

2020 sausis

# „PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA Kit“ vadovas

2 versija

R3 **MAT** 1120409LT

**IVD**



50 (katalogo nr. 762174)

**REF** 762174

**CE**



PreAnalytiX GmbH  
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon  
Pagaminta „QIAGEN GmbH“ pagal „PreAnalytiX“ užsakymą

 **PreAnalytiX**  
A QIAGEN / BD Company

Prekių ženklai: „PAXgene<sup>®</sup>“, „PreAnalytiX<sup>™</sup>“ („PreAnalytiX GmbH“); QIAGEN<sup>®</sup>, QIAcube<sup>®</sup> („QIAGEN Group“); „BD Vacutainer<sup>®</sup>“, „BD Hemogard<sup>™</sup>“, „Safety-Lok<sup>™</sup>“ („Becton, Dickinson and Company“); „Eppendorf<sup>®</sup>“ („Eppendorf AG“).

„PAXgene Blood RNA Kit“ tiekiami ne į visas šalis. Prašome teirautis.

#### **Ribotoji licencinė sutartis**

Šio produkto naudojimas reiškia, kad „PAXgene Blood RNA Kit“ pirkėjas arba naudotojas sutinka su šiomis sąlygomis:

1. „PAXgene Blood RNA Kit“ galima naudoti tik vadovaujantis „PAXgene Blood RNA Kit“ vadovu ir tik su rinkinyje esančiais komponentais. „PreAnalytiX“ nesuteikia jokios intelektinės nuosavybės licencijos naudoti ar įtraukti pridėtų šio rinkinio komponentų su į šį rinkinį neįeinančiais komponentais, išskyrus aprašytus „PAXgene Blood RNA Kit“ vadove ir papildomuose protokoluose, pateiktuose [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).
2. Jei aiškiai nenurodyta licencijose, „PreAnalytiX“ nesuteikia garantijos, kad šis rinkinys ir (arba) jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisių.
3. Rinkiniui ir jo komponentams suteikta licencija naudoti vieną kartą; pakartotinai naudoti, atnaujinti ar perparduoti negalima.
4. „PreAnalytiX“ aiškiai atsisako bet kokių kitų išreikštų ar numanomų licencijų, išskyrus aiškiai nurodytas licencijas.
5. Rinkinio pirkėjas ir naudotojas sutinka nesiimti ir neleisti niekam kitam imtis veiksmų, kurie galėtų paskatinti arba palengvinti čia nurodytus draudžiamus veiksmus.
6. „PreAnalytiX“ gali priversti vykdyti šios Ribotosios licencinės sutarties draudimus bet kuriame teisme ir atgauti visas tyrimo ir teismo išlaidas, įskaitant išlaidas advokatams, pateikusi ieškinį dėl šios Ribotosios licencinės sutarties vykdymo arba su šiuo rinkiniu ir (arba) jo komponentais susijusių teisių į savo intelektinę nuosavybę.

Atnaujintas licencijos sąlygas žr. [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

#### **Sąlyginis pardavimas**

Šis produktas pateikiamas su licencija pagal US-7,270,953 ir US-7,682,790 tam tikras paraiškas, taip pat EP-1820793 B1 ir šių patentų užsienio ekvivalentų paraiškas naudoti produktą nukleorūgščių kompleksui, suformuotam paėmus mėginius į „PAXgene Blood RNA Tube“, apdoroti.

HB-0101-006 BD-8945 1120409 © 2005–2020 „PreAnalytiX GmbH“. Visos teisės saugomos.

**PreAnalytiX Company**

**PreAnalytiX GmbH**

**Feldbachstrasse**

**CH – 8634 Hombrechtikon**

**Šveicarija**

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

#### **„PreAnalytiX“ platintojai**

„PreAnalytiX“ produktus pagal „PreAnalytiX“ užsakymą gamina QIAGEN arba BD. Produktus „PreAnalytiX“ platina QIAGEN arba BD. Produktų negalima užsisakyti iš „PreAnalytiX GmbH“.

Vietos „PreAnalytiX“ platintojo kontaktinę informaciją žr. paskutiniame puslapyje.

# Turinys

Rinkinio turinys .....	5
Simboliai .....	7
Laikymo sąlygos .....	8
Numatytoji paskirtis .....	9
Produkto naudojimo apribojimai .....	9
Kokybės kontrolė .....	10
Techninė pagalba .....	10
Saugos informacija .....	10
Įvadas .....	14
Principas ir procedūra .....	14
Mėginio paėmimas ir stabilizavimas .....	14
RNR koncentravimas ir gryninimas .....	20
Rankinis RNR gryninimas .....	20
Automatinis RNR gryninimas .....	30
Įranga ir reagentai, tiekiami naudotojo.....	36
Svarbios pastabos .....	38
„QIAcube“ naudojimas.....	38
„QIAcube“ paleidimas.....	38
Protokolų diegimas „QIAcube“ .....	38
„QIAcube“ įkėlimas .....	40
Protokolas: Rankinis bendros RNR gryninimas iš žmogaus viso kraujo, paimto į „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) .....	49

Protokolas: Automatizuotas bendros RNR gryninimas iš žmogaus viso kraujo, paimto į „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) .....	56
Trikčių šalinimo vadovas .....	63
A priedas. Bendrosios RNR tvarkymo pastabos.....	65
B priedas. Bendrosios RNR kiekybinis įvertinimas ir kokybės nustatymas.....	66
C priedas. „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) tvarkymas .....	67
Užsakymo informacija .....	69
Vadovo peržiūros istorija .....	71


# Rinkinio turinys

<b>PAXgene Blood RNA Kit</b>			<b>(50)</b>
<b>Katalogo Nr.</b>			<b>762174</b>
<b>Paruošimų skaičius</b>			<b>50</b>
BR1	„Resuspension Buffer“ (resuspensijos buferinis tirpalas)	RES BUF	20 ml
BR2	„Binding Buffer“* (rišamasis buferinis tirpalas)	BIND BUF	18 ml
BR3	„Wash Buffer 1“* (1 plovimo buferinis tirpalas)	WASH BUF 1	45 ml
BR4	„Wash Buffer 2 (concentrate)“† (2 plovimo buferinis tirpalas (koncentratas))	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	„Elution Buffer“ (eliavimo buferinis tirpalas)	ELU BUF	6 ml
RNFW	„RNase-free Water (bottle)“ (vanduo be RNazės (buteliukas))	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	„Proteinase K (green lid)“ (proteinazė K (žalias dangtelis))	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	„PAXgene RNA Spin Columns (red)“ („PAXgene RNA“ sukimo cilindrai (raudoni))	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	„Processing Tubes (2 ml)“ (apdorojimo mėgintuvėliai (2 ml))	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	„Secondary BD Hemogard™ Closures“ (antriniai „BD Hemogard™“ dangteliai)	SEC CLOS	50
MCT	„Microcentrifuge Tubes (1.5 ml)“ (mikrocentrifugavimo mėgintuvėliai (1,5 ml))	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	„DNase I, RNase-free (lyophilized)“ (DNazė I, be RNazės (liofilizuota))	DNA REM	1500 Kunitz vienetų‡

\*Nesuderinama su dezinfekavimo medžiagomis, kurių sudėtyje yra baliklio. Sudėtyje yra guanidino druskos. Saugos informaciją žr. 10 psl.

† 2 plovimo buferinis tirpalas (BR4) teikiamas kaip koncentratas. Prieš naudodami pirmą kartą, įpilkite 4 dalis etanolio (96–100 %, p.a. švarumo klasės), kaip nurodyta ant buteliuko, kad gautumėte darbinį tirpalą.

‡ Kunitz vienetai – dažniausiai naudojami vienetai matuojant DNazę I, apibrėžiami kaip DNazės I kiekis, dėl kurio A<sub>260</sub> padidėja 0,001 per minutę mililitre, esant 25 °C, pH 5,0, kaip substratą naudojant stipriai polimerizuotą DNR (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 ir 363).

<b>PAXgene Blood RNA Kit</b>			<b>(50)</b>
<b>Katalogo Nr.</b>			<b>762174</b>
<b>Paruošimų skaičius</b>			<b>50</b>
RDD	„DNA Digestion Buffer (white lid)“ (DNR skaidymo buferinis tirpalas (baltas dangtelis)	<b>DNA</b> <b>DIG</b> <b>BUF</b>	2 × 2 ml
DRB	„DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid)“ (DNazės resuspensijos buferinis tirpalas (mėgintuvėlis, alyvų spalvos dangtelis)	<b>DNase</b> <b>RES</b> <b>BUF</b>	2 ml
PSC	„PAXgene Shredder Spin Columns (lilac)“ („PAXgene Shredder“ sukimo cilindrai (alyvų spalvos)	<b>PAXgene</b> <b>SHRED</b> <b>COL</b>	5 × 10
Vadovas	„PAXgene Blood RNA Kit Handbook (Version 2)“ („PAXgene Blood RNA Kit“ vadovas (2 versija)		1

# Simboliai



Sudėtyje yra pakankamas reagentų kiekis <N> testams atlikti



Žr. naudojimo instrukcijas



Tinka naudoti iki



*In vitro* diagnostikos medicinos prietaisas



Katalogo numeris



Partijos numeris



Medžiagos numeris



Komponentai



Numeris



Sterilizavimo metodas švitinant



Kunitz vienetai



Papildymas



Sudėtyje yra














Atkurta



Deoksiribonukleazė I



Etanolis

	Guanidino izotiocianatas
	RNase-Free DNase Set
	Visuotinis prekės numeris
	Nenaudoti pakartotinai
	Temperatūros apribojimai
	Viršutinė temperatūros riba
	Gamintojas
	Svarbi pastaba
	Įpylę į buteliuką etanolio, pažymėkite esamą datą
	Gavus
	Veda į

## Laikymo sąlygos

„PAXgene RNA“ sukimo cilindrus (PRC), „PAXgene Shredder“ sukimo cilindrus (PSC), proteinazę K (PK) ir buferinius tirpalus (BR1, BR2, BR3, BR4 ir BR5) galima laikyti sausai, rinkinio etiketėje nurodytoje temperatūroje.

„RNase-Free DNase Set“, kurio sudėtyje yra DNazė I (RNFD), DNR skaidymo buferinis tirpalas (RDD) ir DNazės resuspensijos buferinis tirpalas (DRB), siunčiamas aplinkos temperatūroje. Gavę visus „RNase-Free DNase Set“ komponentus nedelsdami padėkite etiketėje nurodytoje temperatūroje. Tinkamai laikomas rinkinys yra stabilus iki galiojimo termino, nurodyto ant rinkinio dėžutės.



# Numatytoji paskirtis

„PAXgene Blood RNA Kit“ skirtas ląstelių RNR gryninti iš viso kraujo, paimto į „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT). Kai rinkinys naudojamas kartu su „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT), sistema pateikia iš viso kraujo išgrynintą ląstelių RNR, skirtą AT-PGR, kuri naudojama molekulinės diagnostikos tyrimuose. Daugiau informacijos apie „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) naudojimą žr. „PAXgene Blood RNA Tube“ vadove (PAXgene Blood RNA Tube Handbook).

**„PAXgene Blood RNA System“ efektyvumo charakteristikos buvo nustatyto naudojant FOS ir IL1B genų transkriptus. Naudojant kitus objekto transkriptus, už tinkamo „PAXgene Blood RNA System“ efektyvumo charakteristikų užtikrinimą atsako naudotojas.**

## Produkto naudojimo apribojimai

„PAXgene Blood RNA Kit“ skirtas ląstelių RNR gryninti iš žmogaus viso kraujo ( $4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$  leukocitų/ml), atliekant *in vitro* diagnostinius tyrimus. Jis nėra skirtas genominėms DNR ar virusinėms nukleorūgštims gryninti iš žmogaus viso kraujo. Dėl riboto skaičiaus patvirtintų stabilizavimo specifikacijų transkriptų (FOS ir IL1B genų transkriptai), nebuvo nustatytos visų transkriptų efektyvumo charakteristikos. Laboratorijos personalas turėtų peržiūrėti gamintojo duomenis ir savo duomenis, kad nustatytų, ar būtina patvirtinti kitus transkriptus.

