. I livelli relativi di trascrizione di IL1B sono stati determinati mediante RT PCR duplex in tempo reale utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Nel grafico sono riportati i valori per tutti i campioni analizzati, con le medie e le deviazioni standard. Le linee tratteggiate indicano la precisione totale  $\pm 3 \times$  del test ( $1,93 C_T$ ).





**Figura 3. Stabilità dell'RNA in campioni di sangue a 2-8°C: FOS.** Il sangue è stato prelevato da 10 donatori, con campioni in duplicato, e conservato a 2-8°C per il numero di giorni indicato. Quindi è stata eseguita la purificazione dell'RNA totale. **[A]** Il sangue è stato prelevato e conservato nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) e l'RNA totale è stato purificato con il PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Il sangue è stato prelevato e conservato in provette standard per il prelievo ematico trattate con EDTA come anticoagulante. L'RNA totale è stato purificato utilizzando un metodo standard di estrazione organica con purificazione basata su membrane di silice. I livelli relativi di trascrizione del gene FOS sono stati determinati mediante RT PCR duplex in tempo reale utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Nel grafico sono riportati i valori per tutti i campioni analizzati, con le medie e le deviazioni standard. Le linee tratteggiate indicano la precisione totale  $\pm 3x$  del test (2,34  $C_t$ ).



**Figura 4. Stabilità dell'RNA in campioni di sangue a 2-8°C: IL1B.** Il prelievo del sangue e la purificazione dell'RNA sono avvenuti, dopo conservazione a 2-8°C, come descritto nella Figura 3. I livelli relativi di trascrizione di IL1B sono stati determinati mediante RT PCR duplex in tempo reale utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Nel grafico sono riportati i valori per tutti i campioni analizzati, con le medie e le deviazioni standard. Le linee tratteggiate indicano la precisione totale  $\pm 3x$  del test ( $1,93 C_t$ ).

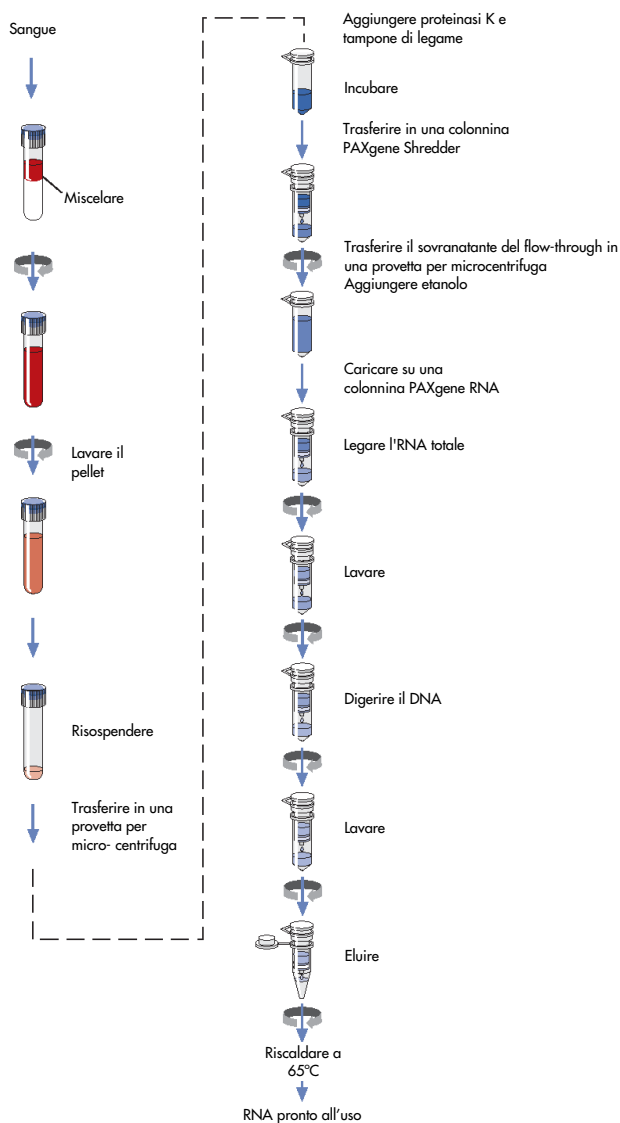
## Concentrazione e purificazione dell'RNA

Il PAXgene Blood RNA Kit è destinato alla purificazione dell'RNA totale da 2,5 ml di sangue intero umano raccolto in una PAXgene Blood RNA Tube (BRT). La procedura è semplice e può essere realizzata in automatico o manualmente (vedere le Figure 5 e 10, pagg- 20 e 30). In entrambi i protocolli, la purificazione inizia con una fase di centrifugazioni per fare precipitare gli acidi nucleici nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Il pellet viene lavato e risospeso e segue poi la purificazione manuale o in automatico dell'RNA. Di massima, i due protocolli seguono le stesse fasi del protocollo con gli stessi componenti del kit.

### Purificazione dell'RNA manuale

Dettagliatamente: il pellet risospeso viene incubato in tamponi ottimizzati con proteinasi K(PK) per la digestione delle proteine. Per omogeneizzare il lisato cellulare e rimuovere i detriti cellulari, si effettua una centrifugazione aggiuntiva utilizzando la colonnina PAXgene Shredder (PSC). Il sovranatante della frazione di flow-through viene trasferito in una microprovetta per centrifuga pulita. Per ottimizzare le condizioni di legame si aggiunge etanolo, quindi il lisato viene introdotto nella colonnina PAXgene RNA (PRC). Con una breve centrifugazione l'RNA si lega selettivamente alla membrana in silice PAXgene mentre i contaminanti vengono eliminati. Eventuali altri contaminanti vengono rimossi nelle successive ed efficienti fasi di lavaggio. Fra la prima e la seconda fase di lavaggio la membrana viene incubata con DNasi I (RNFD) per eliminare qualsiasi traccia di DNA legato. Dopo le fasi di lavaggio l'RNA viene eluito nel tampone di eluizione (BR5) e denaturato al caldo.

L'RNA totale purificato usando il PAXgene Blood RNA System è puro. Usando il protocollo manuale, i valori  $A_{260}/A_{280}$  sono compresi tra 1,8 e 2,2, e  $\leq 1\%$  (w/w) di DNA genomico è presente in  $\geq 95\%$  di tutti i campioni, come misurato da PCR quantitativa in tempo reale di una sequenza del gene beta-actin. Almeno il 95% dei campioni non ha mostrato inibizione nella RT-PCR, quando si è usato fino al 30% dell'eluato.

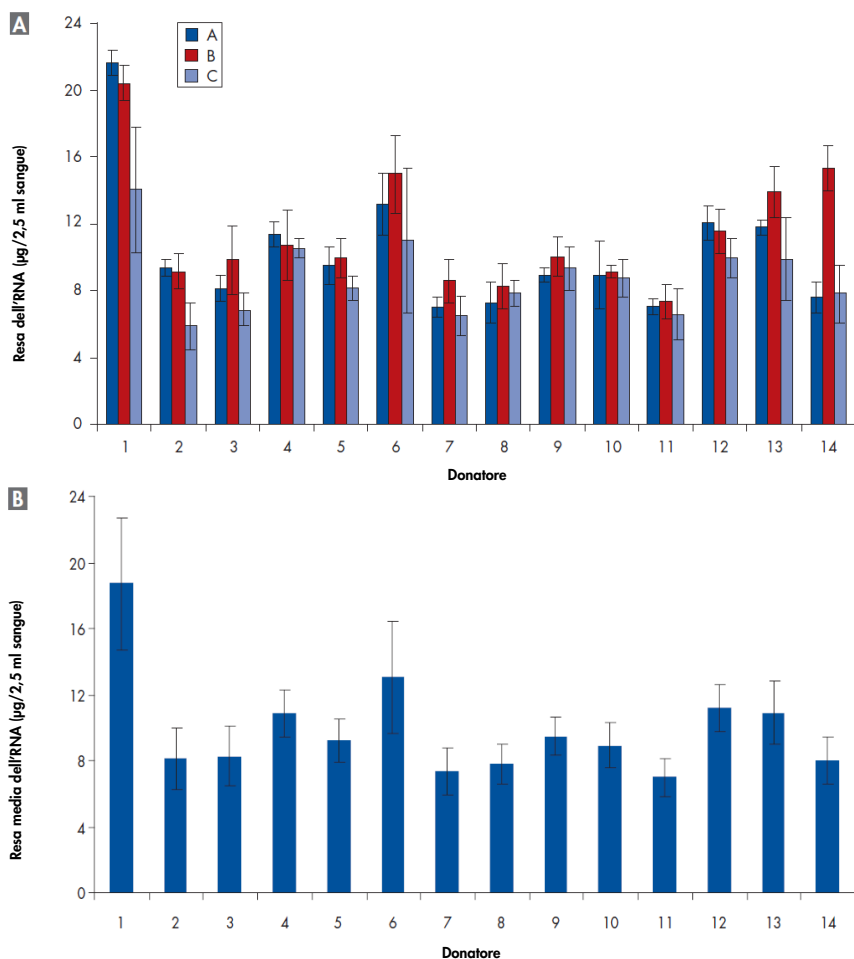


**Figura 5. Procedura PAXgene Blood RNA manuale.**

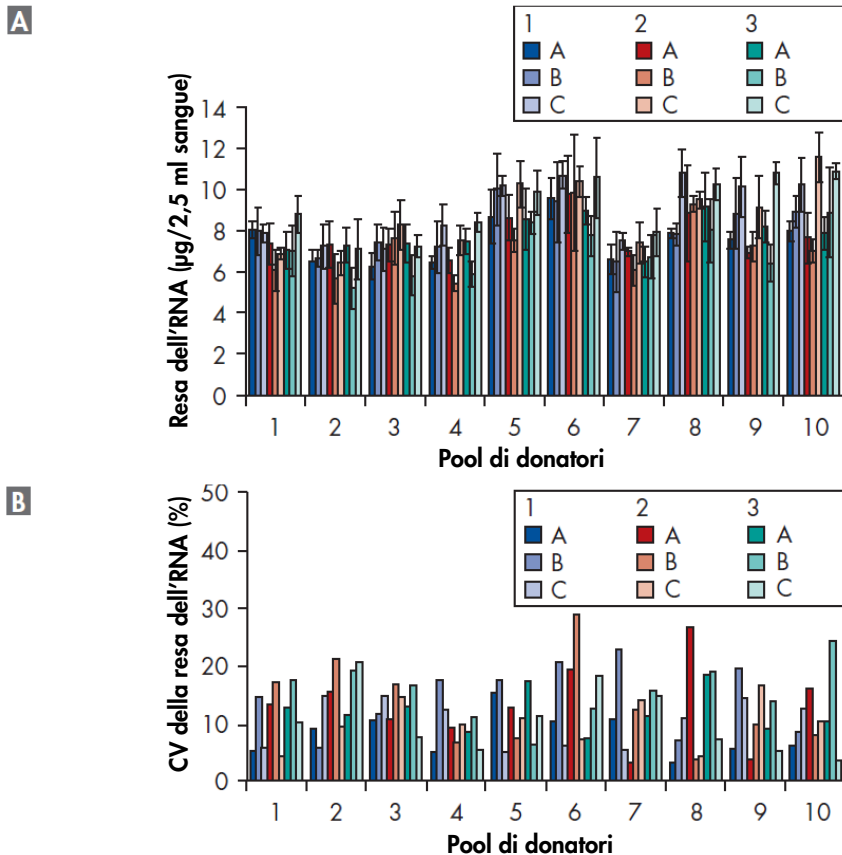
Usando il protocollo manuale, il tempo medio di preparazione dei campioni (in base ai dati da 12 preparazioni dei campioni) è circa 90 minuti\*, con soli 40 minuti di passaggi manuali. Le rese dell'RNA da 2,5 ml di sangue umano intero da donatori sani sono  $\geq 3 \mu\text{g}$  per il  $\geq 95\%$  dei campioni processati. Le rese sono in ogni caso strettamente legate allo stato di salute del donatore e possono variare da un individuo all'altro. Per le analisi di singoli donatori, il sistema PAXgene Blood RNA fornisce rese altamente riproducibili e ripetibili (Figure 6 e 7, pagg. 22 e 23) e risultati per la RT-PCR riproducibili e ripetibili (Figure 8 e 9, pagg. 27 e 28), dimostrandosi quindi l'ideale per i test di diagnostica clinica.

La Figura 6 (pag. 22) mostra la riproducibilità e la ripetibilità complessive di PAXgene Blood RNA System. Sono stati condotti ulteriori studi per mostrare quanto i diversi lotti del PAXgene Blood RNA Kit e i differenti operatori possano influire sulla riproducibilità della resa dell'RNA e dei risultati per la RT-PCR in tempo reale. Poiché per queste analisi sono stati utilizzati campioni di sangue analizzati in pool – anziché campioni raccolti singolarmente con le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) – i risultati di tali esperimenti non rispecchiano la precisione della ripetibilità del sistema, che tiene conto anche delle differenze nel prelievo del sangue, ma solamente la precisione della ripetibilità nella preparazione del campione (vedere Figura 7, pag. 23).