Šis gaminys skirtas naudoti profesionaliems naudotojams, pvz., technikams ir gydytojams, paruoštiems atlikti *in vitro* diagnostikos procedūras.

# Kokybės kontrolė

Vadovaujantis QIAGEN ISO sertifikuota kokybės valdymo sistema, kiekviena „PAXgene Blood RNA Kit“ partija išbandoma pagal nustatytas specifikacijas, siekiant nuolat išlaikyti produktų kokybę.

## Techninė pagalba

Įmonė QIAGEN didžiuojasi savo techninės pagalbos kokybe ir prieinamumu. Mūsų techninės priežiūros skyriuose dirba patyrę mokslininkai, turintys daug praktinės ir teorinės molekulinės biologijos bei „PreAnalytiX“ produktų naudojimo patirties. Jei turite klausimų apie „PAXgene Blood RNA Kit“, nedvejodami su mumis susisiekite.

Jei reikia techninės pagalbos ar daugiau informacijos, kreipkitės į QIAGEN techninio klientų aptarnavimo tarnybą.

## Saugos informacija

Dirbdami su cheminėmis medžiagomis visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalātą, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius.

Siekiant išvengti infekcijos rizikos (pvz., ŽIV ar hepatito B virusų) ar sužeidimo dirbant su biologinėmis ir cheminėmis medžiagomis, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalātą, vienkartinės pirštines ir apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose (safety data sheets, SDS). Jie pateikiami patogiu ir kompaktišku PDF formatu internete [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) – čia galite rasti, peržiūrėti ir išspausdinti šio rinkinio SDS.

**DĖMESIO**



NEPILKITE baliklio ar rūgštinių tirpalų tiesiai į mėginių ruošimo atliekas.

Rišamojo buferinio tirpalo (BR2) ir 1 plovimo buferinio tirpalo (BR3) sudėtyje yra guanidino tiocianato, kuris jungdamasis su balikliu gali sudaryti labai reaktyvius junginius. Išlieję rišamąjį buferinį tirpalą (BR2) arba 1 plovimo buferinį tirpalą (BR3), išvalykite tinkamu laboratoriniu plovikliu ir vandeniu. Jei skystyje yra galinčių užkrėsti medžiagų, atitinkamą vietą iš pradžių nuvalykite laboratoriniu plovikliu ir vandeniu, o tada 1 % (v/v) natrio hipochloritu.

RNR stabilizavimo tirpalo ir kraujo mišinį iš „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) galima dezinfekuoti naudojant 1 dalį rinkoje parduodamo balinimo tirpalo (5 % natrio hipochlorito) 9 dalims RNR stabilizavimo tirpalo ir kraujo mišinio.

Mėginio paruošimo atliekas, pvz., supernatantus po RNR gryninimo procedūros centrifugavimo žingsnio, reikia tvarkyti kaip galinčias užkrėsti medžiagas. Prieš išmetant, atliekas reikia sterilizuoti autoklave arba sudeginti, kad pavojingos medžiagos būtų sunaikintos. Išmesti reikia laikantis oficialių taisyklių.

„PAXgene Blood RNA Kit“ komponentams taikomi toliau nurodyti pavojingumo ir atsargumo teiginiai. „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) saugos informaciją žr. „PAXgene Blood RNA Tube“ vadove.

### Buferinis tirpalas BR2



Sudėtyje yra guanidino tiocianato. Pavojinga! Kenksminga prarijus. Gali būti kenksminga susilietus su oda arba įkvėpus. Sukelia smarkų akių pažeidimą. Toksiška vandens organizmams, sukelia ilgalaikius pakitimus. Kontaktuojama su rūgštimis išskiria labai toksiškas dujas. Mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. PATEKUS Į AKIS: atsargiai plauti vandeniu kelias minutes. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis. Nedelsiant skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ arba kreiptis į gydytoją.

### Buferinis tirpalas BR3



Sudėtyje yra: etanolio, guanidino tiocianato. Pavojinga! Degūs skystis ir garai. Sukelia smarkų akių pažeidimą. Kontaktuojama su rūgštimis išskiria labai toksiškas dujas. Laikyti atokiau nuo šilumos šaltinių / žiežirbų / atviros liepsnos / karštų paviršių. Nerūkyti. Mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. PATEKUS Į AKIS: atsargiai plauti vandeniu kelias minutes. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis. Nedelsiant skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ arba kreiptis į gydytoją.

### DNazė I



Sudėtyje yra: DNazės. Pavojinga! Gali sukelti alerginę odos reakciją. Įkvėpus gali sukelti alerginę reakciją, astmos simptomus arba apsunkinti kvėpavimą. Stengtis neįkvėpti dulkių / dūmų / dujų / rūko / garų / aerozolio. Mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. Naudoti kvėpavimo takų apsaugos priemones. Esant sąlyčiui arba jeigu numanomas sąlytis: skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ arba kreiptis į gydytoją. Išneškite nukentėjusį į gryną orą; jam būtina ramybė ir padėtis, leidžianti laisvai kvėpuoti.

## Proteinazė K



Sudėtyje yra: proteinazės K. Pavojus! Nestipriai dirgina odą. Įkvėpus gali sukelti alerginę reakciją, astmos simptomus arba apsunkinti kvėpavimą. Stengtis neįkvėpti dulkių / dūmų / dujų / rūko / garų / aerozolio. Mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. Naudoti kvėpavimo takų apsaugos priemones. Esant sąlyčiui arba jeigu numanomas sąlytis: skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ arba kreiptis į gydytoją. Išneškite nukentėjusįjį į gryną orą; jam būtina ramybė ir padėtis, leidžianti laisvai kvėpuoti.

# Išvadas

Viso kraujo paėmimas yra daugelio molekulinį tyrimų, skirtų tirti ląstelių RNR, pirmasis žingsnis. Tačiau pagrindinė tokių eksperimentų problema – ląstelių RNR profilio *in vitro* nestabilumas. „PreAnalytiX“ atlikti tyrimai parodė, kad atskirtų mRNR rūšių kopijų skaičius visame kraujyje, laikant arba transportuojant kambario temperatūroje, gali pasikeisti daugiau nei 1000 kartų.\* Taip atsitinka dėl greito RNR skilimo ir paėmus kraują sukelta tam tikrų genų ekspresija. Tokie RNR ekspresijos profilio pasikeitimai neleidžia atlikti patikimų genų ekspresijos tyrimų. Todėl metodas, kuriuo išlaikomas RNR ekspresijos profilis flebotomijos metu ir po jos, yra labai svarbus siekiant tiksliai ištirti geno ekspresiją žmogaus visame kraujyje.

## Principas ir procedūra

„PreAnalytiX“ sukūrė naują sistemą, leidžiančią paimti, stabilizuoti, laikyti ir transportuoti žmogaus viso kraujo mėginius, ir greitą bei efektyvų ląstelių RNR gryninimo protokolą. Sistemoje naudojami „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT; JAV patentai 6,602,718 ir 6,617,170), skirti kraujui paimti ir RNR stabilizuoti, po to rankiniu arba automatinio būdu gryninti RNR, naudojant „PAXgene Blood RNA Kit“. Tiek rankinio, tiek automatizuoto protokolų efektyvumas RNR kokybės ir išeigos atžvilgiu iš esmės yra lygiavertis. Šiame vadove pateikti rankinio protokolo (23–30 psl.) ir automatizuoto protokolo (33–35 psl.) efektyvumo duomenys.

## Mėginio paėmimas ir stabilizavimas

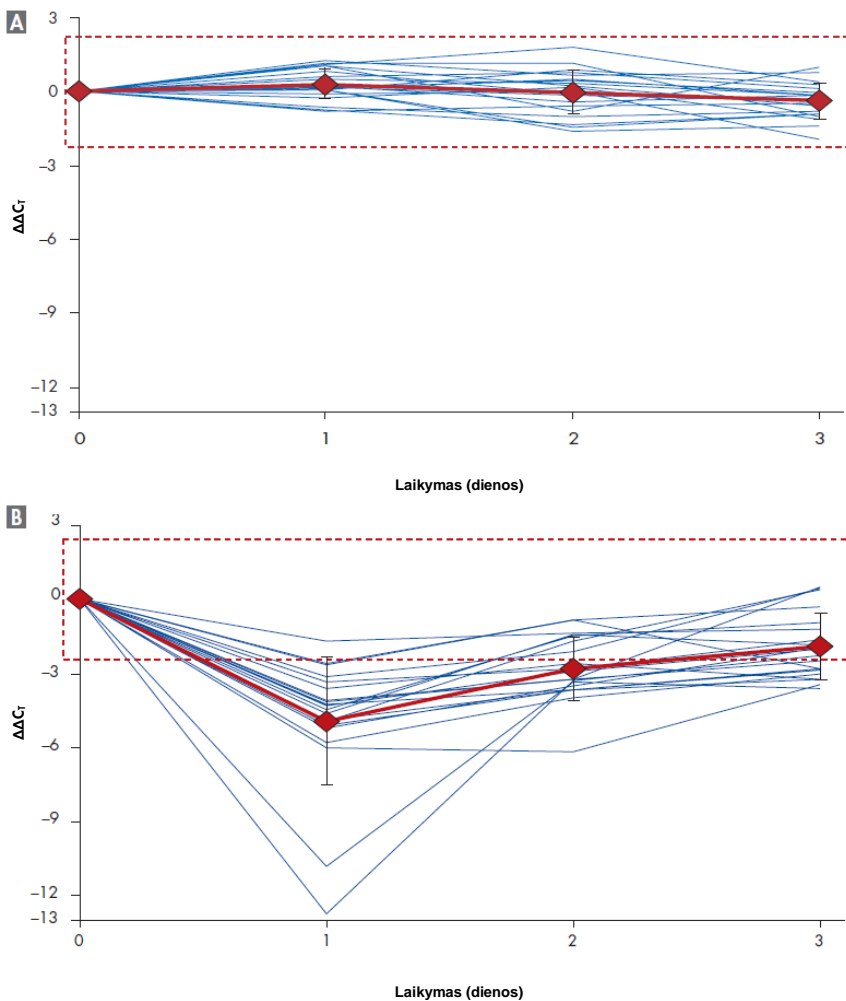
„PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) sudėtyje yra patentuota reagentų kompozicija, pagrįsta patentuota RNR stabilizavimo technologija. Ši reagentų kompozicija apsaugo RNR molekules nuo RNazės skaidymo ir sumažina genų ekspresijos pokyčius *ex vivo*. „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) skirti žmogaus viso kraujo mėginiams paimti ir

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

stabilizuoti ląstelių RNR ne ilgiau nei 3 dienas 18–25 °C (1 ir 2 pav., 16 ir 17 psl.) arba ne ilgiau nei 5 dienas 2–8 °C (3 ir 4 pav., 18 ir 19 psl.). Turimi duomenys rodo ląstelių RNR stabilizavimą mažiausiai 11 metų, esant –20 °C arba –70 °C\*. Jei norite gauti daugiau informacijos apie vykdomų stabilumo ilgesniais laikotarpiais vertinimo tyrimus, kreipkitės į QIAGEN techninės pagalbos tarnybą.

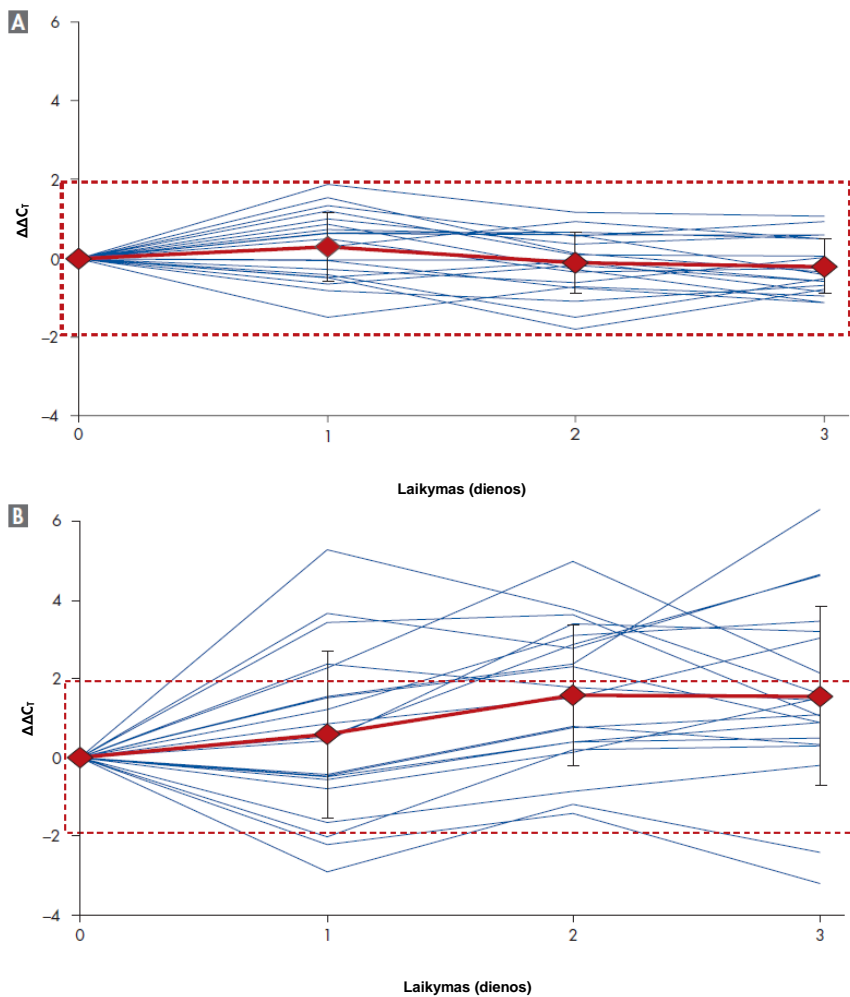
Faktinė RNR stabilizavimo trukmė gali skirtis atsižvelgiant į ląstelių RNR rūšis ir vėliau naudojamo metodo. Dėl riboto skaičiaus patvirtintų stabilizavimo specifikacijų transkriptų (FOS ir IL1B genų transkriptai), nebuvo nustatytos visų transkriptų efektyvumo charakteristikos. Laboratorijos personalas turėtų peržiūrėti gamintojo duomenis ir savo duomenis, kad nustatytų, ar būtina patvirtinti kitus transkriptus.

\* Šiuo metu vykdomas ilgalaikis kraujo laikymo „PAXgene Blood RNA Tubes“ tyrimas.

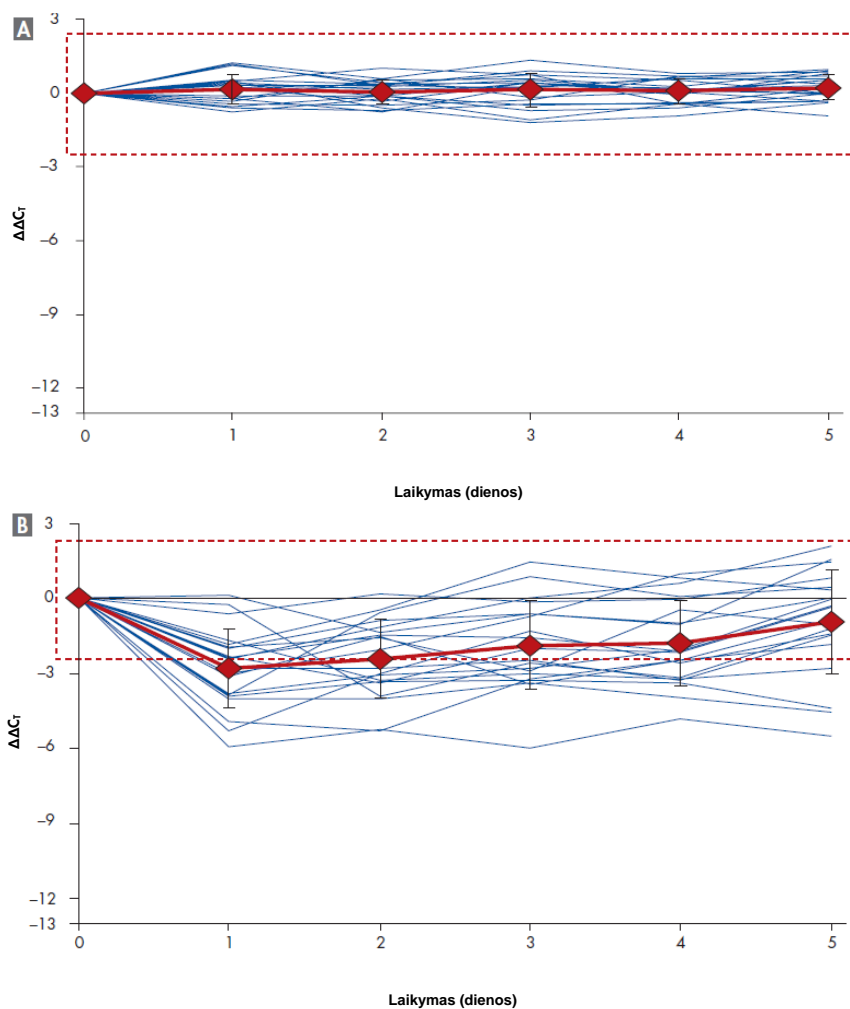


**1 pav. RNR stabilumas kraujo mėginiuose, 18–25 °C: FOS.** Buvo paimti 10 donorų dubliuoti kraujo mėginiai ir nurodytą dienų skaičių laikomi 18–25 °C, po to buvo atliktas bendrosios RNR išgryninimas. **[A]** Kraujas buvo paimtas ir laikomas „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT), o bendroji RNR išgryninta naudojant „PAXgene Blood RNA Kit“. **[B]** Kraujas buvo paimtas ir laikomas standartiniuose kraujo paėmimo mėgintuvėliuose su antikoagulantu EDTA, o bendroji RNR buvo išgryninta naudojant standartinį organinės ekstrakcijos metodą, atliekant silicio dioksido membranos pagrindu pagrįstą RNR valymą. Santykiniai FOS transkriptų lygiai buvo nustatyti realiuoju laiku, dviguba AT-PGR, kaip vidinį standartą naudojant 18S rRNR. Visų mėginių reikšmės perkeltos į diagramą su visų rodomų mėginių vidurkio ir standartinio nuokrypio reikšmėmis. Punktyrinės linijos žymi  $\pm 3$  k. bendrą tyrimo tikslumą (2,34  $C_T$ ).

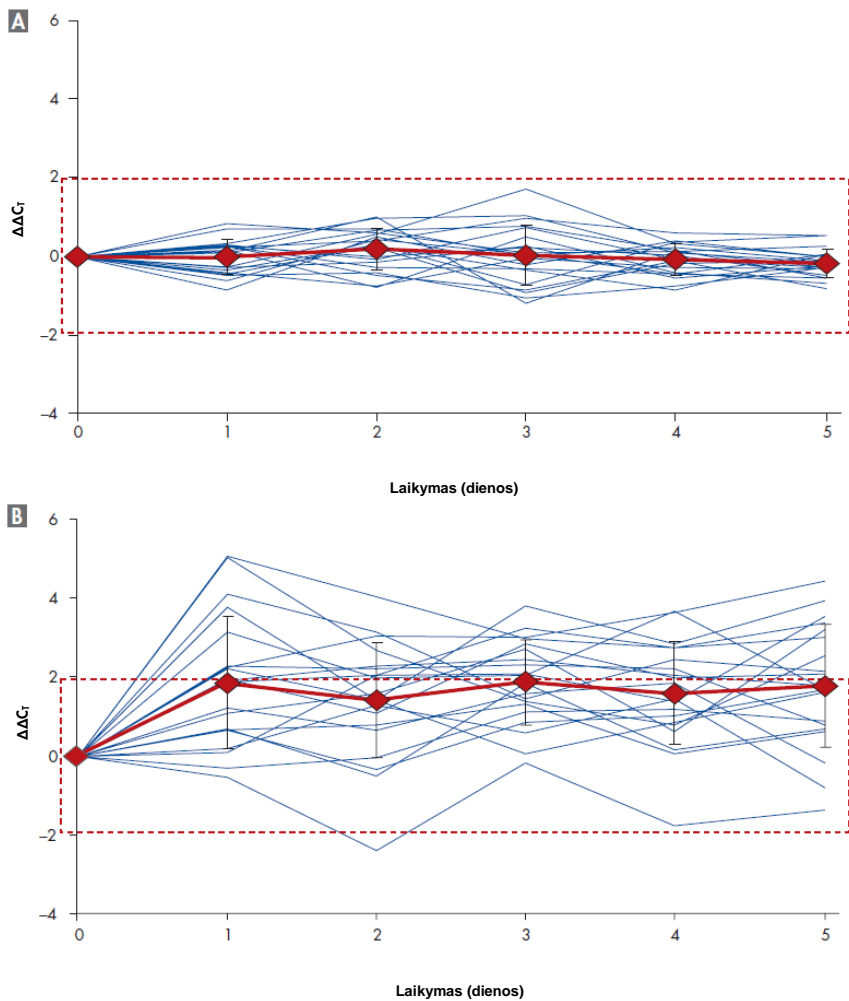




**2 pav. RNR stabilumas kraujo mėginiuose, 18–25 °C: IL1B.** Kraujas buvo paimtas ir bendroji RNR išgryninta po to, kai buvo laikomas 18–25 °C, kaip aprašyta 1 pav. Santykiniai IL1B transkripto lygiai buvo nustatyti realiojo laiko, dviguba AT-PGR, kaip vidinį standartą naudojant 18S rRNR. Visų mėginių reikšmės perkeltos į diagramą su visų rodomų mėginių vidurkio ir standartinio nuokrypio reikšmėmis. Punktyrinės linijos žymi  $\pm 3$  k. bendrą tyrimo tikslumą (1,93  $C_T$ ).



**3 pav. RNR stabilumas kraujo mėginiuose, 2-8°C: FOS.** Buvo paimti 10 donorų dubliuoti kraujo mėginiai ir nurodytą dienų skaičių laikomi 2-8°C, po to buvo atliktas bendrosios RNR išgryninimas. **[A]** Kraujas buvo paimtas ir laikomas „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT), o bendroji RNR išgryninta naudojant „PAXgene Blood RNA Kit“. **[B]** Kraujas buvo paimtas ir laikomas standartiniuose kraujo paėmimo mėgintuvėliuose su antikoagulantu EDTA, o bendroji RNR išgryninta naudojant standartinį organinės ekstrakcijos metodą, atliekant silicio dioksido membranos pagrindu pagrįstą RNR valymą. Santykiniai FOS transkriptų lygiai buvo nustatyti realiuoju laiku, dviguba AT-PGR, kaip vidinį standartą naudojant 18S rRNR. Visų mėginių reikšmės perkeltos į diagramą su visų rodomų mėginių vidurkiu ir standartinio nuokrypio reikšmėmis. Punktyrinės linijos žymi  $\pm 3$  k. bendrą tyrimo tikslumą (2,34  $C_T$ ).



**4 pav. RNR stabilumas kraujo mėginiuose, 2-8°C: IL1B.** Kraujas buvo paimtas ir bendroji RNR išgryninta po to, kai buvo laikomas 2-8°C, kaip aprašyta 3 pav. Santykiniai IL1B transkripto lygiai buvo nustatyti realiojo laiko, dviguba AT-PGR, kaip vidinį standartą naudojant 18S rRNR. Visų mėginių reikšmės perkeltos į diagramą su visų rodomų mėginių vidurkio ir standartinio nuokrypio reikšmėmis. Punktyrinės linijos žymi  $\pm 3$  k. bendrą tyrimo tikslumą (1,93 Ct).