\* Durata totale di esecuzione, inclusa la manipolazione iniziale delle PAXgene Blood RNA Tubes (centrifughe, lavaggio e risospensione del pellet).



**Figura 6. Purificazione dell'RNA riproducibile e ripetibile.** Campioni di sangue di 14 donatori sono stati processati manualmente in quadruplicato da 3 tecnici (A, B, C). Sono stati utilizzati tre set di strumenti di laboratorio e tutti i campioni preparati da un tecnico sono stati processati con gli stessi strumenti. **[A]** Sono rappresentate medie e deviazioni standard della resa dell'RNA per campioni replicati dello stesso donatore e con tecnici diversi. **[B]** Dodici campioni di sangue in replica da ciascuno dei 14 donatori sono stati processati da 3 tecnici diversi. Sono rappresentate medie e deviazioni standard della resa dell'RNA per campioni dello stesso donatore e con tutti i tecnici. Per tutti i campioni di RNA, il rapporto  $A_{260}/A_{280}$  era compreso tra 1,8 e 2,2.



**Figura 7. Ripetibilità e riproducibilità della resa dell'RNA con differenti operatori e diversi lotti del PAXgene Blood RNA Kit impiegando campioni di sangue in pool.** Campioni di sangue di 30 differenti donatori sono stati raccolti nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 provette per donatore, 360 provette in totale). Il contenuto dei campioni da 3 donatori è stato messo in pool e rialiquotato in 36 campioni. Questi 36 campioni per ogni pool di 3 donatori sono stati processati manualmente da 3 diversi operatori. Ogni operatore ha utilizzato il PAXgene Blood RNA Kit da 3 diversi lotti per l'estrazione e da quadruplicati già processati da ognuno dei 10 pool. **[A]** Resa dell'RNA e deviazione standard per ogni combinazione lotto-operatore. I campioni di sangue di 10 pool di donatori sono stati processati da 3 diversi operatori (A, B e C) con ognuno dei 3 lotti di kit (1, 2 e 3). Sono riportate le rese medie (colonne) e le deviazioni standard (barre di errore) per quadruplicato di campione dello stesso pool di donatori per diversi operatori e lotti di kit. **[B]** Coefficiente di variazione (CV) della resa dell'RNA per pool di donatori per tutte le combinazioni operatore-lotto (A, B e C; 1, 2 e 3), calcolato dalla resa media e dalla deviazione standard riportate nella Figura 7A.

**Tabella 1A. Riproducibilità nell'ambito di ogni lotto e per ogni tecnico per pool di donatori selezionati (1, 6, 9, 10)**

Combinazione di dati	Pool donatori 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> cellule/ml			Pool donatori 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> cellule/ml		
	Resa media (µg)	SD (µg)	CV* (%)	Resa media (µg)	SD (µg)	CV* (%)
Lotto 1, tecnico A	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
Lotto 1, tecnico B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
Lotto 1, tecnico C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
Lotto 2, tecnico A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
Lotto 2, tecnico B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
Lotto 2, tecnico C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
Lotto 3, tecnico A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
Lotto 3, tecnico B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
Lotto 3, tecnico C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
Combinazione di dati	Pool donatori 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> cellule/ml			Pool donatori 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> cellule/ml		
	Resa media (µg)	SD (µg)	CV* (%)	Resa media (µg)	SD (µg)	CV* (%)
Lotto 1, tecnico A	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
Lotto 1, tecnico B	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Lotto 1, tecnico C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Lotto 2, tecnico A	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Lotto 2, tecnico B	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Lotto 2, tecnico C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Lotto 3, tecnico A	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Lotto 3, tecnico B	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Lotto 3, tecnico C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3



**Tabella 1B. Riproducibilità per ogni tecnico e tra tutti i lotti per pool di donatori selezionati (1, 6, 9, 10)**

Combinazione di dati	Pool donatori 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> cellule/ml			Pool donatori 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> cellule/ml		
	Resa media (µg)	SD (µg)	CV* (%)	Resa media (µg)	SD (µg)	CV* (%)
Tecnico A, tutti i lotti	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Tecnico B, tutti i lotti	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Tecnico C, tutti i lotti	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Combinazione di dati	Pool donatori 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> cellule/ml			Pool donatori 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> cellule/ml		
	Resa media (µg)	SD (µg)	CV* (%)	Resa media (µg)	SD (µg)	CV* (%)
Tecnico A, tutti i lotti	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Tecnico B, tutti i lotti	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Tecnico C, tutti i lotti	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

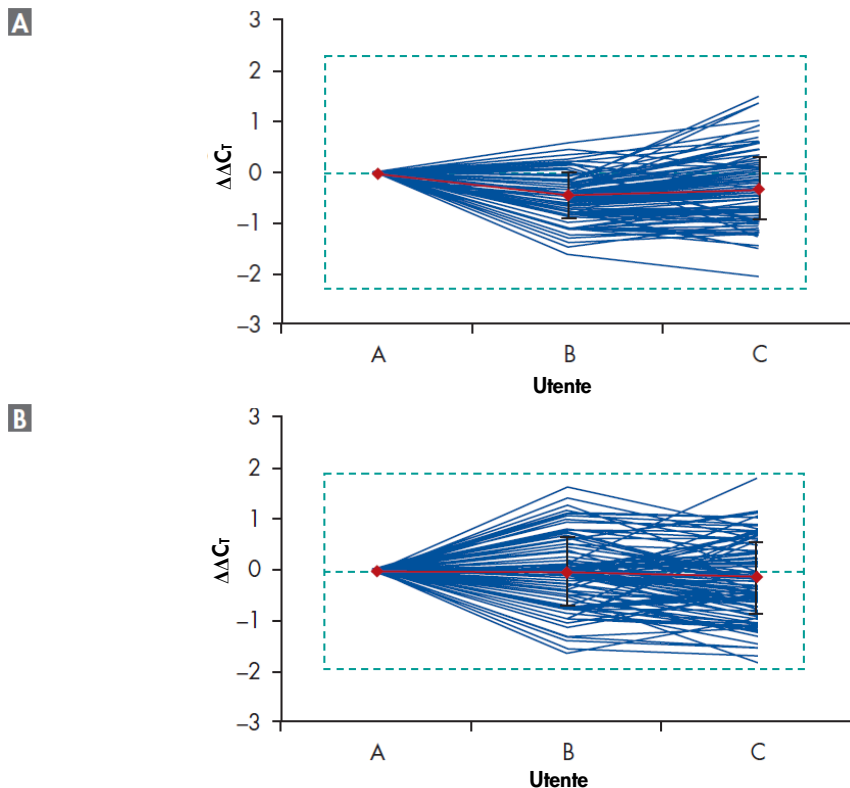
**Tabella 1C. Riproducibilità nell'ambito di ogni lotto e tra tutti i tecnici per pool di donatori selezionati (1, 6, 9, 10)**

Combinazione di dati	Pool donatori 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> cellule/ml			Pool donatori 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> cellule/ml		
	Resa media (µg)	SD (µg)	CV* (%)	Resa media (µg)	SD (µg)	CV* (%)
Lotto 1, tutti i tecnici	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Lotto 2, tutti i tecnici	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Lotto 3, tutti i tecnici	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Combinazione di dati	Pool donatori 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> cellule/ml			Pool donatori 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> cellule/ml		
	Resa media (µg)	SD (µg)	CV* (%)	Resa media (µg)	SD (µg)	CV* (%)
Lotto 1, tutti i tecnici	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Lotto 2, tutti i tecnici	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Lotto 3, tutti i tecnici	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

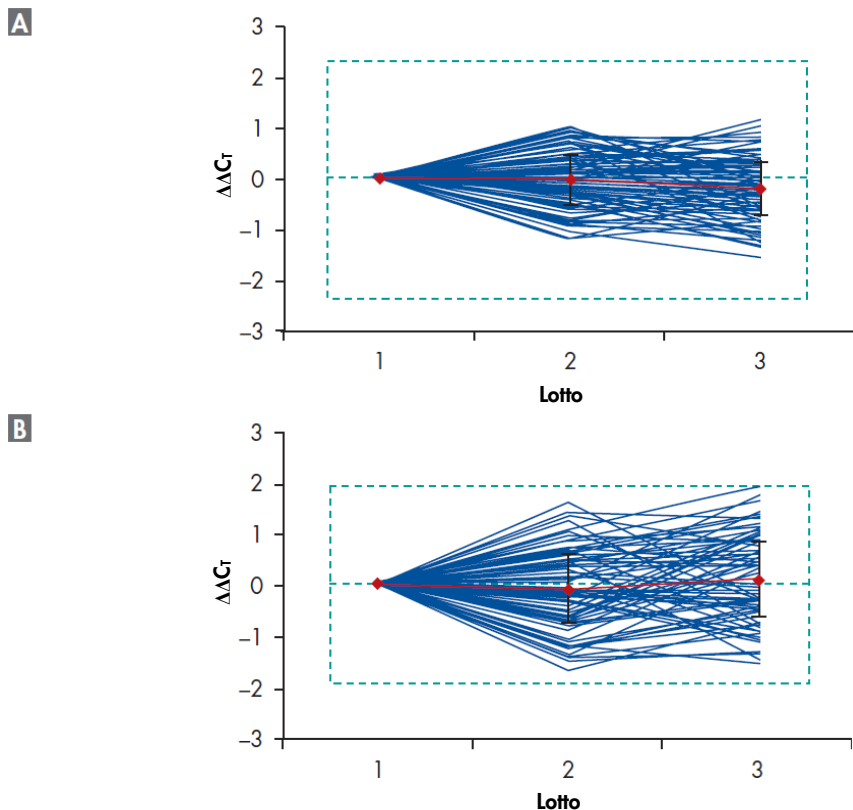
**Tabella 1D. Riproducibilità tra tutti i lotti e tutti i tecnici per pool di donatori selezionati (1, 6, 9, 10)**

Combinazione di dati	Pool donatori 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> cellule/ml			Pool donatori 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> cellule/ml		
	Resa media (µg)	SD (µg)	CV* (%)	Resa media (µg)	SD (µg)	CV* (%)
Lotto 1, tutti i tecnici	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
Combinazione di dati	Pool donatori 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> cellule/ml			Pool donatori 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> cellule/ml		
	Resa media (µg)	SD (µg)	CV* (%)	Resa media (µg)	SD (µg)	CV* (%)
Lotto 1, tutti i tecnici	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Analisi dettagliata di 4 pool di donatori. I pool sono stati scelti in base al numero di leucociti e indicano il valore superiore, medio e inferiore del normale range del numero di leucociti ( $4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$  leuciti/ml). I numeri di leucociti sono stati determinati dalla media dei 3 numeri di leucociti dei 3 donatori di ogni pool.



**Figura 8. Riproducibilità della RT-PCR — tra tecnici.** I campioni di RNA isolati nell'esperimento della Figura 7 sono stati impiegati nella RT PCR in tempo reale. I livelli relativi dei trascritti di **[A]** FOS e **[B]** IL1B sono stati determinati per RT-PCR duplex in tempo reale utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Sono riportati i valori di tutti i campioni, relativamente ai valori per il tecnico 1 (10 pool di donatori x 3 lotti x 4 ripetizioni = 120 set di dati per ogni gene) con valore medio (linee rosse) e deviazione standard (barre nere). Le linee tratteggiate indicano la precisione totale  $\pm 3 \times$  dei dosaggi (FOS: 2,34  $C_t$ ; IL1B: 1,93  $C_t$ ).



**Figura 9. Riproducibilità della RT-PCR — tra lotti di kit.** I campioni di RNA isolati nell'esperimento della Figura 7 sono stati impiegati nella RT PCR in tempo reale. I livelli relativi dei trascritti di **[A] FOS** e **[B] IL1B** sono stati determinati per RT-PCR duplex in tempo reale utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Sono riportati i valori di tutti i campioni, relativamente ai valori per lotto 1 (10 pool di donatori x 3 tecnici x 4 ripetizioni = 120 set di dati per ogni gene) con valore medio (linea rossa) e deviazione standard (barra nera). Le linee tratteggiate indicano la precisione totale  $\pm 3 \times$  dei dosaggi (FOS: 2,34  $C_t$ ; IL1B: 1,93  $C_t$ ).