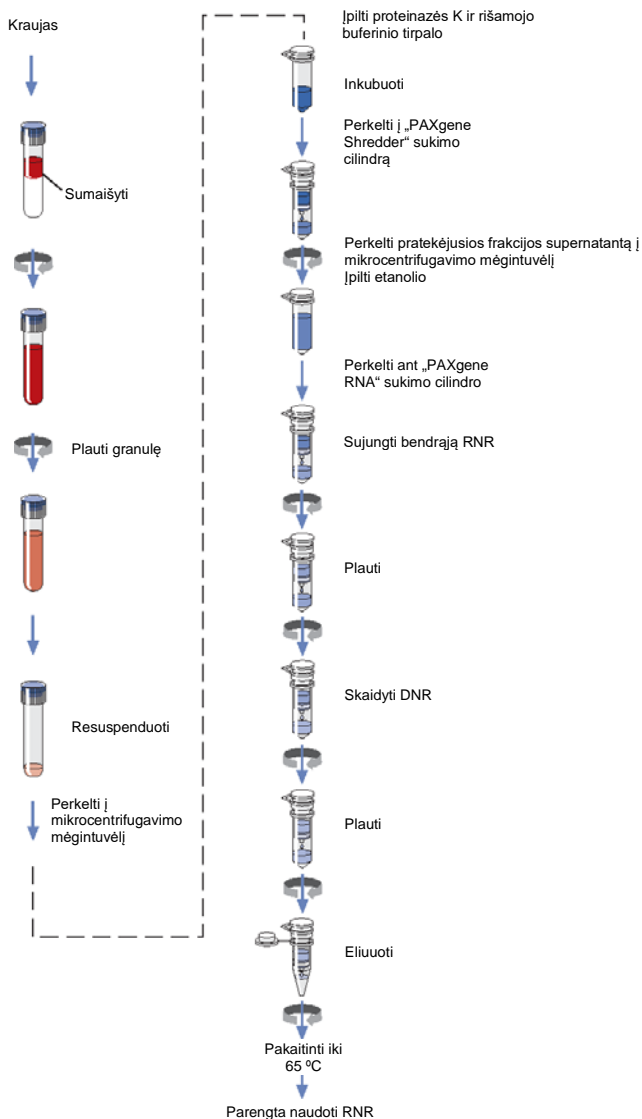
## RNR koncentravimas ir gryninimas

„PAXgene Blood RNA Kit“ skirtas bendrajai RNR gryninti iš 2,5 ml žmogaus viso kraujo, paimto į „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT). Procedūra yra paprasta ir ją galima atlikti rankiniu arba automatinio būdu (žr. 5 ir 10 pav., 21 ir 31 psl.). Abiejuose protokoluose gryninimas pradedamas nuo centrifugavimo žingsnio, siekiant granuluoti „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) esančias nukleorūgštis. Granulės išplaunamas ir resuspenduojama, po to rankiniu arba automatinio būdu RNR gryninama. Iš esmės, į abu protokolus įtraukti tie patys protokolo žingsniai su tais pačiais rinkinio komponentais.

## Rankinis RNR gryninimas

Konkrečiai, resuspenduota granulė inkubuojama optimizuotuose buferiniuose tirpaluose kartu su proteinaze K (PK), siekiant suskaidyti baltymą. Siekiant homogenizuoti ląstelių lizatą ir pašalinti ląstelių atliekas, papildomai centrifuguojama „PAXgene Shredder“ sukimo cilindre (PSC), o pratekėjusios frakcijos supernatantas perkeliamas į šviežią mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį. Siekiant koreguoti surišimo sąlygas, įpilama etanolio, o lizatas perkeliamas į „PAXgene RNA“ sukimo cilindrą (PRC). Po trumpo centrifugavimo, RNR selektyviai prisijungia prie „PAXgene“ silicio dioksido membranos, o priemaišos prateka. Likusios priemaišos efektyviai pašalinamos keliais plovimo veiksmams. Tarp pirmojo ir antrojo plovimo veiksmų, norint pašalinti sujungtos DNR pėdsakus, membrana apdorojama DNaze I (RNFD). Atlikus plovimo veiksmus, RNR išplaunama eliuavimo buferiniu tirpalu (BR5) ir denatūruojama karščiu.

Bendroji RNR, gryninta naudojant „PAXgene Blood RNA System“, yra gryna. Naudojant rankinį protokolą,  $A_{260}/A_{280}$  reikšmės nuo 1,8 iki 2,2 ir  $\leq 1\%$  (w/w) genominės DNR yra  $\geq 95\%$  visų mėginių, kai matuojama naudojant beta-aktino geno sekos kiekybinę, realiojo laiko PGR. Mažiausiai 95 % mėginių nebuvo slopinimo AT-PGR, kai buvo naudojama iki 30 % eliuato.

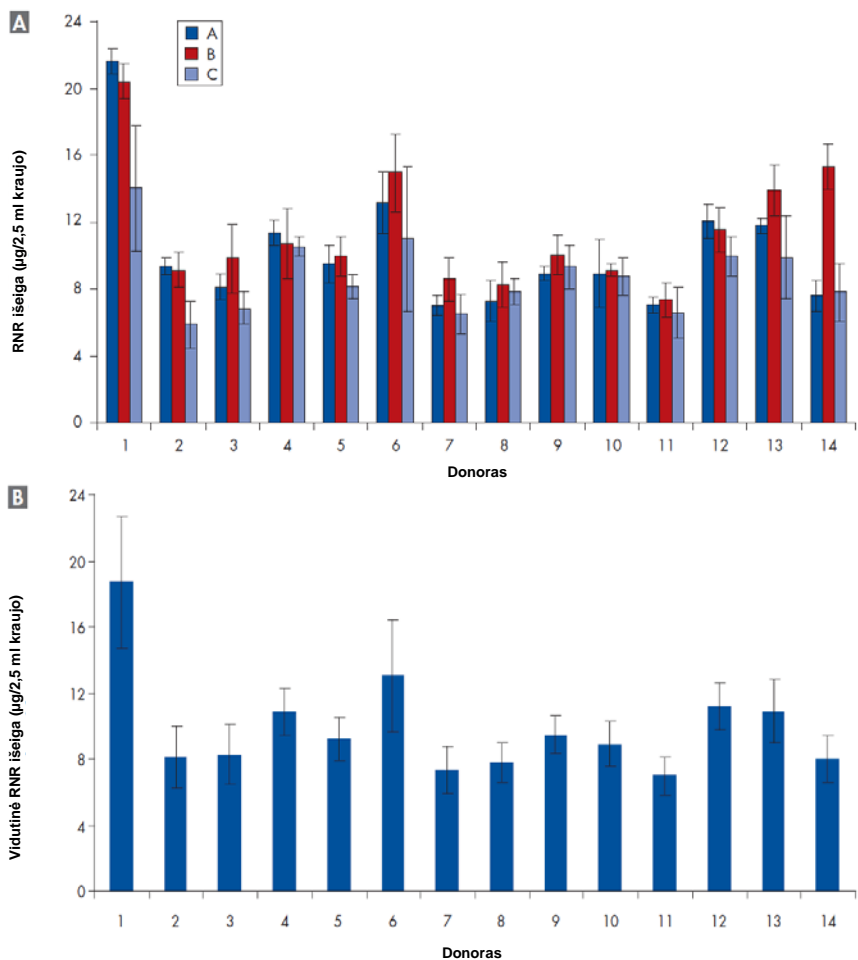


5 pav. Rankinė „PAXgene Blood RNA“ procedūra.

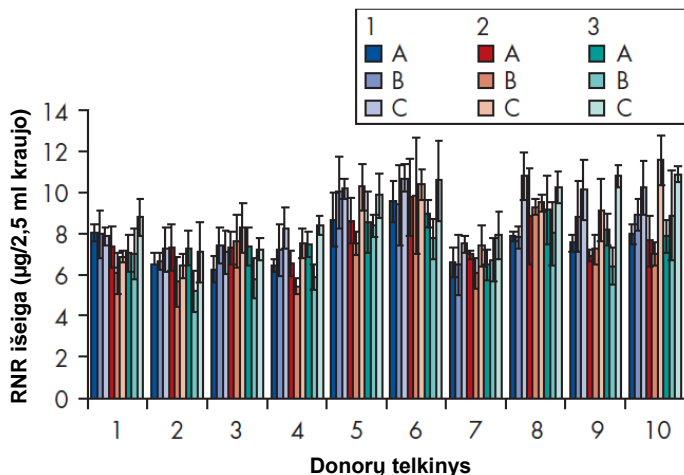
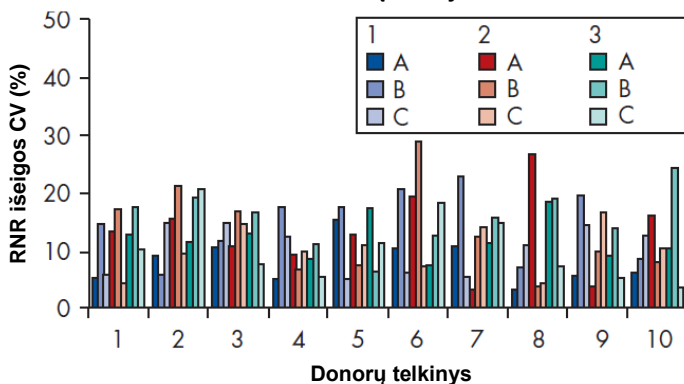
Naudojant rankinį protokolą, vidutinis mėginio paruošimo laikas (remiantis 12 tiriamų mėginio paruošimo duomenimis) yra maždaug 90 minučių\*, iš jų tik 40 minučių praktinio darbo.  $\geq 95\%$  apdorotų mėginių RNR išeiga iš 2,5 ml sveiko žmogaus viso kraujo yra  $\geq 3 \mu\text{g}$ . Išeiga labai priklauso nuo donoro, todėl atskiros išeigos gali skirtis. „PAXgene Blood RNA“ sistema užtikrina didelį atskirų donorų išeigos atkuriamumą ir kartotinumą (6 ir 7 pav., 23 ir 24 psl.) bei AT-PGR atkuriamumą ir kartotinumą (8 ir 9 pav., 28 ir 29 psl.), todėl ji ypač patikima atliekant klinikinius diagnostinius tyrimus.

6 pav. (23 psl.) parodytas „PAXgene Blood RNA System“ bendras pakartojamumas ir atkuriamumas. Buvo atlikti papildomi tyrimai, norint sužinoti skirtingų „PAXgene Blood RNA Kit“ partijų ir skirtingų operatorių įtaką RNR išeigos atkuriamumui ir realiojo laiko AT-PGR efektyvumui. Atliekant tyrimus buvo naudojami jungtiniai kraujo mėginiai, o ne atskiri „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT), todėl rezultatai atspindi ne sistemos pakartojamumą, įskaitant atskirų kraujo ėmimų svyravimus, o tik viso mėginio paruošimo pakartojamumą (žr. 7 pav., 24 psl.).

\* Bendras protokolo vykdymo laikas, įskaitant „PAXgene Blood RNA Tubes“ paruošimą (centrifugavimus, granulės plovimą ir granulės resuspensiją).



**6 pav. Atkuriamas ir pakartojamas RNR gryninimas.** Keturis kartotinius kraujo mėginius iš 14 donorų rankiniu būdu apdorojo 3 technikai (A, B, C). Buvo naudojami trys įrangos rinkiniai, o visi mėginiai, kuriuos ruošė vienas technikas, buvo apdoroti naudojant tą pačią įrangą. **[A]** Parodytos kartotinių mėginių iš tų pačių donorų, kuriuos apdorojo skirtingi technikai, RNR išeigos vidurkio ir standartinio nuokrypio reikšmės. **[B]** Dvylika kartotinių kiekvieno iš 14 donorų mėginių apdorojo 3 skirtingi technikai. Parodytos mėginių iš tų pačių donorų, kuriuos apdorojo visi technikai, RNR išeigos vidurkio ir standartinio nuokrypio reikšmės. Visų RNR mėginių  $A_{260}/A_{280}$  santykio intervalas yra nuo 1,8 iki 2,2.

**A****B**

**7 pav. Skirtingų operatorių ir „PAXgene Blood RNA Kit“ partijų RNR išeigos pakartojamumas ir atkuriamumas, naudojant jungtinius kraujo mėginius.** 30 skirtingų donorų kraujo mėginiai buvo paimti į „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT; 12 mėgintuvėlių vienam donorui, iš viso 360 mėgintuvėlių). 3 donorų mėgintuvėlių turinys buvo sujungtas ir po to iš naujo padalytas alikvotinėmis dalimis į 36 mėginius. Šiuos 3 donorų telkinio 36 mėginius rankiniu būdu apdorojo 3 skirtingi operatoriai. Kiekvienas operatorius ekstrakcijai naudojo 3 skirtingas „PAXgene Blood RNA Kit“ partijas ir apdorojo kiekvieno iš 10 donorų telkinių keturis kartotinius mėginius. **[A]** Kiekvieno operatoriaus ir partijos derinio RNR išeiga ir standartinis nuokrypis. Keturis kartotinius kraujo mėginius iš 10 donorų apdorojo 3 skirtingi operatoriai (A, B, C), naudodami kiekvieną iš 3 rinkinių partijų (1, 2, 3). Pateiktos keturių kartotinių mėginių iš to paties donorų telkinio skirtingų operatorių ir skirtingų rinkinių partijų vidutinė išeigos (stulpeliai) ir standartinio nuokrypio (paklaidos brūkšniai) reikšmės. **[B]** Visų operatorių ir partijų derinių (A, B, C; 1, 2, 3) donorų telkinių RNR išeigos CV, skaičiuojant iš vidutinės išeigos ir standartinio nuokrypio, pavaizduotų 7A pav.



1A lentelė. Kiekvienos partijos ir kiekvieno naudotojo pasirinktų donorų telkinių (1, 6, 9, 10) atkuriamumas

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

**1B lentelė. Kiekvieno naudotojo ir visų partijų pasirinktų donorų telkinių (1, 6, 9, 10) atkuriamumas**

Duomenų derinys	1 donorų telkinys 5,1 x 10 <sup>6</sup> ląstelių/ml			6 donorų telkinys 6,5 x 10 <sup>6</sup> ląstelių/ml		
	Vidutinė išeiga (μg)	SD (μg)	CV (%)	Vidutinė išeiga (μg)	SD (μg)	CV (%)
A naudotojas, visos partijos	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
B naudotojas, visos partijos	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
C naudotojas, visos partijos	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Duomenų derinys	9 donorų telkinys 8,4 x 10 <sup>6</sup> ląstelių/ml			10 donorų telkinys 10,2 x 10 <sup>6</sup> ląstelių/ml		
	Vidutinė išeiga (μg)	SD (μg)	CV (%)	Vidutinė išeiga (μg)	SD (μg)	CV (%)
A naudotojas, visos partijos	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
B naudotojas, visos partijos	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
C naudotojas, visos partijos	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

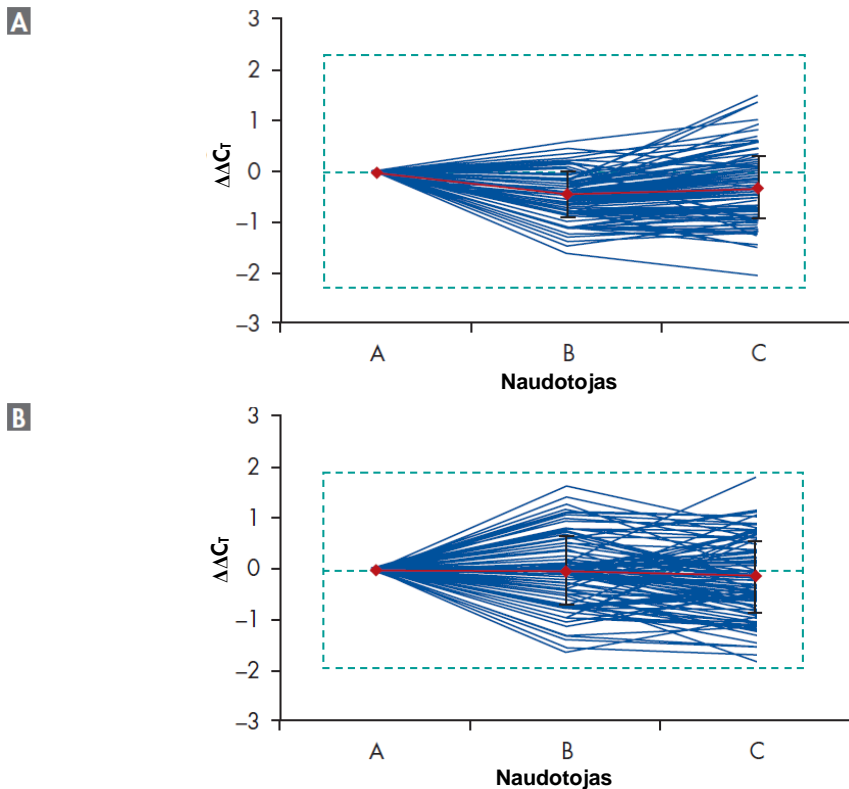
**1C lentelė. Kiekvienos partijos ir visų naudotojų pasirinktų donorų telkinių (1, 6, 9, 10) atkuriamumas**

Duomenų derinys	1 donorų telkinys 5,1 x 10 <sup>6</sup> ląstelių/ml			6 donorų telkinys 6,5 x 10 <sup>6</sup> ląstelių/ml		
	Vidutinė išeiga (μg)	SD (μg)	CV (%)	Vidutinė išeiga (μg)	SD (μg)	CV (%)
1 partija, visi naudotojai	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
2 partija, visi naudotojai	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
3 partija, visi naudotojai	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Duomenų derinys	9 donorų telkinys 8,4 x 10 <sup>6</sup> ląstelių/ml			10 donorų telkinys 10,2 x 10 <sup>6</sup> ląstelių/ml		
	Vidutinė išeiga (μg)	SD (μg)	CV (%)	Vidutinė išeiga (μg)	SD (μg)	CV (%)
1 partija, visi naudotojai	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
2 partija, visi naudotojai	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
3 partija, visi naudotojai	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

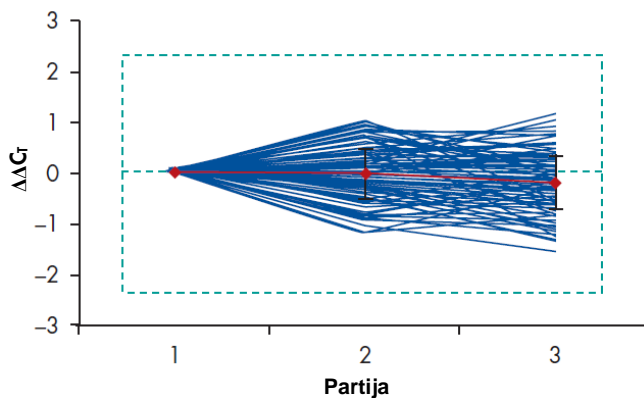
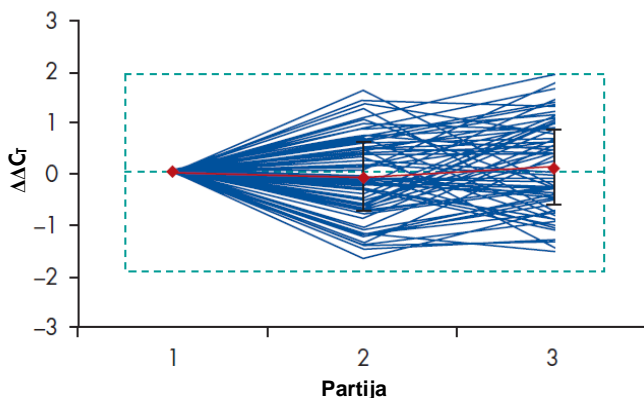
1D lentelė. Visų partijų ir visų naudotojų pasirinktų donorų telkinių (1, 6, 9, 10) atkuriamumas

Duomenų derinys	1 donorų telkinys 5,1 x 10 <sup>6</sup> ląstelių/ml			6 donorų telkinys 6,5 x 10 <sup>6</sup> ląstelių/ml		
	Vidutinė išeiga (µg)	SD (µg)	CV (%)	Vidutinė išeiga (µg)	SD (µg)	CV (%)
1 partija, visi naudotojai	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
Duomenų derinys	9 donorų telkinys 8,4 x 10 <sup>6</sup> ląstelių/ml			10 donorų telkinys 10,2 x 10 <sup>6</sup> ląstelių/ml		
	Vidutinė išeiga (µg)	SD (µg)	CV (%)	Vidutinė išeiga (µg)	SD (µg)	CV (%)
1 partija, visi naudotojai	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Išsami 4 tipinių donorų telkinių analizė. Telkiniai buvo pasirinkti pagal leukocitų skaičių ir atspindi normalaus leukocitų skaičiaus diapazono viršutinę, vidurinę ir apatinę reikšmes ( $4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$  leukocitų/ml). Leukocitų skaičius rodo 3 donorų iš donorų telkinio 3 leukocitų skaičių vidutinę reikšmę.



**8 pav. AT-PGR atkuriamumas tarp skirtingų naudotojų.** Atliekant realiojo laiko AT-PGR, buvo naudojama 7 pav. aprašyto eksperimento metu išgryninta RNR. Santykiniai **[A]** FOS ir **[B]** IL1B transkripto lygiai buvo nustatyti realiojo laiko, dviguba AT-PGR, kaip vidinį standartą naudojant 18S rRNR. Visų mėginių reikšmės perkeltos į diagramą, 1 naudotojo reikšmių atžvilgiu (10 donorų telkinių x 3 rinkinio partijos x 4 pakartojimai = 120 kiekvieno geno duomenų rinkinių), su visų rodomų mėginių vidurkio (raudonos linijos) ir standartinio nuokrypio (juodos linijos) reikšmėmis. Punktyrinės linijos žymi  $\pm 3$  k. bendrą tyrimų tikslumą (FOS: 2,34  $C_T$ ; IL1B: 1,93  $C_T$ ).

**A****B**

**9 pav. AT-PGR atkuriamumas tarp skirtingų rinkinio partijų.** Atliekant realiojo laiko AT-PGR, buvo naudojama 7 pav. aprašyto eksperimento metu išgryninta RNR. Santykiniai **[A]** FOS ir **[B]** IL1B transkripto lygiai buvo nustatyti realiojo laiko, dviguba AT-PGR, kaip vidinį standartą naudojant 18S rRNR. Visų mėginių reikšmės perkeltos į diagramą, 1 rinkinio partijos reikšmių atžvilgiu (10 donorų telkinių x 3 naudotojai x 4 pakartojimai = 120 kiekvieno geno duomenų rinkinių), su visų rodomų mėginių vidurkio (raudonos linijos) ir standartinio nuokrypio (juodos linijos) reikšmėmis. Punktyrinės linijos žymi  $\pm 3$  k. bendrą tyrimų tikslumą (FOS: 2,34  $C_T$ ; IL1B: 1,93  $C_T$ ).