Tabella 2. Riepilogo dei risultati RT-PCR (riportati nelle Figure 8 e 9)

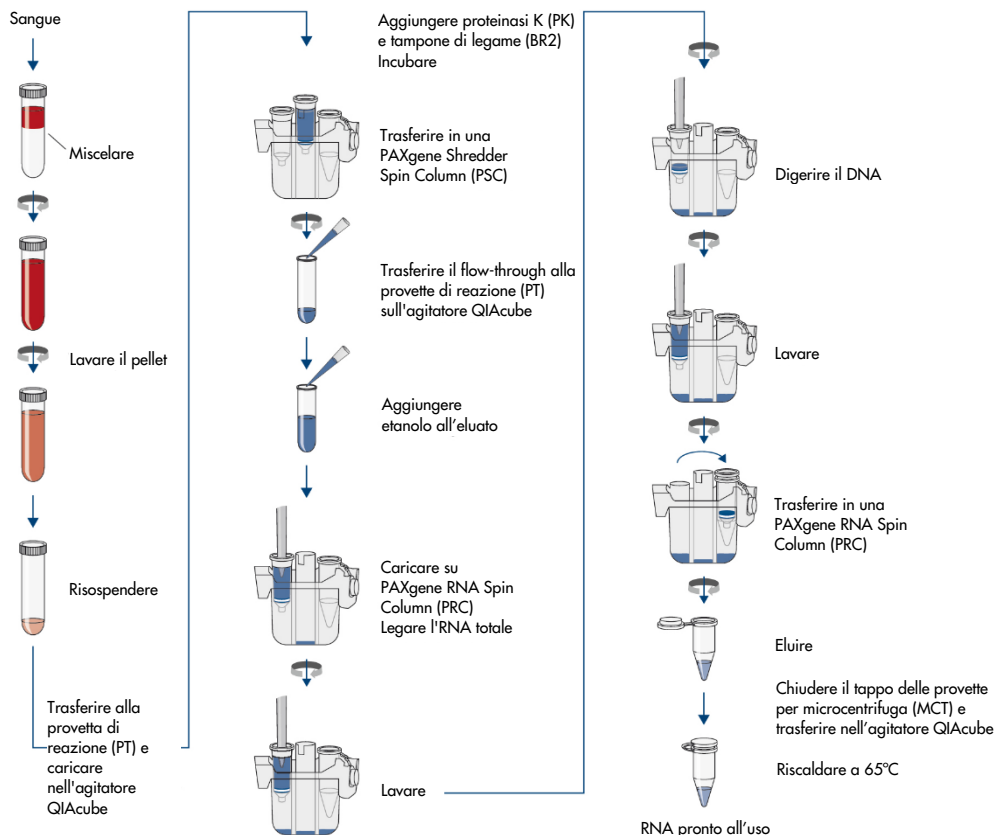
Sistema del test	Dosaggio FOS/rRNA 18S		Dosaggio IL1B/rRNA 18S	
	Valori medi ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SD ( $\Delta\Delta C_T$ )	Valori medi ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SD ( $\Delta\Delta C_T$ )
<b>Riproducibilità tra tutti i lotti per ogni tecnico</b>				
Tutti i tecnici, lotto 1–lotto 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Tutti i tecnici, lotto 1–lotto 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Tutti i tecnici, lotto 1–lotto 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
<b>Riproducibilità tra tutti i lotti per ogni tecnico</b>				
Tutti i lotti, tecnico A–tecnico A	0,00	0,00	0,00	0,00
Tutti i lotti, tecnico A–tecnico B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Tutti i lotti, tecnico A–tecnico C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Utente: assistente tecnico che ha eseguito lo studio.  
Lotto: numero di lotto del kit impiegato.  
DS: Deviazione standard.  
Vengono mostrati i valori  $\Delta\Delta C_T$  medi (N = 120) e le deviazioni standard per i dati presentati nelle Figure 8 e 9.

## Purificazione dell'RNA in automatico

La preparazione dei campioni è automatizzata tramite lo strumento QIAcube® standard (n. cat. 9001882 [110 V], n. cat. 9001293 [230 V]; senza includere QIAcube Connect) e segue le stesse fasi della procedura manuale, che permettono di continuare a usare il PAXgene Blood RNA Kit per la purificazione di RNA di alta qualità. Per ulteriori informazioni sul QIAcube, consultare il manuale utente QIAcube (*QIAcube User Manual*) e visitare la pagina [www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube).

Il protocollo per la purificazione dell'RNA in automatico consiste di 2 parti (o protocolli), il "PAXgene Blood RNA Part A" e il "PAXgene Blood RNA Part B", con un breve intervento manuale tra le 2 parti (vedere la Figura 10, pag. 30).



**Figura 10. Procedura PAXgene Blood RNA in automatico.**

Il pellet dell'acido nucleico centrifugato, lavato e risospeso (vedere "Concentrazione e purificazione dell'RNA", pag. 19) viene trasferito dalla PAXgene Blood RNA Tube (BRT) nelle provette di reazione (PT) che sono posizionate nell'unità termoshaker sul piano di lavoro QIAcube. L'operatore seleziona e fa partire il protocollo "PAXgene Blood RNA Part B" dal menu. Il QIAcube esegue le fasi del protocollo attraverso l'eluizione dell'RNA nel tampone di eluizione (BR5). L'operatore trasferisce le provette per microcentrifuga (MCT), contenenti l'RNA purificato, nell'unità termoshaker del QIAcube. L'operatore seleziona e fa

partire il protocollo "PAXgene Blood RNA Part B" dal menu e il QIAcube esegue la denaturazione a caldo.

Il tempo medio di preparazione del campione (basato sui dati di 12 preparazioni di campioni) è di 151 minuti\*, con un tempo di utilizzo notevolmente inferiore rispetto al protocollo manuale.

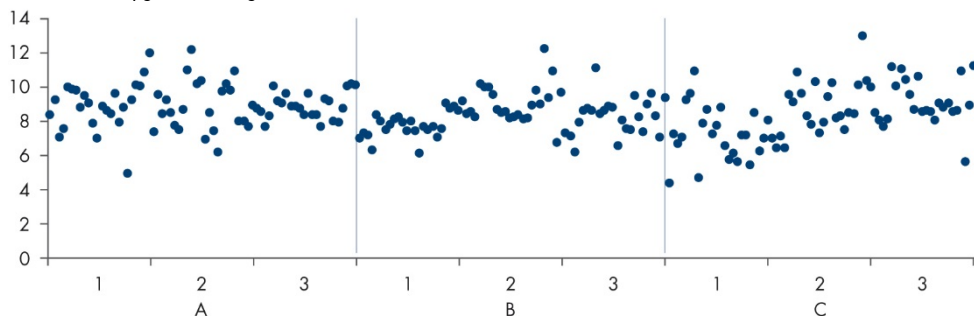
Le rese dell'RNA da 2,5 ml di sangue umano intero da donatori sani sono  $\geq 3$   $\mu\text{g}$  per il  $\geq 95\%$  dei campioni processati. La Figura 11 (pag. 32) indica le rese dell'RNA da un totale di 216 campioni preparati usando il protocollo automatico con 3 lotti di kit con 3 diversi operatori. Quando per questi studi sono stati usati campioni di sangue in pool invece delle singole PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), i risultati non riflettono la resa dell'RNA attesa dai singoli campioni degli estratti di sangue individuali. Poiché le rese dipendono molto dal donatore, le rese individuali possono variare (Figura 11, pag. 32).

Almeno il 95% dei campioni non ha mostrato inibizione nella RT-PCR, quando si è usato fino al 30% dell'eluato. Usando il protocollo in automatico, non sono rilevabili contaminazioni crociate tra i campioni, come misurato con la RT-PCR quantitativa in tempo reale di sequenze di ABL1 e dei trascritti FOS in campioni RNA-negativi (acqua) insieme a campioni RNA-positivi (campioni di sangue intero) nello stesso processo.

L'RNA purificato con PAXgene Blood RNA System e il protocollo in automatico è puro, come risulta evidente dall'assenza di un'inibizione di RT-PCR (vedere la Figura 11, pag. 32) e dai valori  $A_{260}/A_{280}$  tra 1,8 e 2,2. Il DNA genomico è presente a  $\leq 1\%$  (w/w) in  $\geq 95\%$  di tutti i campioni, come misurato dalla PCR quantitativa in tempo reale di una sequenza del gene beta-actin. Le Figure 12 e 13 (pagg. 32 e 33) mostrano i valori  $A_{260}/A_{280}$  e il DNA genomico relativo di un totale di 216 campioni preparati usando il protocollo in automatico con 3 lotti di kit usati da 3 operatori.

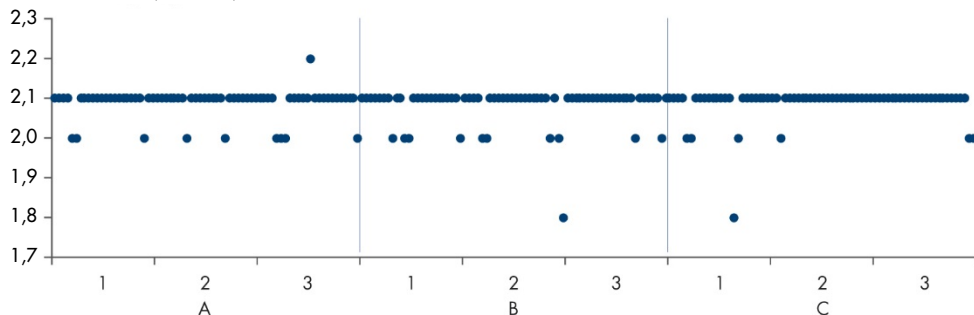
\* Durata totale di esecuzione, inclusa la manipolazione iniziale delle PAXgene Blood RNA Tubes (centrifughe, lavaggio e risospensione del pellet).

Resa dell'RNA ( $\mu\text{g}/2,5 \text{ ml sangue}$ )



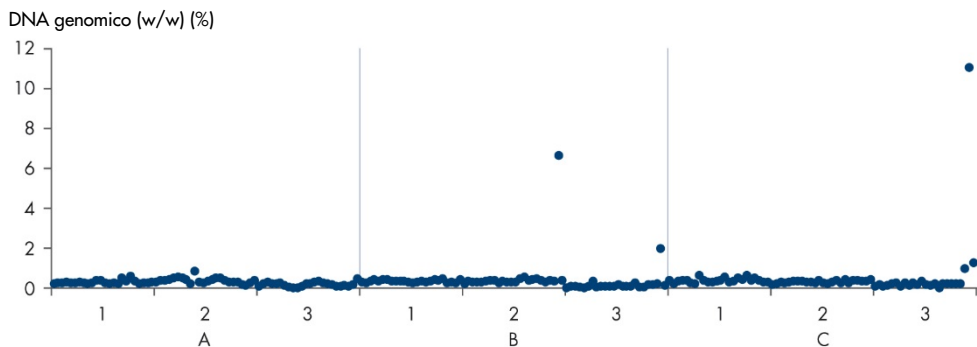
**Figura 11. Resa dell'RNA — Procedura in automatico.** Campioni di sangue di 36 differenti donatori sono stati raccolti nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 6 provette per donatore, 216 provette in totale). Il contenuto dei campioni da 6 donatori è stato messo in pool e rialiquotato in 36 campioni. Questi 36 campioni per ogni pool di 6 donatori sono stati processati da 3 diversi operatori (A, B, C). Ogni operatore ha usato 3 differenti lotti (1, 2, 3) del PAXgene Blood RNA Kit per l'estrazione in automatico e ha processato campioni quadruplicati da ognuno degli 6 pool di donatori. Le rese dell'RNA per tutti i singoli campioni sono mostrati per ogni combinazione operatore-lotto.

Purezza dell'RNA ( $A_{260}/A_{280}$ )



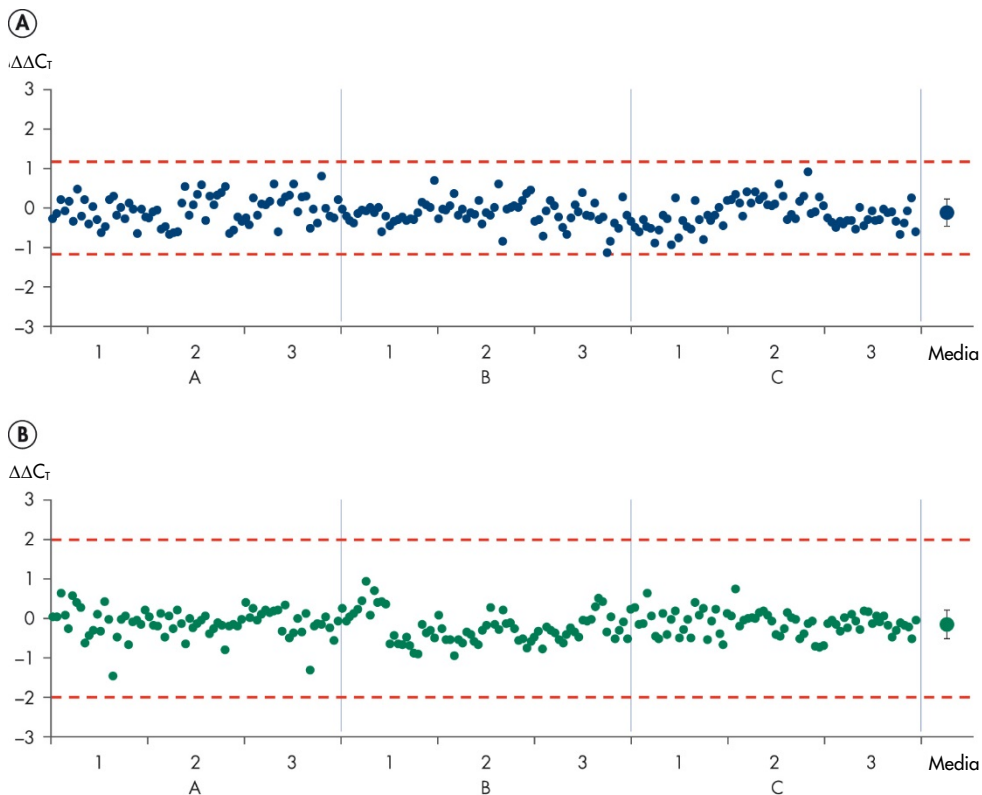
**Figura 12. Purezza dell'RNA (valori  $A_{260}/A_{280}$ ) — Procedura in automatico.** L'RNA è stato purificato da 3 differenti operatori (A, B, C) usando 3 differenti lotti (1, 2, 3) del PAXgene Blood RNA Kit nell'esperimento descritto in Figura 11. I valori  $A_{260}/A_{280}$  di tutti i singoli campioni sono mostrati per ogni combinazione operatore-lotto.





**Figura 13. Purezza dell'RNA (% della contaminazione del DNA genomico) — Procedura in automatico.** L'RNA è stato purificato da 3 differenti operatori (A, B, C) usando 3 differenti lotti (1, 2, 3) del PAXgene Blood RNA Kit nell'esperimento descritto in Figura 11. Le quantità di DNA genomico (w/w) in tutti i singoli campioni sono mostrate per ogni combinazione operatore-lotto.

Il protocollo in automatico di purificazione dell'RNA mediante PAXgene Blood RNA System fornisce risultati altamente riproducibili e ripetibili per la RT-PCR, come mostrato nella Figura 14 (pag. 34), dimostrandosi quindi l'ideale per i test di diagnostica clinica.



**Figura 14. Riproducibilità della RT-PCR — tra protocolli in automatico e manuali.** L'RNA è stato purificato da 3 diversi operatori (A, B, C) usando 3 diversi lotti (1, 2, 3) del PAXgene Blood RNA Kit e il protocollo in automatico nell'esperimento descritto in Figura 11. In parallelo, l'RNA è stato purificato dalle corrispondenti provette in duplicati usando il protocollo manuale. I livelli relativi dei trascritti di **[A]** FOS e **[B]** IL1B sono stati determinati per RT-PCR duplex in tempo reale utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Possibili differenze dei livelli dei trascritti tra RNA preparato da campioni di sangue in coppia usando entrambi i protocolli di estrazione (in automatico e manuale) sono state calcolate dal metodo  $\Delta\Delta C_T$ . Singoli valori  $\Delta\Delta C_T$  per tutte le coppie di campioni (4 replicati per 6 pool di donatori per 3 kit di lotti per 3 operatori = 216 coppie per ogni gene) sono rappresentati come singoli punti con medie (punti più grandi) e deviazioni standard (barre nere) per tutti campioni mostrati. Le linee tratteggiate indicano la precisione totale  $\pm 3x$  dei dosaggi (FOS: 1,16  $C_T$ ; IL1B: 1,98  $C_T$ ; precisioni di dosaggio diverse rispetto alle Figure 1–4, 8 e 9 a causa delle versioni di dosaggio differenti).

# Strumenti e reagenti non forniti

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede dei dati di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

## Per tutti i protocolli

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; cat. no. 762165)
- Etanolo (96–100%, grado di purezza p.a.)
- Pipette\* (10 µl – 4 ml)
- Puntali sterili privi di RNasi con barriere aerosol anticontaminazione<sup>†</sup>
- Cilindro graduato<sup>‡</sup>
- Centrifuga\* in grado di raggiungere 3.000–5.000 x g, con rotore basculante e alloggiamenti per le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Miscelatore vortex mixer\*
- Ghiaccio tritato
- Pennarello indelebile per scrivere sulle etichette

## Per il protocollo manuale

- Microcentrifuga\* a velocità variabile capace di raggiungere almeno 1000–8000 x g, sebbene sia possibile applicare forze g inferiori e superiori (per informazioni dettagliate, vedere i passaggi del protocollo), dotata di rotore per provette per microcentrifuga da 2 ml
- Incubatore–agitatore\* in grado di incubare a 55°C e 65°C e di miscelare a ≥400 rpm; max. 1.400 rpm (ad es. Eppendorf® Thermomixer Compact o equivalente)

\* Assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati periodicamente secondo le raccomandazioni del produttore.

<sup>†</sup> Assicurarsi di avere familiarità con le linee guida per il trattamento dell'RNA (Appendice A, pag. 64).

<sup>‡</sup> Per l'aggiunta di etanolo al tampone BR4 concentrato.

## Per il protocollo in automatico

- QIAcube\* (QIAGEN, cat. n. 9001882 [110 V], cat. n. 9001293 [230 V])
- Forbici

### Materiali di consumo per QIAcube

- Filter-Tips, 1000 µl (1024) (QIAGEN, cat. no. 990352)<sup>†</sup>
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, cat. no. 990393)<sup>†</sup>
- Rotor Adapters (10 x 24) (QIAGEN, cat. no. 990394)<sup>†</sup>

### Accessori QIAcube

- Reagent Bottle Rack (QIAGEN, cat. no. 990390)<sup>†</sup>
- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, cat. no. 990392)<sup>†</sup>

---

\* Assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati periodicamente secondo le raccomandazioni del produttore.

<sup>†</sup> È incluso anche Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, cat. no. 990395)

# Note importanti

## Uso del QIAcube

Assicurarsi di avere familiarità con il QIAcube. Prima di iniziare i protocolli PAXgene Blood RNA, leggere il manuale utente QIAcube e ogni informazione ulteriore fornita con il QIAcube, ponendo particolare attenzione alle informazioni di sicurezza.

## Avviamento del QIAcube

Chiudere la porta del QIAcube e accendere il QIAcube con il tasto di accensione. (vedere Figura 15, pag. 38).

Si sentirà un beep e apparirà la schermata di avvio. Lo strumento eseguirà automaticamente i test di inizializzazione.

## Installazione dei protocolli sul QIAcube

È richiesta l'installazione iniziale di un protocollo prima che venga eseguito il primo processo di preparazione dell'RNA sul QIAcube. Installare sia il protocollo "PAXgene Blood RNA Part A" che il protocollo "PAXgene Blood RNA Part B".

I protocolli vengono forniti su **[www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube)** e devono essere scaricati sulla penna USB fornita con il QIAcube e trasferiti al QIAcube tramite la porta USB.

La porta USB, posta dietro il pannello di protezione (vedere Figura 15, pag. 38), permette la connessione del QIAcube alla penna USB (fornita con il QIAcube). I file di dati, come i file di log e di report, possono essere anche trasferiti tramite la porta USB dal QIAcube alla penna USB.



La porta USB è da utilizzarsi esclusivamente con la penna USB fornita da QIAGEN. Non connettere altri dispositivi a questa porta.



Non rimuovere la penna USB mentre si scaricano protocolli o mentre si trasferiscono file di dati o durante l'esecuzione di un protocollo.



**Figura 15. Parte anteriore del QIAcube.**

- |   |  |
|---|--|
| ① Touch screen  | ④ Porta USB dietro il pannello di protezione |
| ② Sportello   | ⑤ Interruttore di alimentazione              |
| ③ Porta seriale RS232 dietro il pannello protettivo<br>(solo per l'uso da parte di specialisti del centro di assistenza tecnica QIAGEN) | ⑥ Cassetto materiali di scarto               |

## Caricamento del QIAcube

Per guadagnare tempo si può caricare durante uno o entrambe le successive fasi di centrifugazione da 10 minuti (fasi 3 e 5) in "Protocollo: purificazione in automatico

dell'RNA totale da sangue umano intero raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)", pag. 55.

## Flaconi per reagenti

Prima di ogni processo sul QIAcube, riempire con precauzione i 4 flaconi per reagenti elencati nella Tabella 3 fino al livello indicatore massimo oppure, qualora ciò non sia possibile, fino al livello consentito dai volumi dei tamponi forniti nel PAXgene Blood RNA Kit. Etichettare i flaconi e i tappi chiaramente con i nomi del tampone e collocarli nella posizione appropriata nel rack apposito. Caricare il rack sul piano di lavoro del QIAcube come mostrato (Figure 16 e 17, pagg. 40 e 41).



Il volume fornito del tampone BR2 non riempirà un flacone per reagenti fino al livello indicatore. I tamponi BR3 e BR4 non possono riempire il flacone fino al livello indicatore dopo il trattamento di campioni multipli in processi precedenti.



Assicurarsi di rimuovere i tappi dai flaconi prima di porli sul piano di lavoro.

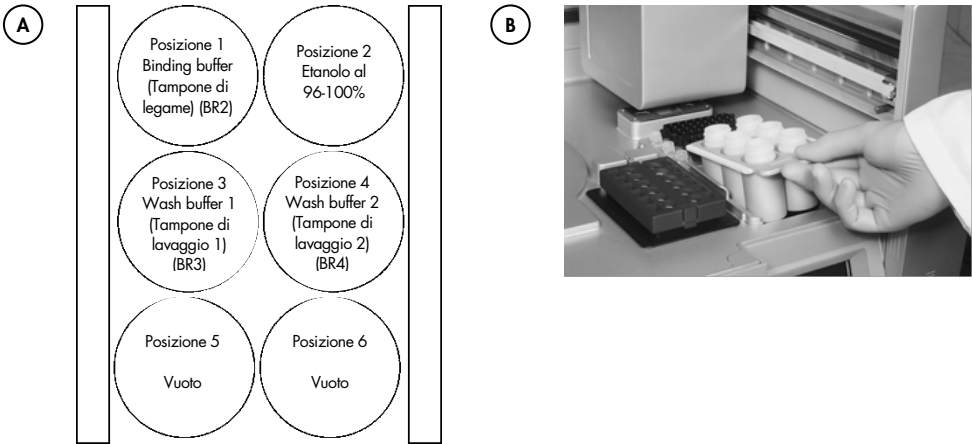


I volumi di tampone forniti nel PAXgene Blood RNA Kit (50) sono sufficienti per un massimo di 7 processi di preparazione dell'RNA sul QIAcube, con un numero di campioni per processo da 2 a 12. In generale, è necessario evitare i processi con numeri di campioni inferiori per trattare un totale di 50 campioni per kit con un massimo di 7 processi di preparazione dell'RNA. Un numero di processi di preparazione dell'RNA superiore a 7 può portare a volumi di tampone insufficienti per il trattamento degli ultimi campioni.

**Tabella 3. Posizioni nel rack per flaconi reagenti**

Posizione	Reagente
1	Binding buffer (Tampone di legame) (BR2)
2	Etanolo al 96-100%
3	Wash buffer 1 (Tampone di lavaggio 1) (BR3)
4	Wash buffer 2 (Tampone di lavaggio 2) (BR4) *
5	– (lasciare vuoto)
6	– (lasciare vuoto)

\* Il tampone di lavaggio 2 (BR4) viene fornito come concentrato. Per ottenere una soluzione di lavoro, al primo utilizzo aggiungere 4 volumi di etanolo (96-100%, grado di purezza p. a. – per analisi), come indicato sul flacone.



**Figura 16. Caricamento del rack per flaconi per reagenti. [A]** Schema delle posizioni e dei contenuti dei flaconi nel rack per flaconi per reagenti. **[B]** Caricamento del rack sul QIAcube.





**Figura 17. Interno del QIAcube.**

- |                                 |  |
|---------------------------------|--|
| ① Coperchio centrifuga          | ⑥ Slot delle provette per microcentrifuga      |
| ② Centrifuga                    | ⑦ Rack per puntali                             |
| ③ Agitatore                     | ⑧ Slot per lo smaltimento di puntali e colonne |
| ④ Rack per flaconi per reagenti | ⑨ Braccio robotico                             |
| ⑤ Sensore per puntali           |  |

Colonnine (PRC, PSC), provette per microcentrifuga (MCT) e materiale in plastica del QIAcube

Posizionare 2 rack per puntali con Filter-Tips 1000 µl sul QIAcube (vedere Figura 17, pag. 41). Caricare i rack con altri puntali quando necessario.



Usare solo puntali per filtro da 1.000 µl destinati all'uso con il QIAcube.

Con un pennarello indelebile etichettare gli adattatori per il rotore e le provette per microcentrifuga (MCT) per ogni campione. Aprire le colonnine PAXgene Shredder (PSC) da usare e tagliare completamente i tappi con le forbici (vedere la Figura 18, pag. 43).

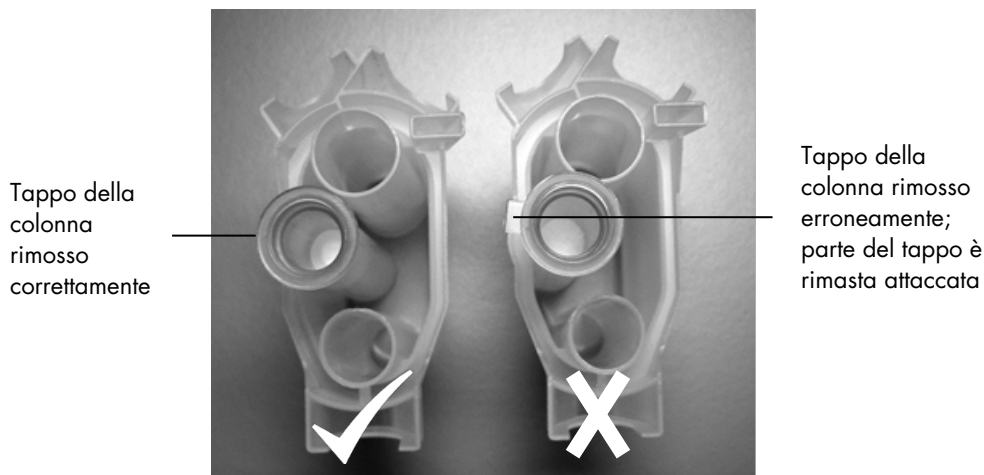


Per un corretto funzionamento della pinza robotica del QIAcube, rimuovere completamente (tagliare) i tappi e tutte le parti di plastica che uniscono il tappo alle colonnine PAXgene Shredder (PSC; vedere Figura 16). Diversamente la pinza robotica non può afferrare correttamente le colonnine (PSC, PRC).