2 lentelė. AT-PGR duomenų iš 8 ir 9 pav. suvestinė

Tyrimo sistema	FOS/18S rRNR tyrimas		IL1B/18S rRNR tyrimas	
Duomenų palyginimas	Vidurkis ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SD ( $\Delta\Delta C_T$ )	Vidurkis ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SD ( $\Delta\Delta C_T$ )
<b>Atkuriamumas tarp kiekvieno naudotojo ir visų partijų</b>				
Visi naudotojai, 1 partija–1 partija	0,00	0,00	0,00	0,00
Visi naudotojai, 1 partija–2 partija	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Visi naudotojai, 1 partija–3 partija	-0,21	0,52	0,11	0,71
<b>Atkuriamumas tarp kiekvieno naudotojo ir visų partijų</b>				
Visos partijos, A naudotojas– A naudotojas	0,00	0,00	0,00	0,00
Visos partijos, A naudotojas– B naudotojas	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Visos partijos, A naudotojas– C naudotojas	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Naudotojas: tyrimą atlikęs technikas.

Partija: tyrimo metu naudotos rinkinio partijos numeris.

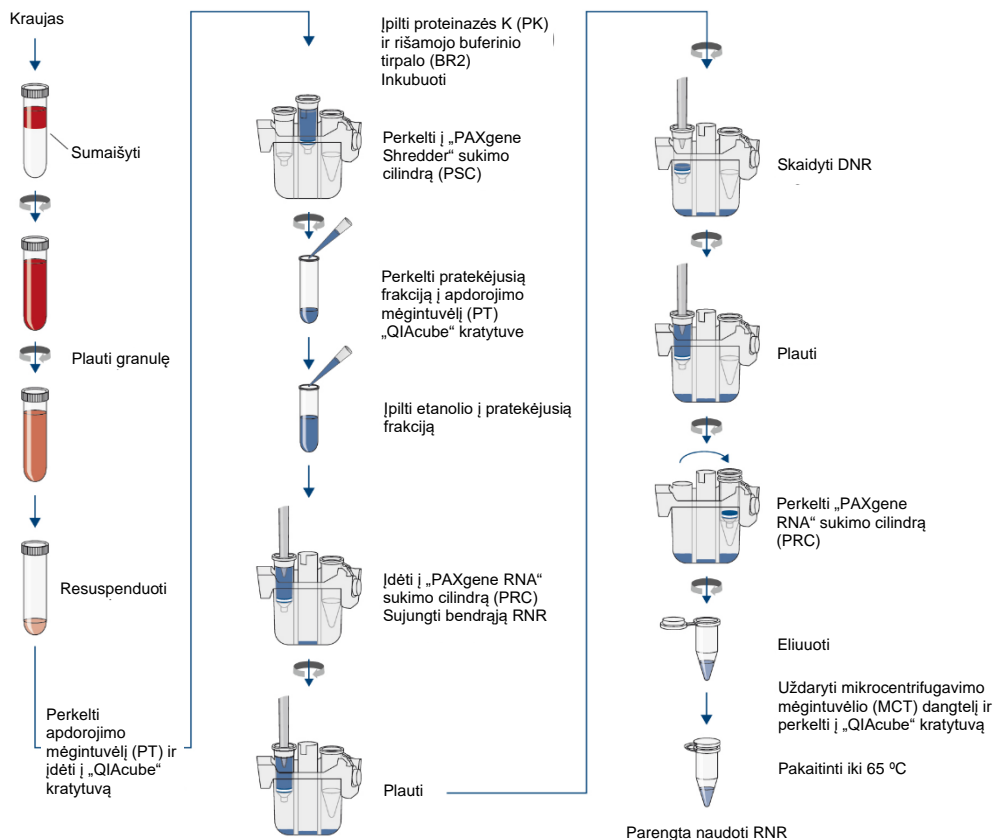
SD: standartinis nuokrypis.

Rodomas 8 ir 9 pav. pateiktų duomenų vidurkio  $\Delta\Delta C_T$  reikšmės (N = 120) ir standartinio nuokrypio reikšmės.

## Automatinis RNR gryninimas

Mėginio paruošimas automatizuojamas naudojant standartinį „QIAcube®“ instrumentą (kat. nr. 9001882 [110 V], kat. nr. 9001293 [230 V]; „QIAcube Connect“ neįtraukta) ir atliekant tokius pačius kaip ir rankinės procedūros veiksmus, todėl galite ir toliau naudoti „PAXgene Blood RNA Kit“ aukštos kokybės RNR išgryninti. Daugiau informacijos apie „QIAcube“ žr. „QIAcube“ naudotojo vadove (QIAcube User Manual) ir [www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube).

Automatizuotą RNR gryninimo protokolą sudaro 2 dalys (arba protokolai): „PAXgene Blood RNA Part A“ ir „PAXgene Blood RNA Part B“, tarp šių 2 dalių reikalingas trumpas rankinis įsikišimas (žr. 10 pav., 31 psl.).



# **10 pav. Automatinė „PAXgene Blood RNA“ procedūra.**

Centrifuguota, išplauta ir resuspenduota nukleorūgšties granulė (žr. „RNR koncentravimas ir gryninimas“ 20 psl.) perkeliama iš „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) į apdorojimo mėgintuvėlius (PT), kurie įdedami į termostatinį kratytuvą ant „QIAcube“ darbustalio. Operatorius meniu pasirenka ir paleidžia „PAXgene Blood RNA Part A“ protokolą. „QIAcube“ atlieka protokolo veiksmus iki RNR eliuavimo naudojant eliuavimo buferinį

tirpalą (BR5). Operatorius perkelia mikrocentrifugavimo mėgintuvėlius (MCT) su išgryninta RNR į „QIACube“ termostatinį kratytuvą. Operatorius meniu pasirenka ir paleidžia „PAXgene Blood RNA Part B“ protokolą ir „QIACube“ atliekamas denatūravimas karščiu.

Vidutinė mėginio paruošimo trukmė (remiantis 12 mėginių paruošimo duomenimis) yra 151 minutė\*, pastebimai mažiau praktinio darbo, palyginti su rankiniu protokolu.

≥95 % apdorotų mėginių RNR išeiga iš 2,5 ml sveiko žmogaus viso kraujo yra ≥3 µg. 11 pav. (33 psl.) nurodyta RNR išeigos iš viso iš 216 mėginių, kuriuos 3 operatoriai paruošė naudodami 3 rinkinių partijas ir automatizuotą protokolą. Šiuose tyrimuose buvo naudoti jungtiniai kraujo mėginiai, o ne atskiri „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT), todėl rezultatai neatspindi RNR išeigos, lauktos iš atskirų kraujo ėmimų atskirų mėginių. Išeiga labai priklauso nuo donoro, todėl atskiros išeigos gali skirtis (11 pav., 33 psl.) skirtis.

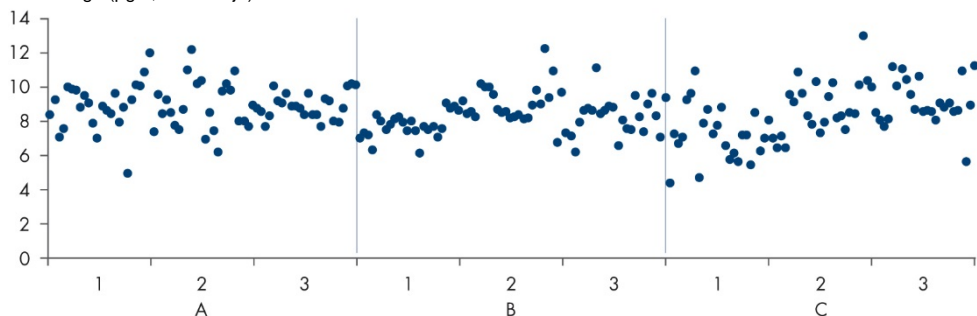
Mažiausiai 95 % mėginių nebuvo slopinimo AT-PGR, kai buvo naudojama iki 30 % eliuato. Naudojant automatizuotą protokolą, kryžminis užteršimas tarp mėginių neaptiktas, kai tame pačiame vykdyme buvo matuojama kiekybine, realiojo laiko AT-PGR ABL1 ir FOS transkriptų sekos RNR neigiamuose mėginiuose (vanduo) suporuotuose su RNR teigiamais mėginiais (žmogaus viso kraujo).

RNR išgryninta naudojant „PAXgene Blood RNA System“ ir automatizuotą protokolą, kaip rodo AT-PGR inhibicijos nebuvimas, yra gryna (žr. 11 pav., 33 psl.) ir  $A_{260}/A_{280}$  reikšmės yra nuo 1,8 iki 2,2. Genominės DNR yra ≤1 % (w/w) ≥95 % visų mėginių, kai matuojama naudojant beta-aktino geno sekos kiekybinę, realiojo laiko PGR. 12 ir 13 pav. (33 ir 34 psl.) pateiktos iš viso 216 mėginių, kuriuos paruošė 3 operatoriai naudodami automatizuotą protokolą su 3 rinkinių partijomis,  $A_{260}/A_{280}$  reikšmės ir santykinė genominė DNR.

\* Bendras protokolo vykdymo laikas, įskaitant „PAXgene Blood RNA Tubes“ paruošimą (centrifugavimus, granulės plovimą ir granulės resusensiją).

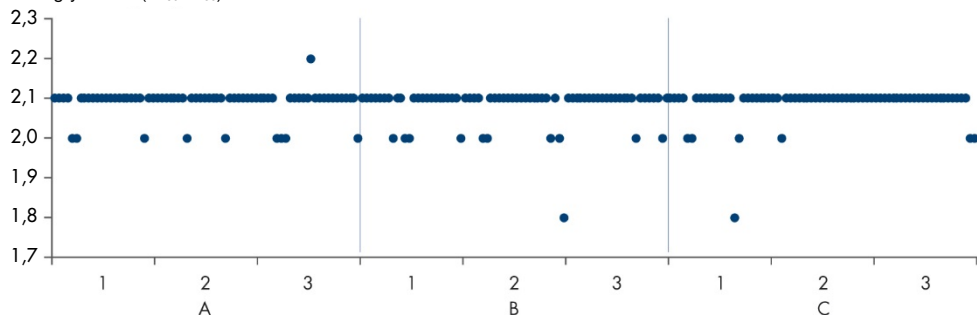


RNR išeiga ( $\mu\text{g}/2,5 \text{ ml kraujo}$ )

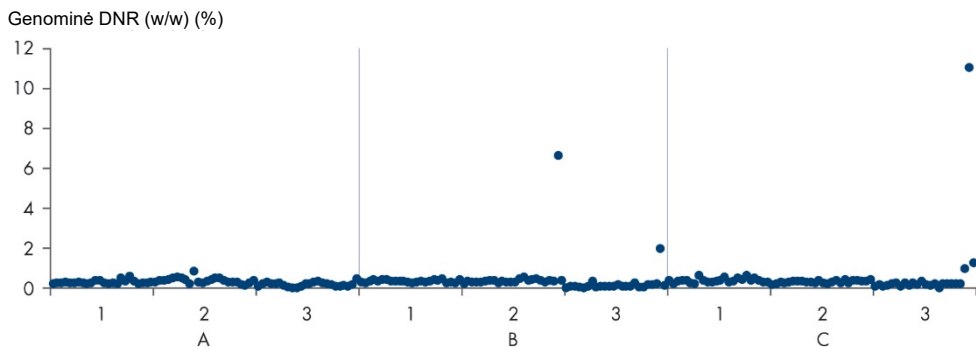


**11 pav. RNR išeiga – automatizuotas apdorojimas.** 36 skirtingų donorų kraujo mėginiai buvo paimti į „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT; 6 mėgintuvėlių vienam donorui, iš viso 216 mėgintuvėlių). 6 donorų mėgintuvėlių turinys buvo sujungtas ir po to iš naujo padalytas alikvotinėmis dalimis į 36 mėginius. Šiuos 6 donorų telkinio 36 mėginius apdorojo 3 skirtingi operatoriai (A, B, C). Kiekvienas operatorius automatizuotai ekstrakcijai naudojo 3 skirtingas „PAXgene Blood RNA Kit“ partijas (1, 2, 3) ir apdorojo kiekvieno iš 6 donorų telkinių keturis kartotinius mėginius. Visų atskirų mėginių RNR išeiga pateikta kaip kiekvieno operatoriaus ir partijos derinys.