Caricare la colonnina PAXgene RNA (PRC), la colonnina PAXgene Shredder (PSC, senza tappo) e la provetta per microcentrifuga (MCT) provvista di etichetta nelle posizioni relative in ciascun adattatore per rotore etichettato, come riportato nella Tabella 4 e nella Figura 19 (pag. 43).



Assicurarsi che i tappi della colonnina (PRC) e della provetta per microcentrifuga (MCT) siano spinti completamente sul fondo degli slot al margine dell'adattatore del rotore, altrimenti i tappi potrebbero rompersi durante la centrifugazione.

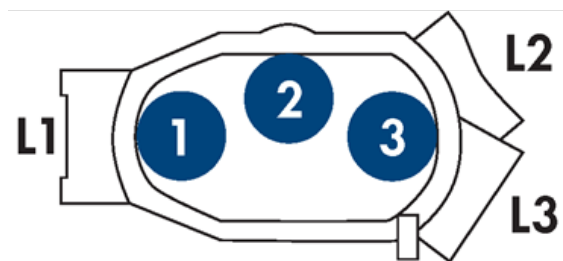


**Figura 18. Caricamento di una colonnina PAXgene Shredder (PSC).** La colonnina PAXgene Shredder (PSC) è caricata nella posizione centrale dell'adattatore per rotore. Tagliare il tappo prima di caricare la colonna (PSC).

**Tabella 4. Strumenti nell'adattatore per rotore**

Posizione	Reagente	Posizione tappo
1	Colonnina PAXgene RNA (rossa, PRC)	L1
2	Colonnina PAXgene Shredder (lilla, PSC) (tagliare il tappo prima di posizionare nell'adattatore per rotore)	–
3	Provetta per microcentrifuga (MCT)*	L3

\* Usare le provette per microcentrifuga (1,5 ml) incluse nel PAXgene Blood RNA Kit.



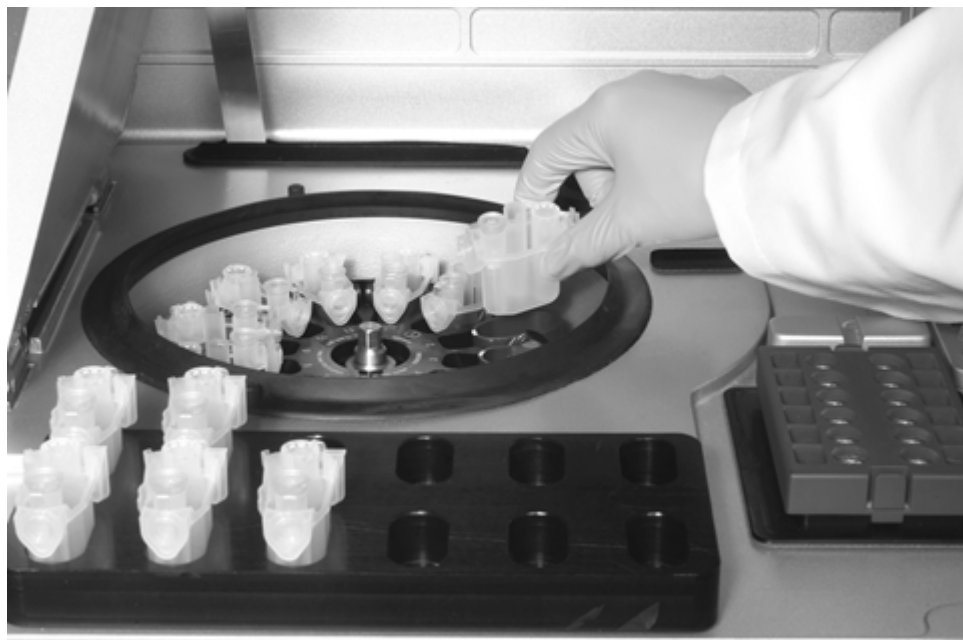
**Figura 19. Posizioni nell'adattatore per rotore.** L'adattatore per rotore ha tre posizioni per provette (1–3) e tre posizioni per tappi (L1–L3).

## Caricamento della centrifuga

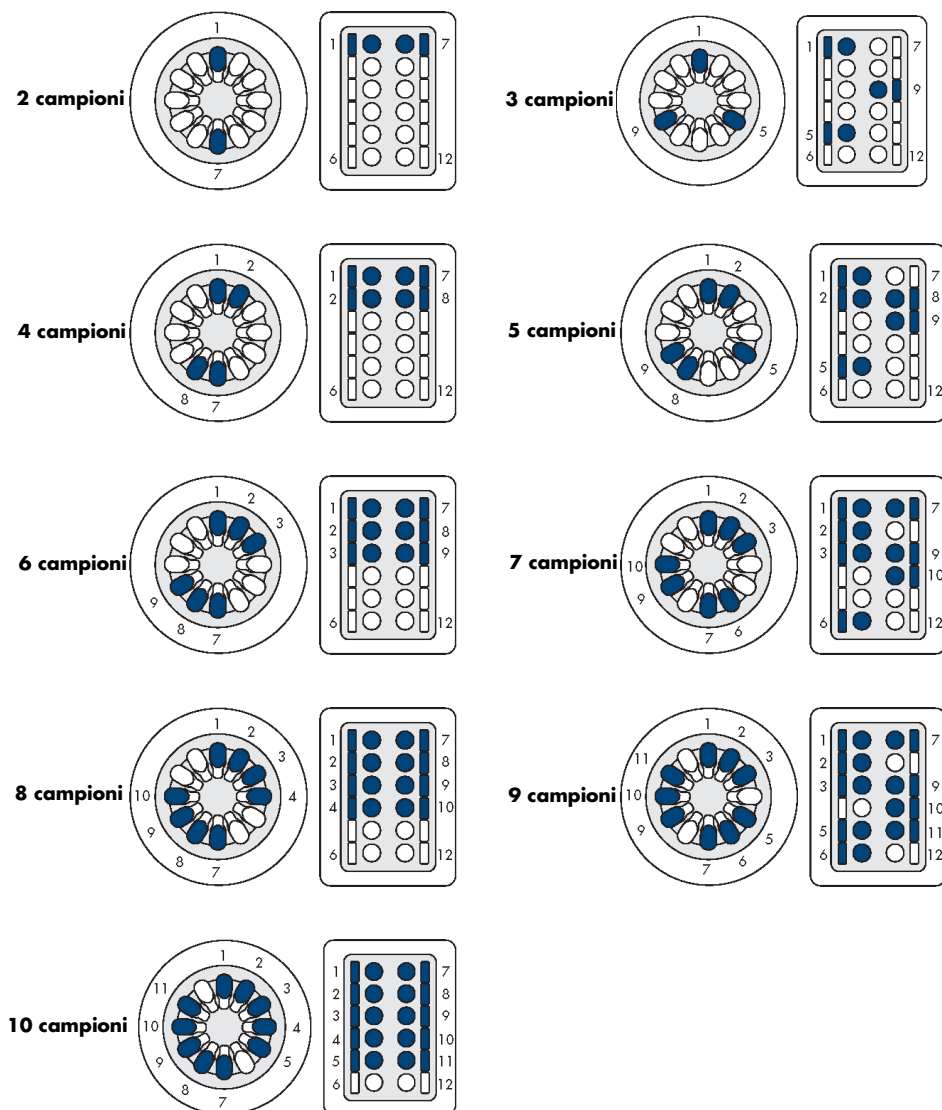
Caricare gli adattatori per rotore negli scomparti della centrifuga come illustrato nella Figura 20 di seguito.



Se si processano meno di 12 campioni, assicurarsi di caricare il rotore della centrifuga bilanciato radialmente (vedere Figura 21, pag. 45). Tutti gli scomparti della centrifuga devono essere montati prima di far partire un protocollo, anche se i campioni da processare sono meno di 12. Un singolo (uno) campione o 11 campioni non possono essere processati.



**Figura 20. Caricamento della centrifuga.** Caricare gli adattatori per rotore assemblati negli scomparti della centrifuga.




**Figura 21. Caricamento della centrifuga e dell'agitatore.** Vengono mostrate le posizioni di centrifuga e agitatore per il trattamento di un numero di campioni compreso tra due (2 campioni) e dieci (10 campioni). Uno o 11 campioni non possono essere processati.


### Provette di reazione (PT)

Eliminare tutte le provette di reazione (PT) lasciate negli slot per provette da microcentrifuga e provenienti dai processi precedenti (vedere Figura 17, pag. 41). Riempire 3 provette di reazione (PT) con la quantità di reagenti data nella Tabella 5, in base al numero di campioni nel processo.

Per la miscela per incubazione DNasi I, pipettare il volume indicato di tampone di digestione DNA (RDD) in una provetta di reazione (PT) e aggiungere il volume indicato di soluzione concentrata di DNasi I (RNFD). Miscelare delicatamente il tutto pipettando su e giù 3 volte, usando un puntale per pipetta da 1.000 µl.

Usare le provette di reazione (PT) da 2 ml incluse nel PAXgene Blood RNA Kit. Etichettare chiaramente le provette (PT) con i nomi dei reagenti e collocarle nella posizione appropriata negli slot per provette da microcentrifuga, come indicato nella Tabella 6 (pag. 47).

- 

La DNasi I (RNFD) è particolarmente sensibile alla denaturazione fisica. Miscelare soltanto pipettando, utilizzando puntali per pipette wide-bore per ridurre la frammentazione. Non utilizzare il vortex.
- 

Assicurarsi di pipettare solo il volume richiesto come indicato nella Tabella 5.

Tabella 5. Volume dei reagenti richiesto nelle provette di reazione per gli slot delle provette da microcentrifuga

Numero dei campioni	Volume di reagente per il numero di campioni indicato (µl)		
	Proteinasi K (PK)	Miscela per incubazione di DNasi I	Tampone di eluizione (BR5)
2	126	187 (23 DNasi I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNasi I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNasi I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNasi I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNasi I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNasi I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNasi I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNasi I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNasi I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNasi I + 806 Buffer RDD)	1177

**Tabella 6. Slot delle provette per microcentrifuga**

		Posizione		
		A	B	C
<b>Contenuto</b>	Proteinasi K (PK)	Miscela per incubazione di DNasi I/Tampone di eluizione (BR5)		
<b>Recipiente</b>	Provetta di reazione (PT)*	Provetta di reazione (PT)*	Provetta di reazione (PT)*	

\* Usare le provette di reazione (PT) da 2 ml incluse nel PAXgene Blood RNA Kit.

# Protocollo: Purificazione manuale dell'RNA totale da sangue umano intero raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

## Accorgimenti importanti prima di iniziare

- Assicurarsi che la confezione del kit sia intatta e non danneggiata e che la provette dei tamponi non mostrino perdite. Non utilizzare un kit danneggiato.
- Quando si utilizza una pipetta, assicurarsi che sia impostata sul volume corretto e che il liquido venga aspirato e dispensato completamente.
- Per evitare di trasferire un campione alla provetta o alla colonna sbagliata, assicurarsi che tutte le provette e le colonne siano etichettate in modo appropriato con un pennarello indelebile. Applicare un'etichetta al tappo e alla parete esterna (PT, MCT). Per le colonnine applicare un'etichetta alla parete esterna della rispettiva provetta di reazione (PT). Dopo avervi trasferito il liquido chiudere sempre ogni provetta e ogni colonna.
- Versamenti di campioni e tamponi durante la procedura possono ridurre resa e purezza dell'RNA.
- Se non indicato diversamente, tutte le fasi di questo protocollo, incluse quelle di centrifugazione, devono essere effettuate a temperatura ambiente (15–25°C).

A causa della sensibilità delle tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici, durante la manipolazione dei campioni è necessario attenersi alle seguenti precauzioni per evitare contaminazioni crociata:

- Pipettare con attenzione il campione nella colonna (PRC, PSC) senza bagnarne il bordo.
- Fra un trasferimento di liquido e l'altro, sostituire sempre i puntali delle pipette. Utilizzare puntali con barriera aerosol anticontaminazione.
- Non toccare la membrana della colonna (PRC, PSC) con il puntale della pipetta.



- Dopo la miscelazione con vortex o il riscaldamento di una provetta (MCT), centrifugare brevemente per rimuovere le gocce all'interno del tappo della provetta.
- Indossare i guanti per l'intera procedura. In caso di contatto fra guanti e campione, sostituire immediatamente i guanti.
- Chiudere sempre la colonna (PRC, PSC) prima di posizionarla nella microcentrifuga. Centrifugare come descritto nel protocollo.
- Aprire una colonnina (PRC, PSC) per volta, facendo attenzione a non creare aerosol.
- Per un trattamento in parallelo efficiente di campioni multipli, preparare un rack con provette di reazione (PT) in cui trasferire le colonnine (PRC, PSC) dopo la centrifugazione. Smaltire le provette di reazione (PT) usate che contengono il liquido eluito e disporre le nuove provette di reazione (PT) con le colonnine (PRC, PSC) direttamente nella microcentrifuga.

#### Ulteriori accorgimenti prima di iniziare

- Il sangue deve essere raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) secondo le istruzioni riportate nella relativa descrizione nel manuale PAXgene Blood RNA Tube. Se necessario, per consigli sull'uso delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) consultare l'Appendice C (pag. 68).
- Assicurarsi che le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) vengano incubate per almeno 2 ore a temperatura ambiente dopo il prelievo di sangue, per garantire la completa lisi delle cellule ematiche. L'incubazione delle PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per tutta la notte può aumentare la resa. Se una delle PAXgene Blood RNA Tube (BRT) è stata conservata a 2–8°C o –20°C o –70°C dopo il prelievo del sangue, innanzitutto equilibrarla a temperatura ambiente e incubarla sempre a temperatura ambiente per almeno 2 ore prima di iniziare la procedura.
- Leggere le informazioni di sicurezza a pag. 9.
- Leggere le linee guida sulla manipolazione dell'RNA (Appendice A, pag. 65).
- Assicurarsi che gli strumenti, ad esempio, pipette e incubatore–agitatore, vengano controllati e calibrati regolarmente in base alle indicazioni del produttore.

- Per le fasi 5 e 20 è necessario un incubatore–agitatore. Impostare la temperatura di questo strumento a 55°C.
- Dopo una lunga conservazione il tampone di legame (BR2) può formare un precipitato. Se necessario, riscaldare a 37°C per discioglierlo.
- Il tampone di lavaggio 2 (BR4) viene fornito come concentrato. Per ottenere una soluzione di lavoro, al primo utilizzo aggiungere 4 volumi di etanolo (96-100%, grado di purezza p. a. – per analisi), come indicato sul flacone.
- Se si usa per la prima volta l'RNase-Free DNase Set, preparare una soluzione concentrata di DNasi I. Sciogliere la DNasi I (RNFD; 1.500 unità Kunitz)\* in 550 µl di tampone di risospensione DNasi (DRB) presente nel set. Assicurarsi di non disperdere la DNasi I (RNFD) aprendo la fiala. La DNasi I (RNFD) ricostituita non deve essere miscelata su vortex. La DNasi è particolarmente sensibile alla denaturazione fisica. Miscelare la soluzione con cautela capovolgendo la provetta.
- Dati attualmente disponibili mostrano che la DNasi I ricostituita (RNFD) si mantiene stabile per un massimo di 6 settimane se conservata a 2-8°C. Per periodi di conservazione più lunghi, rimuovere la soluzione concentrata dalla fiala in vetro, suddividerla in aliquote monouso (utilizzare provette per microcentrifuga da 1,5 ml [MCT] presenti nel kit; sono sufficienti per 5 aliquote) e conservarla a -20°C fino a 9 mesi. Le aliquote scongelate possono essere conservate a 2-8°C fino a 6 settimane. Non ricongelare le aliquote dopo lo scongelamento.
- Quando si ricostituisce e si aliquota la DNasi I (RNFD), attenersi alle “Note generali per il trattamento dell’RNA” (Appendice A, pag. 65).

\* L'unità Kunitz viene normalmente utilizzata per misurare la DNasi I. Un'unità Kunitz si definisce come la quantità di DNasi I che provoca in A<sub>260</sub> un aumento dell'assorbanza di 0,001 per minuto e millilitro a 25°C e pH 5,0, utilizzando come substrato DNA altamente polimerizzato (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 e 363).

## Procedura

1. Centrifugare la PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per 10 minuti a 3.000–5.000 x g utilizzando un rotore basculante.



Assicurarsi che il campione di sangue sia stato incubato nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per almeno 2 ore a temperatura ambiente (15–25°C) per garantire la completa lisi delle cellule ematiche.



Il rotore deve contenere adattatori per provette a fondo arrotondato. Se si utilizzano altri tipi di adattatori le provette possono danneggiarsi durante la centrifugazione.

2. Rimuovere il sovranatante per decantazione o pipettamento. Aggiungere al pellet 4 ml di acqua priva di RNasi (RNFW) e chiudere la provetta con una nuova chiusura secondaria BD Hemogard (fornita con il kit).

Se il sovranatante viene eliminato per decantazione attenzione a non staccare il pellet e asciugare il bordo della provetta con carta assorbente pulita.

3. Miscelare con il vortex finché il pellet non si scioglie e centrifugare per 10 minuti a 3.000–5.000 x g utilizzando un rotore basculante. Rimuovere ed eliminare tutto il sovranatante.

Eventuali detriti cellulari che rimangono nel sovranatante dopo la miscelazione con vortex non influenzano la procedura.



La rimozione incompleta del sovranatante inibisce la lisi e diluisce il lisato, compromettendo le condizioni di legame dell'RNA alla membrana PAXgene.

4. Aggiungere 350 µl di tampone di risospensione (BR1) e miscelare su vortex fino alla completa dissoluzione del pellet.
5. Pipettare il campione in una provetta (MCT) da 1,5 ml. Aggiungere 300 µl di tampone di legame (BR2) e 40 µl di proteinasi K (PK). Miscelare su vortex per 5 secondi e incubare a 55°C per 10 minuti utilizzando un incubatore–agitatore a 400–1.400 rpm. Dopo l'incubazione, impostare la temperatura dell'incubatore–agitatore a 65°C (per la fase 20).



Non mescolare il tampone di legame (BR2) e la proteinasi K (PK) prima di aggiungerli al campione.

6. Pipettare il lisato direttamente nella colonnina PAXgene Shredder (PSC, lilla) posta in una provetta di reazione da 2 ml (PT) e centrifugare per 3 minuti alla velocità massima (non superiore a 20.000 x g).



Pipettare con attenzione il lisato nella colonna (PSC) e controllare che il lisato sia trasferito completamente alla colonnina (PSC).

Per evitare danni a colonne (PSC) e provette di reazione (PT), non superare 20.000 x g.



Alcuni campioni possono uscire dalla colonnina PAXgene Shredder (PSC) senza centrifugazione. Questo è dovuto alla bassa viscosità di alcuni campioni e non dovrebbe essere considerato un difetto del prodotto.

7. Con la massima cura, trasferire tutto il sovranatante della frazione eluita in una provetta per microcentrifuga pulita da 1,5 ml (MCT) senza interferire con il pellet nella provetta di reazione.
8. Aggiungere 350 µl di etanolo (96–100%, grado di purezza p.a.). Miscelare su vortex e centrifugare brevemente (1– 2 secondi a 500–1.000 x g) per rimuovere le gocce all'interno del tappo della provetta.



La durata della centrifugazione non deve superare 1-2 secondi; in caso contrario gli acidi nucleici possono precipitare riducendo la resa dell'RNA totale.

9. Pipettare 700 µl di campione nella colonnina PAXgene RNA (PRC; rossa) posta in una provetta di reazione (PT) da 2 ml e centrifugare per 1 minuto 8000–20.000 x g. Collocare la colonnina (PRC) in una nuova provetta di reazione (PT) da 2 ml e smaltire la vecchia provetta (PT) contenente il flow-through.
10. Pipettare il rimanente campione nella colonnina PAXgene RNA (PRC) e centrifugare per 1 minuto a 8000–20.000 x g. Collocare la colonnina (PRC) in una nuova provetta di reazione (PT) da 2 ml e smaltire la vecchia provetta (PT) contenente il flow-through.



Pipettare con attenzione il campione nella colonnina (PRC) e controllare visivamente che esso sia completamente trasferito nella colonnina (PRC).

11. Pipettare 350 µl di tampone di lavaggio 1 (BR3) nella colonnina PAXgene RNA (PRC). Centrifugare per 1 minuto a 8000–20.000 x g. Collocare la colonnina (PRC) in una nuova provetta di reazione (PT) da 2 ml e smaltire la vecchia provetta (PT) contenente il flow-through.

12. Aggiungere 10 µl di soluzione concentrata di DNasi I (RNFD) a 70 µl di tampone di digestione DNA (RDD) in una provetta per microcentrifuga da 1,5 ml (MCT). Miscelare dando leggeri colpetti con le dita alla provetta e centrifugare brevemente per raccogliere il liquido residuo dalle pareti interne della provetta.

Se si opera, ad esempio, su 10 campioni, aggiungere 100 µl di soluzione concentrata di DNasi I (RNFD) a 700 µl di tampone di digestione DNA (RDD). Utilizzare le provette da 1,5 ml (MCT) in dotazione con il kit.



La DNasi è particolarmente sensibile alla denaturazione fisica. Per questo motivo miscelare la soluzione solo dando leggeri colpetti con le dita alla provetta. Non utilizzare il vortex.

13. Pipettare la miscela di incubazione DNasi I (RNFD) (80 µl) direttamente sulla membrana della colonnina PAXgene RNA (PRC) e lasciare sul piano di lavoro (20–30°C) per 15 minuti.



Assicurarsi di pipettare la miscela di incubazione di DNasi I (RNFD) direttamente sulla membrana. Se parte della miscela rimane sulle pareti o sull'O-ring della colonna (PRC), la digestione della DNasi può risultare incompleta.

14. Pipettare 350 µl di tampone di lavaggio 1 (BR3) nella colonnina PAXgene RNA (PRC) e centrifugare per 1 minuto a 8.000–20.000 x g. Collocare la colonnina (PRC) in una nuova provetta di reazione (PT) da 2 ml e smaltire la vecchia provetta (PT) contenente il flow-through.

15. Pipettare 500 µl di tampone di lavaggio 2 (BR4) nella colonnina PAXgene RNA (PRC) e centrifugare per 1 minuto a 8.000–20.000 x g. Collocare la colonnina (PRC) in una nuova provetta di reazione (PT) da 2 ml e smaltire la vecchia provetta contenente il flow-through.



Il tampone di lavaggio 2 (BR4) viene fornito come concentrato. Assicurarsi di avere aggiunto etanolo al tampone di lavaggio 2 (BR4) prima dell'uso (vedere "Accorgimenti importanti prima di iniziare la preparazione", pag. 49).

16. Pipettare altri 500 µl di tampone di lavaggio 2 (BR4) nella colonnina PAXgene RNA (PRC). Centrifugare per 3 minuti a 8.000–20.000 x g.

17. Smaltire la provetta di reazione (PT) contenente il flow-through e disporre la colonnina PAXgene RNA (PRC) in una nuova provetta di reazione (PT) da 2 ml. Centrifugare per 1 minuto a 8.000–20.000 x g.

18. Smaltire la provetta di reazione (PT) contenente il flow-through. Collocare la colonnina PAXgene RNA (PRC) in una provetta per microcentrifuga (MCT) da 1,5 ml e pipettare 40 µl di tampone di eluizione (BR5) direttamente sulla membrana della colonnina PAXgene RNA (PRC). Centrifugare per 1 minuto a 8.000–20.000 x g per eluire l'RNA.

Per la massima efficienza di eluizione è importante bagnare l'intera membrana con il tampone di eluizione (BR5).

19. Ripetere la fase di eluizione (fase 18) come descritto, utilizzando 40 µl di tampone di eluizione (BR5) e la stessa provetta (MCT).

20. Incubare l'eluato per 5 minuti a 65°C nell'incubatore-agitatore (vedere fase 5), senza agitare. Dopo l'incubazione raffreddare immediatamente in ghiaccio.

Questa incubazione a 65°C denatura l'RNA per applicazioni downstream. Non superare tempo e temperatura di incubazione.

21. Se i campioni di RNA non vengono utilizzati subito, conservare a –20°C o –70°C.

Poiché l'RNA rimane denaturato dopo ripetuti passaggi di congelamento/scongelamento, non è necessario ripetere l'incubazione a 65°C. Se si utilizzano i campioni di RNA per test diagnostici, attenersi alle istruzioni fornite dal produttore.

Per una quantificazione dell'RNA più precisa e attendibile, misurando l'assorbanza a 260 nm, consigliamo di diluire i campioni con 10 mM di Tris-HCl, pH 7,5. \* Una diluizione del campione con acqua priva di RNasi potrebbe portare a risultati imprecisi o troppo bassi.

Per azzerare lo spettrofotometro, utilizzare un bianco contenente la stessa proporzione di tampone di eluizione (BR5) e tampone Tris-HCl presenti nel campione da misurare. Il tampone di eluizione (BR5) assorbe intensamente a 220 nm, e questo può portare ad alti valori di assorbanza di sfondo, se lo spettrofotometro non è stato azzerato correttamente.