RNR grynumas ( $A_{260}/A_{280}$ )

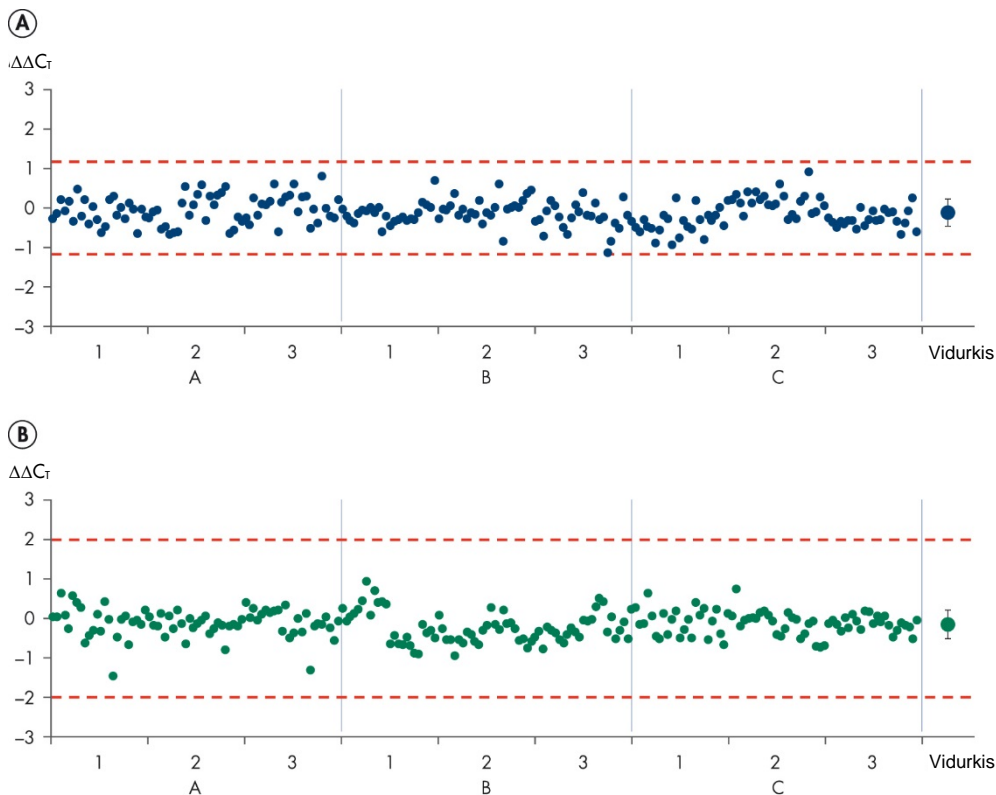


**12 pav. RNR grynumas ( $A_{260}/A_{280}$  reikšmės) – automatizuotas apdorojimas.** RNR išgrynino 3 skirtingi operatoriai (A, B, C), naudodami 3 skirtingas „PAXgene Blood RNA Kit“ partijas (1, 2, 3) 11 pav. aprašyto eksperimento metu. Visų atskirų mėginių  $A_{260}/A_{280}$  reikšmės pateiktos kaip kiekvieno operatoriaus ir partijos derinys.



**13 pav. RNR grynumas (genominės DNR užterštumo %) – automatizuotas apdorojimas.** RNR išgrynino 3 skirtingi operatoriai (A, B, C), naudodami 3 skirtingas „PAXgene Blood RNA Kit“ partijas (1, 2, 3) 11 pav. aprašyto eksperimento metu. Visų atskirų mėginių genominės DNR kiekiai (w/w) pateikti kaip kiekvieno operatoriaus ir partijos derinys.

Automatizuotas RNR gryninimo protokolas, naudojant „PAXgene Blood RNA System“, užtikrina gerai atkuriamus ir kartotinius AT-PGR rezultatus, kaip pavaizduota 14 pav.(35 psl.), todėl ypač patikima atliekant klinikinius diagnostinius tyrimus.



**14 pav. AT-PGR atkuriamumas tarp automatizuoto ir rankinio protokolų.** RNR išgrynino 3 skirtingi operatoriai (A, B, C), naudodami 3 skirtingas „PAXgene Blood RNA Kit“ partijas (1, 2, 3), naudodami automatizuotą protokolą 11 pav. aprašyto eksperimento metu. Lygiagrečiai, iš atitinkamų pakartojimų mėgintuvėlių, RNR buvo išgryninta naudojant rankinį protokolą. Santykiniai [A] FOS ir [B] IL1B transkripto lygiai buvo nustatyti realiojo laiko, dviguba AT-PGR, kaip vidinį standartą naudojant 18S rRNR. Galimi transkripto lygių skirtumai tarp RNR paruoštos iš suporuotų kraujo mėginių, naudojant ekstrakcijos protokolus (automatizuotą ir rankinį protokolus), buvo suskaičiuoti  $\Delta\Delta C_T$  metodu. Atskiros visų mėginių porų  $\Delta\Delta C_T$  reikšmės (4 pakartojimai x 6 donorų telkiniai x 3 rinkinių partijos x 3 operatoriai = 216 kiekvieno geno porų) perkeltos į diagramą kaip atskiri taškai su visų rodomų reikšmių vidurkio (dideli taškai) ir standartinio nuokrypio (juodi brūkšniai) reikšmėmis. Punktyrinės linijos žymi  $\pm 3$  k. bendrą tyrimų tikslumą (FOS: 1,16  $C_T$ ; IL1B: 1,98  $C_T$ ; skirtingas tyrimo tikslumas palyginti su 1–4, 8 ir 9 pav. dėl skirtingų tyrimo versijų).

# Įranga ir reagentai, tiekiami naudotojo

Dirbdami su cheminėmis medžiagomis visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalātą, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose saugos duomenų lapuose (safety data sheets, SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas.

## Visi protokolai

- „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT; kat. nr. 762165)
- Etanolis (96–100 %, p.a. švarumo klasė)
- Pipetės\* (10 µl–4 ml)
- Sterilūs pipetės antgaliai, su aerozolio barjeru, be RNazės†
- Graduotas cilindras‡
- Centrifuga\*, galinti pasiekti 3000–5000 x g, su kintamo kampo rotoriumi ir indeliais, skirtais laikyti „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT)
- Sūkurinis maišytuvas\*
- Skaldytas ledas
- Žymėti skirtas ilgalaikis rašiklis

## Rankinis protokolai

- Kintamo greičio mikrocentrifuga\*, galinti veikti bent 1000–8000 x g intervale, nors naudojama mažesnė ir didesnė g jėga (išsamią informaciją žr. protokolo veiksmuose), su rotoriumi, skirtu 2 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėliams

\* Užtikrinkite, kad visi instrumentai būtų reguliariai tikrinami, prižiūrimi ir kalibruojami pagal gamintojo rekomendacijas.

† Būtinai susipažinkite su RNR tvarkymo rekomendacijomis (A priedas, 64 psl.).

‡ Etanolui į BR4 buferinio tirpalo koncentratą įpilti.

- Inkubuojamas kratytuvas\*, galintis inkubuoti 55 °C ir 65 °C ir kratantis  $\geq 400$  aps./min., neviršijant 1400 aps./min. (pvz., „Eppendorf® Thermomixer Compact“ arba atitinkamas)

## **Automatizuotas protokolas**

- „QIAcube“\*\* (QIAGEN, kat. nr. 9001882 [110 V], kat. nr. 9001293 [230 V])
- Žirklys

„QIAcube“ laboratoriniai reikmenys

- „Filter-Tips, 1000  $\mu$ l“ (1024) (QIAGEN, kat. nr. 990352)<sup>†</sup>
- „Reagent Bottles, 30 ml“ (6) (QIAGEN, kat. nr. 990393)<sup>†</sup>
- „Rotor Adapters“ (10 x 24) (QIAGEN, kat. nr. 990394)<sup>†</sup>

„QIAcube“ priedai

- „Reagent Bottle Rack“ (QIAGEN, kat. nr. 990390)<sup>†</sup>
- „Rotor Adapter Holder“ (QIAGEN, kat. nr. 990392)<sup>†</sup>

\* Užtikrinkite, kad visi instrumentai būtų reguliariai tikrinami, prižiūrimi ir kalibruojami pagal gamintojo rekomendacijas.

<sup>†</sup> Taip pat pridodama prie „Starter Pack, QIAcube“ (QIAGEN, kat. nr. 990395)

# Svarbios pastabos

## „QIAcube“ naudojimas

Būtinai susipažinkite su „QIAcube“ naudojimu. Prieš pradėdami automatizuotus „PAXgene Blood RNA“ protokolus, perskaitykite „QIAcube“ *naudotojo vadovą* ir visą su „QIAcube“ pateiktą papildomą informaciją, ypatingą dėmesį atkreipdami į saugos informaciją.

## „QIAcube“ paleidimas

Uždarykite „QIAcube“ dureles ir įjunkite „QIAcube“ maitinimo jungikliu (žr. 15 pav., 39 psl.).

Pasigirsta pyptelėjimas ir įsijungia pradžios ekranas. Instrumentas automatiškai atlieka inicijavimo patikras.

## Protokolų diegimas „QIAcube“

Norint „QIAcube“ atlikti pirmąjį RNR paruošimo vykdymą, reikia įdiegti pradinį protokolą. Įdiekite ir „PAXgene Blood RNA Part A“, ir „PAXgene Blood RNA Part B“ protokolus.

Protokolai pateikti **[www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube)**, juos reikia atsisiųsti į USB atmintinę, pateiktą kartu su „QIAcube“, ir perkelti į „QIAcube“, naudojant USB prievadą.

Naudojant USB prievadą, esantį už apsauginio skydelio (žr. 15 pav., 39 psl.), USB atmintinę (pateikiamas su „QIAcube“) galima prijungti prie „QIAcube“. Duomenų failus, pvz., sistemos žurnalo failus arba ataskaitų failus, taip pat galima perkelti per USB prievadą iš „QIAcube“ į USB atmintinę.



USB prievadas skirtas naudoti tik su QIAGEN pateikta USB atmintine. Nejunkite prie šio prievado kitų prietaisų.



Neištraukite USB atmintinės, kai atsisiunčiami protokolai, perkeliama duomenų failai arba vykdomas protokolas.



15 pav. „QIAcube“ vaizdas iš priekio.

1

Jutiklinis ekranas

2

Durėlės

3

RS232 nuoseklusis prievadas už apsauginio skydelio (skirtas naudoti tik QIAGEN instrumento techninio aptarnavimo specialistams)

4

USB prievadas už apsauginio skydelio

5

Maitinimo jungiklis

6

Atliekų stalčius

## „QIAcube“ įkėlimas

Taupant laiką, įkelti galima vieno arba abiejų 10 minučių centrifugavimo žingsnių metu (3 ir 5 žingsniai), aprašytų „Protokolas: Automatizuotas bendros RNR gryninimas iš žmogaus viso kraujo, paimto į „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT)“, 56 psl.

### Reagentų buteliukai

Prieš kiekvieną „QIAcube“ vykdymą, kruopščiai užpildykite 4 reagentų buteliukus 3 lentelėje išvardytais reagentais iki maksimalaus lygio indikatoriaus arba, jei tai įmanoma, iki „PAXgene Blood RNA Kit“ pateiktų buferinių tirpalų leistino tūrio lygio. Aiškiai pažymėkite buferinių tirpalų pavadinimus ant buteliukų ir dangtelių, įdėkite užpildytus reagentų buteliukus į atitinkamas vietas reagentų buteliukų stovė. Įstatykite stovą į „QIAcube“ darbatalį, kaip pavaizduota (16 ir 17 pav., 41 ir 42 pav.).



Pateiktu buferinio tirpalo BR2 neužpildysite reagentų buteliuko iki lygio indikatoriaus. BR3 ir BR4 buferiniais tirpalais galite neužpildyti buteliuko iki lygio indikatoriaus, po to kai bus apdoroti keli mėginiai ankstesnių vykdymų metu.