**Nota:** per la quantificazione in tampone Tris-HCl, usare la relazione

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$ . Vedere Appendice B, pag. 66.

\* Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede dei dati di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

# Protocollo: purificazione in automatico dell'RNA totale da sangue umano intero raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

## Accorgimenti importanti prima di iniziare

- Assicurarsi che la confezione del kit sia intatta e non danneggiata e che la provette dei tamponi non mostrino perdite. Non utilizzare un kit danneggiato.
- Quando si utilizza una pipetta, assicurarsi che sia impostata sul volume corretto e che il liquido venga aspirato e dispensato completamente.
- Per evitare di trasferire un campione alla provetta o al materiale di laboratorio in plastica sbagliato, assicurarsi che tutte le provette di reazione (PT), le provette per microcentrifuga (MCT) e gli adattatori per rotore siano etichettati in modo appropriato con un pennarello indelebile. Applicare un'etichetta al tappo, alla parete esterna di ogni provetta per microcentrifuga (MCT), di ogni provetta di reazione (PT) e di ogni adattatore per rotore.
- Versamenti di campioni e tamponi durante la procedura possono ridurre resa e purezza dell'RNA.
- Se non indicato diversamente, tutte le fasi di questo protocollo, incluse quelle di centrifugazione, devono essere effettuate a temperatura ambiente (15–25°C).

A causa della sensibilità delle tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici, durante la manipolazione dei campioni è necessario attenersi alle seguenti precauzioni per evitare contaminazioni crociata:

- Pipettare con attenzione il campione dentro la provetta di reazione (PT), sul fondo della provetta, senza bagnare il bordo.
- Fra un trasferimento di liquido e l'altro, sostituire sempre i puntali delle pipette. Utilizzare puntali con barriera aerosol anticontaminazione.

- Non toccare la membrana della colonna (PRC, PSC) con il puntale della pipetta.
- Dopo la miscelazione con vortex o il riscaldamento di una provetta (MCT), centrifugare brevemente per rimuovere le gocce all'interno del tappo della provetta.
- Indossare i guanti per l'intera procedura. In caso di contatto fra guanti e campione, sostituire immediatamente i guanti.

### Ulteriori accorgimenti prima di iniziare

- Il sangue deve essere raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) secondo le istruzioni riportate nella relativa descrizione nel manuale PAXgene Blood RNA Tube. Se necessario, per consigli sull'uso delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) consultare l'Appendice C (pag. 68).
- Assicurarsi che le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) vengano incubate per almeno 2 ore a temperatura ambiente dopo il prelievo di sangue, per garantire la completa lisi delle cellule ematiche. L'incubazione delle PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per tutta la notte può aumentare la resa. Se una delle PAXgene Blood RNA Tube (BRT) è stata conservata a 2–8°C o –20°C o –70°C dopo il prelievo del sangue, innanzitutto equilibrarla a temperatura ambiente e incubarla sempre a temperatura ambiente per almeno 2 ore prima di iniziare la procedura.
- Leggere le informazioni di sicurezza a pag. 9.
- Leggere "Note importanti", pag. 37.
- Leggere le linee guida sulla manipolazione dell'RNA (Appendice A, pag. 65).
- Leggere il manuale utente QIAcube e ogni ulteriore informazione fornita con il QIAcube, prestando particolare attenzione alle informazioni di sicurezza.
- Assicurarsi che gli strumenti come le pipette e il QIAcube siano stati controllati e calibrati regolarmente secondo le raccomandazioni del produttore.
- Dopo una lunga conservazione il tampone di legame (BR2) può formare un precipitato. Se necessario, riscaldare a 37°C per discioglierlo.



- Il tampone di lavaggio 2 (BR4) viene fornito come concentrato. Per ottenere una soluzione di lavoro, al primo utilizzo aggiungere 4 volumi di etanolo (96-100%, grado di purezza p. a. – per analisi), come indicato sul flacone.
- Se si usa per la prima volta l'RNase-Free DNase Set, preparare una soluzione concentrata di DNasi I. Sciogliere la DNasi I (RNFD; 1.500 unità Kunitz)\* in 550 µl di tampone di risospensione DNasi (DRB) presente nel set. Assicurarsi di non disperdere la DNasi I (RNFD) aprendo la fiala. La DNasi I (RNFD) ricostituita non deve essere miscelata su vortex. La DNasi è particolarmente sensibile alla denaturazione fisica. Miscelare la soluzione con cautela capovolgendo la provetta.
- Dati attualmente disponibili mostrano che la DNasi I ricostituita (RNFD) si mantiene stabile per un massimo di 6 settimane se conservata a 2-8°C. Per periodi di conservazione più lunghi, rimuovere la soluzione concentrata dalla fiala in vetro, suddividerla in aliquote monouso (utilizzare provette per microcentrifuga da 1,5 ml [MCT] presenti nel kit; sono sufficienti per 5 aliquote) e conservarla a -20°C fino a 9 mesi. Le aliquote scongelate possono essere conservate a 2-8°C fino a 6 settimane. Non ricongelare le aliquote dopo lo scongelamento.
- Quando si ricostituisce e si aliquota la DNasi I (RNFD), attenersi alle "Note generali per il trattamento dell'RNA" (Appendice A, pag. 65).
- Installare il corretto adattatore per agitatore (incluso nel QIAcube; usare l'adattatore per provette safe-lock da 2 ml, segnati con un "2") e porre il rack dell'agitatore sopra l'adattatore.
- Controllare il cassetto rifiuti e se necessario svuotarlo.
- Installare i protocolli se non lo si è già fatto per i processi precedenti. Installare sia il protocollo "PAXgene Blood RNA Part A" che il protocollo "PAXgene Blood RNA Part B". Vedere "Installazione dei protocolli sul QIAcube" pag. 37.

\* L'unità Kunitz viene normalmente utilizzata per misurare la DNasi I. Un'unità Kunitz si definisce come la quantità di DNasi I che provoca in  $A_{260}$  un aumento dell'assorbanza di 0,001 per minuto e millilitro a 25°C e pH 5,0, utilizzando come substrato DNA altamente polimerizzato (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 e 363).

## Procedura

1. Chiudere la porta del QIAcube e accendere il QIAcube con il tasto di accensione. (vedere Figura 15 pag. 38).

Si sentirà un beep e apparirà la schermata di avvio. Lo strumento eseguirà automaticamente i test di inizializzazione.

2. Aprire la porta del QIAcube e caricare i reagenti e il materiale in plastica necessari nel QIAcube. Vedere "Caricamento del QIAcube", pag. 38.

Per guadagnare tempo si può caricare durante uno o entrambe le successive fasi di centrifugazione da 10 minuti (fasi 3 e 5).

3. Centrifugare la PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per 10 minuti a 3.000–5.000 x g utilizzando un rotore basculante.



Assicurarsi che il campione di sangue sia stato incubato nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per almeno 2 ore a temperatura ambiente (15–25°C), per garantire la completa lisi delle cellule ematiche.



Il rotore deve contenere adattatori per provette a fondo arrotondato. Se si utilizzano altri tipi di adattatori le provette possono danneggiarsi durante la centrifugazione.

4. Rimuovere il sovranatante per decantazione o pipettamento. Aggiungere al pellet 4 ml di acqua priva di RNasi (RNFW) e chiudere la provetta con una nuova chiusura secondaria BD Hemogard (fornita con il kit).




Se il sovranatante viene eliminato per decantazione attenzione a non staccare il pellet e asciugare il bordo della provetta con carta assorbente pulita.

5. Miscelare con il vortex finché il pellet non si scioglie e centrifugare per 10 minuti a 3.000–5.000 x g utilizzando un rotore basculante. Rimuovere ed eliminare tutto il sovranatante.




Eventuali detriti cellulari che rimangono nel sovranatante dopo la miscelazione con vortex non influenzano la procedura.



La rimozione incompleta del sovranatante inibisce la lisi e diluisce il lisato, compromettendo le condizioni di legame dell'RNA alla membrana PAXgene.

6. Aggiungere 350 µl di tampone di risospensione (BR1) e miscelare su vortex fino alla completa dissoluzione del pellet.
7. Pipettare il campione in una provetta di reazione da 2 ml (PT).
  -  Usare le provette di reazione (PT) da 2 ml incluse nel PAXgene Blood RNA Kit.
8. Caricare le provette di reazione (PT) aperte contenenti il campione nell'agitatore QIAcube (vedere Figura 17, pag. 41). Le posizioni del campione sono numerate per agevolare il caricamento. Inserire gli innesti per i rack dell'agitatore (inclusi con il QIAcube) negli slot sul bordo di ogni rack dell'agitatore vicino a ogni provetta di reazione. Questo permette la rilevazione dei campioni durante il controllo del caricamento.
  -  Assicurarsi che sia installato il corretto adattatore per agitatore (adattatore agitatore, 2 ml, provette safe-lock, indicati con un "2", inclusi con il QIAcube).
  -  Se si processano meno di 12 campioni, assicurarsi di caricare il rack dell'agitatore come mostrato in Figura 21, pag. 45. Uno o 11 campioni non possono essere processati.
9. Chiudere la porta dello strumento QIAcube (vedere Figura 15, pag. 38).
10. Selezionare il protocollo "PAXgene Blood RNA Part A" e far partire il protocollo.

Seguire le istruzioni fornite sul touch screen del QIAcube.

  -  Assicurarsi che entrambe le parti del programma (parte A e B) siano installate sul QIAcube (vedere "Installazione dei protocolli sul QIAcube", pag. 37).
  -  Il QIAcube eseguirà i controlli del caricamento dei campioni, dei puntali, degli adattatori del rotore e dei flaconi per reagenti.
11. Al termine del protocollo "PAXgene Blood RNA Part A", aprire la porta dello strumento QIAcube (vedere Figura 15, pag. 38). Rimuovere e scartare le colonnine PAXgene RNA (PRC) dagli adattatori del rotore e le provette di reazione (PT) vuote dall'agitatore.
  -  Durante il processo le colonne vengono trasferite dalla posizione 1 (posizione tappo L1) alla posizione 3 dell'adattatore del rotore (posizione tappo L2) tramite lo strumento (vedere Figura 19, pag. 43).

12. Chiudere i tappi di tutte le provette per microcentrifuga (MCT) da 1,5 ml contenenti l'RNA purificato negli adattatori del rotore (posizione 3, posizione tappo L3, vedere Figura 19, pag. 43). Trasferire le provette per microcentrifuga (MCT) da 1,5 ml sull'adattatore dell'agitatore del QIAcube (vedere Figura 17, pag. 41).
13. Chiudere la porta dello strumento QIAcube (vedere Figura 15, pag. 38).
14. Selezionare il protocollo "PAXgene Blood RNA Part B" e far partire il protocollo.

Seguire le istruzioni fornite sul touch screen del QIAcube.



Questo programma incuba i campioni a 65°C e denatura l'RNA per applicazioni downstream dell'RNA. Se l'applicazione downstream comprende una fase di denaturazione a caldo non saltare questa fase. Una sufficiente denaturazione dell'RNA è essenziale per ottenere la massima efficacia nelle applicazioni downstream.

15. Al termine del programma "PAXgene Blood RNA Part B", aprire la porta dello strumento QIAcube (vedere Figura 15, pag. 38). Posizionare immediatamente le provette per microcentrifuga (MCT) contenenti l'RNA purificato sul ghiaccio.



**AVVERTENZA:** superficie rovente. L'agitatore può raggiungere temperature superiori a 70°C. Evitare di toccarlo quando è bollente.



Non lasciare l'RNA purificato nel QIAcube. Poiché i campioni non sono raffreddati, l'RNA purificato può essere degradato. Si sconsiglia per questo la preparazione dei campioni durante la notte senza opportuna sorveglianza.

16. Se i campioni di RNA non vengono utilizzati subito, conservare a -20°C o -70°C. Poiché l'RNA rimane denaturato dopo ripetuti congelamenti e scongelamenti, non è necessario ripetere il protocollo di incubazione a caldo ("PAXgene Blood RNA Part B"). Se si utilizzano i campioni di RNA per test diagnostici, attenersi alle istruzioni fornite dal produttore.

Per una quantificazione dell'RNA più precisa e attendibile misurando l'assorbanza a 260 nm, consigliamo di diluire i campioni in 10 mM di Tris-HCl, pH 7,5. \* Una diluizione del campione con acqua priva di RNasi potrebbe portare a risultati imprecisi o troppo bassi.

Per azzerare lo spettrofotometro, utilizzare un bianco contenente la stessa proporzione di tampone di eluizione (BR5) e tampone Tris-HCl presenti nel campione da misurare. Il tampone di eluizione (BR5) assorbe intensamente a 220 nm, e questo può portare ad alti valori di assorbanza di sfondo, se lo spettrofotometro non è stato azzerato correttamente.



Per la quantificazione in tampone Tris-HCl, usare la relazione

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ } \mu\text{g/ml}$ . Vedere Appendice B, pag. 66.

17. Rimuovere il rack per flaconi per reagenti dal piano di lavoro QIAcube (vedere Figura 17, pag. 41) e chiudere tutti i flaconi con i tappi opportunamente etichettati. La soluzione tampone in flaconi può essere conservata a temperatura ambiente (15-25°C) per un massimo di 3 mesi. Rimuovere e scartare i reagenti rimasti nelle provette di reazione (PT) negli slot per provette da microcentrifuga del QIAcube (vedere Figura 17, pag. 41). Rimuovere e scartare gli adattatori del rotore dalla centrifuga (vedere Figura 17, pag. 41). Svuotare il cassetto rifiuti del QIAcube (vedere Figura 15, pag. 38). Chiudere la porta del QIAcube e spegnere lo strumento con il tasto di accensione (vedere Figura 15, pag. 38).

\* Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede dei dati di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

# Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Gli esperti del servizio di assistenza tecnica di QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante informazioni e protocolli presentati in questo manuale o le tecnologie per campioni e dosaggi (per le informazioni sui contatti, vedere l'ultima pagina o visitare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Commenti e suggerimenti

---

### RNA degradato

Contaminazione RNasi



Prestare attenzione a non introdurre RNasi nei reagenti durante la procedura o la successiva manipolazione (vedere Appendice A, pag. 65).

### Bassa resa dell'RNA

a) Meno di 2,5 ml di sangue raccolti nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



Verificare che siano raccolti 2,5 ml di sangue nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT, vedere il manuale PAXgene Blood RNA Tube.

b) Concentrazione di RNA misurata in acqua



Per una quantificazione più precisa, l'RNA deve essere diluito in 10 mM di Tris-HCl, pH 7,5\* (vedere Appendice B, pag. 66).

c) Detriti cellulari trasferiti nella colonnina PAXgene RNA (PRC)



Evitare di trasferire particelle di grandi dimensioni mentre si pipetta il sovrantante nella fase 7 del protocollo manuale (il

\* Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede dei dati di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

## Commenti e suggerimenti

nella fasi 9 e 10 del protocollo manuale

trasferimento di detriti di piccole dimensioni non influenza la procedura).

- d) Sovranatante non eliminato completamente nel passaggio 3



Assicurarsi di rimuovere completamente il sovrnatante. Se il sovrnatante viene fatto decantare, rimuovere le gocce dal bordo del PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tamponando con carta assorbente. Prendere le necessarie precauzioni per evitare contaminazioni crociate.

- e) Dopo il prelievo il sangue è stato incubato meno di 2 ore nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



Dopo il prelievo incubare il sangue nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per almeno 2 ore.

Basso valore  $A_{260}/A_{280}$

- a) Acqua utilizzata per diluire l'RNA per misurazioni di  $A_{260}/A_{280}$



Utilizzare 10 mM di Tris-HCl pH 7,5 per diluire l'RNA prima di misurare la purezza\* (vedere Appendice B pag. 66).

\* 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.

## Commenti e suggerimenti

---

- b) Spettrofotometro non azzerato completamente



Per azzerare lo spettrofotometro, utilizzare un bianco contenente la stessa proporzione di tampone di eluizione (BR5) e 10 mM di Tris-HCl, pH 7,5, presenti nel campione da misurare. Il tampone di eluizione (BR5) assorbe intensamente a 220 nm, e questo può portare ad alti valori di assorbanza di sfondo, se lo spettrofotometro non è stato azzerato correttamente.

### Malfunzionamento dello strumento

QIAcube non utilizzato correttamente

Leggere il manuale utente QIAcube, prestando particolare attenzione alla sezione Risoluzione dei problemi. Assicurarsi che il QIAcube sia sottoposto a corretta manutenzione come descritto nel manuale utente QIAcube.



# Appendice A: Note generali per il trattamento dell'RNA

## Trattamento dell'RNA



Le ribonucleasi (RNasi) sono enzimi molto stabili e attivi che non necessitano normalmente di cofattori per espletare la loro funzione. Poiché le RNasi sono difficili da inattivare e anche minime quantità sono sufficienti a degradare l'RNA, non utilizzare materiale in plastica o vetro senza aver prima eliminato le possibili contaminazioni da RNasi. Fare molta attenzione a non introdurre inavvertitamente RNasi nel campione di RNA durante o dopo la procedura di purificazione. Per creare e mantenere un ambiente privo di RNasi, occorre prendere le seguenti precauzioni durante il pre-trattamento e l'utilizzo di flaconi e soluzioni, monouso e non, mentre si opera con l'RNA.

## Raccomandazioni generali per il trattamento



Quando si lavora con l'RNA è necessario utilizzare tecniche di asepsi microbiologiche appropriate. Le mani e le particelle di polvere trasportano batteri e muffe e rappresentano le fonti più comuni di contaminazione da RNasi. Indossare sempre guanti in lattice o vinile quando si manipolano i reagenti e i campioni di RNA, per evitare la contaminazione da RNasi dovuta alla superficie della pelle o alla polvere delle attrezzature di laboratorio. Cambiare i guanti frequentemente e chiudere le provette subito dopo l'uso. Mantenere l'RNA purificato in ghiaccio mentre si pipettano le aliquote per le applicazioni successive.

I protocolli per la rimozione della contaminazione da RNasi dai materiali in vetro e dalle soluzioni sono disponibili nelle guide di biologia molecolare, ad esempio, Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

# Appendice B: Determinazione della concentrazione, resa e purezza dell'RNA totale

## Quantificazione dell'RNA

La concentrazione di RNA deve essere determinata misurando l'assorbanza a 260 nm ( $A_{260}$ ) con uno spettrofotometro. Per garantire la significatività, le letture devono rientrare nel range di linearità dello spettrofotometro. L'assorbanza di 1 unità a 260 nm corrisponde a 44 µg di RNA per ml ( $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$ ). Questa relazione è valida solo per le misurazioni effettuate in 10 mM di Tris-HCl\*, pH 7,5. Pertanto, se occorre diluire il campione di RNA, è necessario utilizzare 10 mM di Tris-HCl. Come illustrato di seguito (vedere "Purezza dell'RNA", pag. 67), il rapporto fra i valori di assorbanza a 260 e 280 nm fornisce una stima della purezza dell'RNA. Quando si misurano campioni di RNA, assicurarsi che le cuvette siano prive di RNasi. Per azzerare lo spettrofotometro, utilizzare un bianco contenente la stessa proporzione di tampone di eluizione (BR5) e tampone Tris-HCl presenti nel campione da misurare. Il tampone di eluizione (BR5) assorbe intensamente a 220 nm, e questo può portare ad alti valori di assorbanza di sfondo, se lo spettrofotometro non è stato azzerato correttamente. Di seguito è riportato un esempio per il calcolo relativo alla quantificazione dell'RNA.

Volume del campione di RNA = 80 µl  
Diluizione (1/15) = 10 µl di campione di RNA + 140 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5  
Misurare l'assorbanza del campione diluito in una cuvetta (priva di RNasi).  
 $A_{260}$  = 0,3  
Concentrazione del campione di =  $44 \times A_{260} \times \text{fattore di diluizione}$   
=  $44 \times 0,3 \times 15$   
= 198 µg/ml  
Resa totale = concentrazione x volume del campione in millilitri  
=  $198 \text{ µg/ml} \times 0,08 \text{ ml}$   
= 15,8 µg RNA

\* Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede dei dati di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

## Purezza dell'RNA

Il rapporto dei valori di assorbanza compresi tra 260 nm e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) rappresenta una misura per la purezza dell'RNA rispetto ai contaminanti che assorbono nell'UV, come le proteine. Tuttavia il rapporto  $A_{260}/A_{280}$  dipende notevolmente dal valore pH. Un pH relativamente basso genera un rapporto  $A_{260}/A_{280}$  relativamente basso e riduce la sensibilità rispetto alle contaminazioni proteiche.\* Se sono necessari dati precisi e affidabili consigliamo di misurare l'assorbanza in 10 mM di Tris-HCl, pH 7,5. L'RNA puro ha un rapporto  $A_{260}/A_{280}$  pari a 1,8–2,2 in 10 mM di Tris-HCl, pH 7,5. Per azzerare lo spettrofotometro, utilizzare un bianco contenente la stessa proporzione di tampone di eluizione (BR5) e tampone Tris-HCl presenti nel campione da misurare. Il tampone di eluizione (BR5) assorbe intensamente a 220 nm, e questo può portare ad alti valori di assorbanza di sfondo, se lo spettrofotometro non è stato azzerato correttamente.

\* 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.

# Appendice C: Utilizzo delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Le seguenti istruzioni di BD forniscono indicazioni per l'uso delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Per ulteriori informazioni sull'impiego delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), consultare il manuale PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

## Istruzioni per rimuovere la chiusura BD Hemogard

1. Afferrare la PAXgene Blood RNA Tube (BRT) con una mano, disponendo il pollice sotto la chiusura BD Hemogard (per maggiore stabilità, tenere il braccio su una superficie solida). Con l'altra mano ruotare la chiusura BD Hemogard e contemporaneamente spingere con il pollice verso l'alto FINCHÉ IL FERMO DELLA PROVETTA NON SI ALLENTA.
2. Allontanare il pollice prima di sollevare la chiusura. NON utilizzare il pollice per rimuovere la chiusura dalla PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Attenzione: se la PAXgene Blood RNA Tube (BRT) contiene sangue, esiste un rischio di infezione. Per evitare lesioni durante la rimozione della chiusura, è importante che il pollice utilizzato per spingerla verso l'alto non venga in contatto con la PAXgene Blood RNA Tube (BRT) quando la chiusura BD Hemogard viene allentata.
3. Sollevare la chiusura dalla PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Se, come accade di rado, la schermatura in plastica si separa dal fermo in gomma, NON RIASSEMBLARE LA CHIUSURA. Rimuovere con cautela il fermo in gomma dalla PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

## Istruzioni per inserire la chiusura secondaria BD Hemogard

1. Riposizionare la copertura sulla PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Ruotare e spingere verso il basso con decisione, finché non si blocca in posizione. Il reinserimento completo del fermo è necessario affinché la chiusura rimanga bloccata in posizione sulla PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante la manipolazione.

# Informazioni per gli ordini

Prodotto	Sommario	N° cat.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, Processing Tubes, RNase-Free DNase I, RNase-Free Reagents e Buffers. Da utilizzare con le PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 provette per il prelievo di sangue	762165
<b>Prodotti correlati che possono essere ordinati presso QIAGEN</b>		
Starter Pack, QIAcube	La confezione include: rack per i flaconi per reagenti (3), etichette per i rack (8), puntali per filtro da 200 µl (1024), puntali per filtro da 1.000 µl (1.024), puntali per filtro da 1.000 µl, wide bore (1.024); flaconi per reagenti da 30 ml (18); adattatori per rotore (240); supporti per adattatori per rotore	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Puntali per filtro monouso, sterili, su rack	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Flaconi per reagenti (30 ml) con tappi; confezione da 6; per l'uso con il rack dei flaconi per reagenti QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	Per 240 preparazioni: 240 adattatori per rotore monouso; per l'uso con il QIAcube	990394

Reagent Bottle Rack	Rack per flaconi per reagenti da 6 x 30 ml sul tavolo di lavoro QIAcube	990390
Rotor Adapter Holder	Supporto per 12 adattatori di rotore monouso, per l'uso con il QIAcube	990392
<b>Prodotti correlati che possono essere ordinati presso BD*</b>		
Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: ago cannula 21 G da 0,75 pollici (0,8 x 19 mm), tubo da 12 pollici (305 mm) con adattatore luer; 50 in ogni scatola, 200 in ogni confezione	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Contenitore solo per diametro di 13 mm e 16 mm; 1.000/confezione	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm, per prelievo da 4,0 ml, con chiusura di sicurezza BD Hemogard rossa e con etichetta in carta; 100/scatola, 1.000/confezione	368975

\* Questi accessori per il prelievo di sangue rappresentano tipici prodotti che possono essere usati con le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Per saperne di più su questi accessori, incluso come ordinarli, visitare [www.PreAnalytiX.com](http://www.PreAnalytiX.com).

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti, consultare il rispettivo manuale del kit o il manuale utente PreAnalytiX o QIAGEN. I libretti di istruzioni e i manuali utente dei kit PreAnalytiX e QIAGEN sono disponibili su [www.PreAnalytiX.com](http://www.PreAnalytiX.com) e su [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) o possono essere richiesti presso i servizi di assistenza tecnica di PreAnalytiX.

# Cronologia delle revisioni del manuale

Documento e revisioni	Modifiche	Data
HB-0101-004, R2	Modifiche per la conformità alle normative GHS in tutto il documento	Giugno 2015
HB-0101-005, R3	Nuovo modello; revisioni al protocollo automatico e ai dati delle prestazioni; aggiornamento delle informazioni per la sicurezza per conformità alle normative GHS; modifiche ai dettagli dello strumento e alla dichiarazione relativa alle limitazioni per l'uso del prodotto.	Febbraio 2019
HB-0101-006, R3	Correzione del nome del kit nella tabella del contenuto del kit p. 5.	Gennaio 2020

## PreAnalytiX Worldwide

I prodotti PreAnalytiX sono distribuiti dalle aziende QIAGEN e BD

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

**www.qiagen.com**

**www.PreAnalytiX.com**

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

**www.bd.com**

**www.PreAnalytiX.com**