Prieš įstatydami į darbatalį, būtinai nuimkite nuo buteliukų dangtelius.



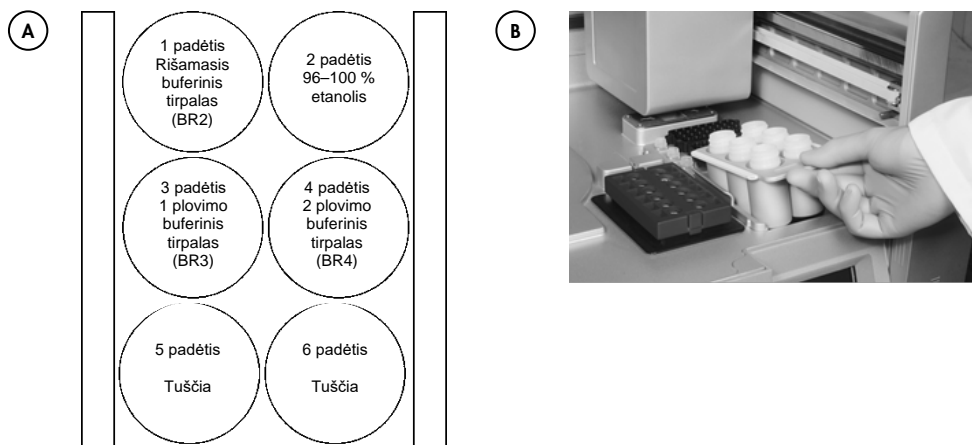
„PAXgene Blood RNA Kit“ (50) pateikiamų buferinių tirpalų tūrio pakanka daugiausiai 7 RNR paruošimo vykdymams „QIAcube“, kai vykdymo metu apdorojama 2–12 mėginių. Bendrai, norint apdoroti su rinkiniu iš viso 50 mėginių, daugiausia vykdant 7 RNR paruošimus, reikėtų vengti vykdyti mažiau mėginių. Vykiant daugiau nei 7 RNR paruošimus, gali pritrūkti buferinių tirpalų paskutiniams mėginiams apdoroti.



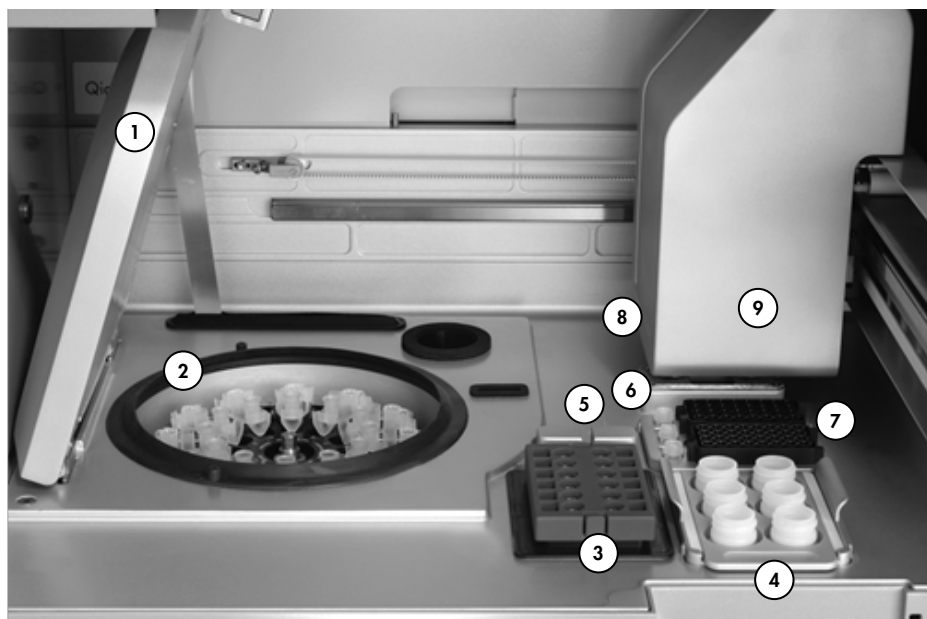
**3 lentelė. Padėtys reagentų buteliukų stovė**

Padėtis	Reagentas
1	Rišamasis buferinis tirpalas (BR2)
2	96–100 % etanolis
3	1 plovimo buferinis tirpalas (BR3)
4	2 plovimo buferinis tirpalas (BR4)*
5	– (palikite tuščią)
6	– (palikite tuščią)

\*2 plovimo buferinis tirpalas (BR4) teikiamas kaip koncentratas. Prieš naudodami pirmą kartą, įpilkite 4 dalis etanolio (96–100 %, p.a. švarumo klasės), kaip nurodyta ant buteliuko, kad gautumėte darbinį tirpalą.



**16 pav. Reagentų buteliukų įdėjimas į stovą. [A]** Buteliukų padėčių reagentų buteliukų stovė ir turinio schema. **[B]** Stovo įdėjimas į „QIAcube“.



17 pav. „QIAcube“ vaizdas viduje.

- |                             |   |
|-----------------------------|---|
| ① Centrifugos dangtelis     | ⑥ Mikrocentrifugavimo mėgintuvėlių lizdai |
| ② Centrifuga                | ⑦ Antgalių stoveliai                      |
| ③ Kratytuvas                | ⑧ Antgalių ir stulpelių išmetimo angos    |
| ④ Reagentų buteliukų stovas | ⑨ Roboto ranka                            |
| ⑤ Antgalio jutiklis         |   |

Sukimo cilindrai (PRC, PSC), mikrocentrifugavimo mėgintuvėliai (MCT) ir „QIAcube“ plastikinės priemonės

Uždėkite 2 antgalių stovelius, užpildytus filtrų antgaliais (1000 µl), į „QIAcube“ (žr. 17 pav., 42 psl.). Jei reikia, papildykite stovelius.



Naudokite tik 1000 µl filtrų antgalius, skirtus naudoti „QIAcube“.

Pažymėkite kiekvieno mėginio rotoriaus adapterius ir mikrocentrifugavimo mėgintuvėlius (MCT) ilgalaikiu rašikliu. Atidarykite „PAXgene Shredder“ sukimo cilindrų (PSC), kuriuos naudosite, ir žirkėmis visiškai nukirpkite jų dangtelius (žr. 18 pav., 44 psl.).



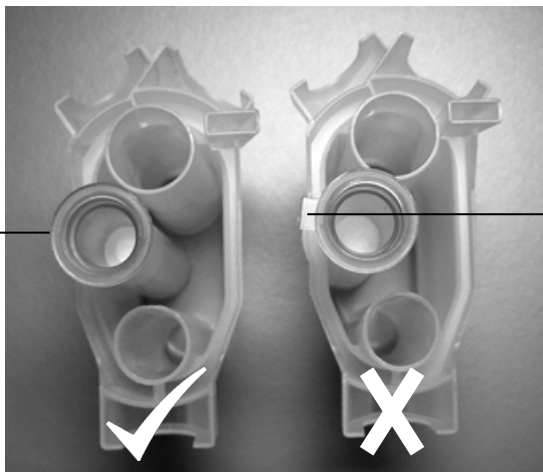
Kad „QIAcube“ robotizuotas griebtuvas tinkamai veiktų, visiškai nuimkite (nupjaukite) dangtelius ir visas plastikines dalis, jungiančias dangtelį su „PAXgene Shredder“ sukimo cilindrais (PSC; žr. 16 pav.). Kitu atveju, robotizuotas griebtuvas gali tinkamai nepagriebti sukimo cilindro (PSC, PRC).

Įdėkite „PAXgene RNA“ sukimo cilindrą (PRC), „PAXgene Shredder“ sukimo cilindrą (PSC, be dangtelio) ir pažymėtą mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį (MCT) į atitinkamas vietas kiekvieno pažymėto rotoriaus adapteryje, kaip pavaizduota 4 lentelėje ir 19 pav. (44 psl.).



Įsitikinkite, kad sukimo cilindro (PRC) ir mikrocentrifugavimo mėgintuvėlio (MCT) dangteliai yra nustumti rotoriaus adapterio krašte visiškai į lizdų dugną, priešingu atveju centrifuguojant dangteliai sulūš.

Tinkamai  
nuimtas  
cilindro  
dangtelis



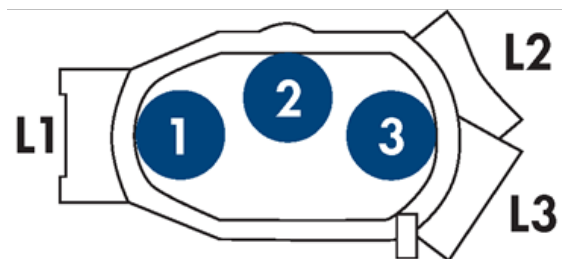
Netinkamai  
nuimtas  
cilindro  
dangtelis;  
nepašalinta  
dalis  
dangtelio

**18 pav. „PAXgene Shredder“ sukimo cilindro (PSC) įdėjimas.** „PAXgene Shredder“ sukimo cilindras (PSC) dedamas į vidurinę rotoriaus adapterio vietą. Prieš dėdami cilindrą (PSC), dangtelį nukirpkite.

#### 4 lentelė. Laboratorinės priemonės rotoriaus adapteryje

Padėtis	Reagentas	Dangtelio padėtis
1	„PAXgene RNA“ sukimo cilindras (raudonas, PRC)	L1
2	„PAXgene Shredder“ sukimo cilindras (alyvų spalvos, PSC) (prieš dėdami į rotoriaus adapterį, dangtelį nukirpkite)	–
3	Mikrocentrifugavimo mėgintuvėlis (MCT)*	L3

\* Naudokite „PAXgene Blood RNA Kit“ pateiktus mikrocentrifugavimo mėgintuvėlius (1,5 ml).



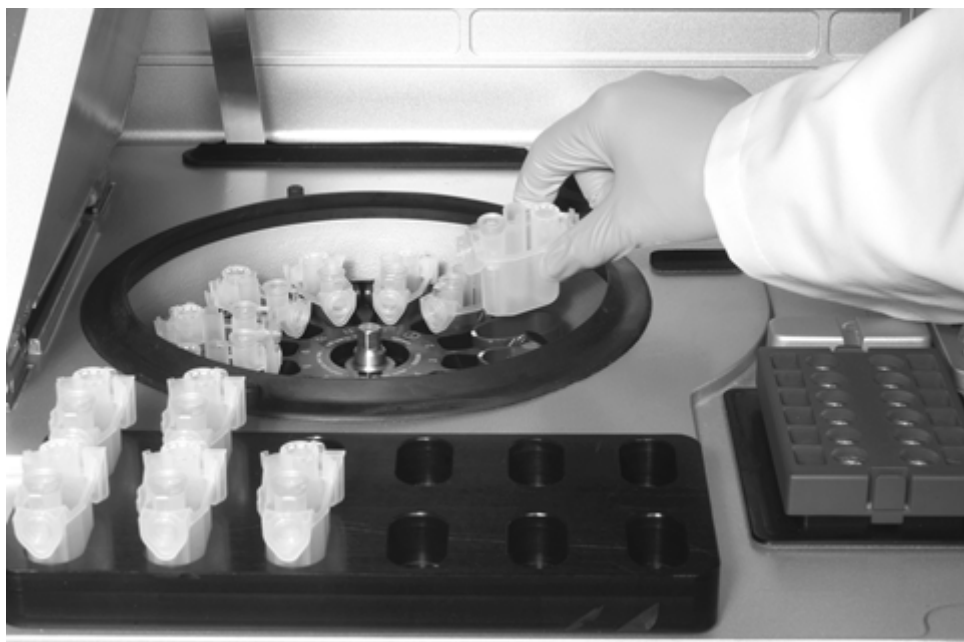
**19 pav. Vietos rotoriaus adapteryje.** Rotoriaus adapteryje yra trys mėgintuvėlių vietos (1–3) ir trys dangtelių vietos (L1–L3).

## Centrifugos užpildymas

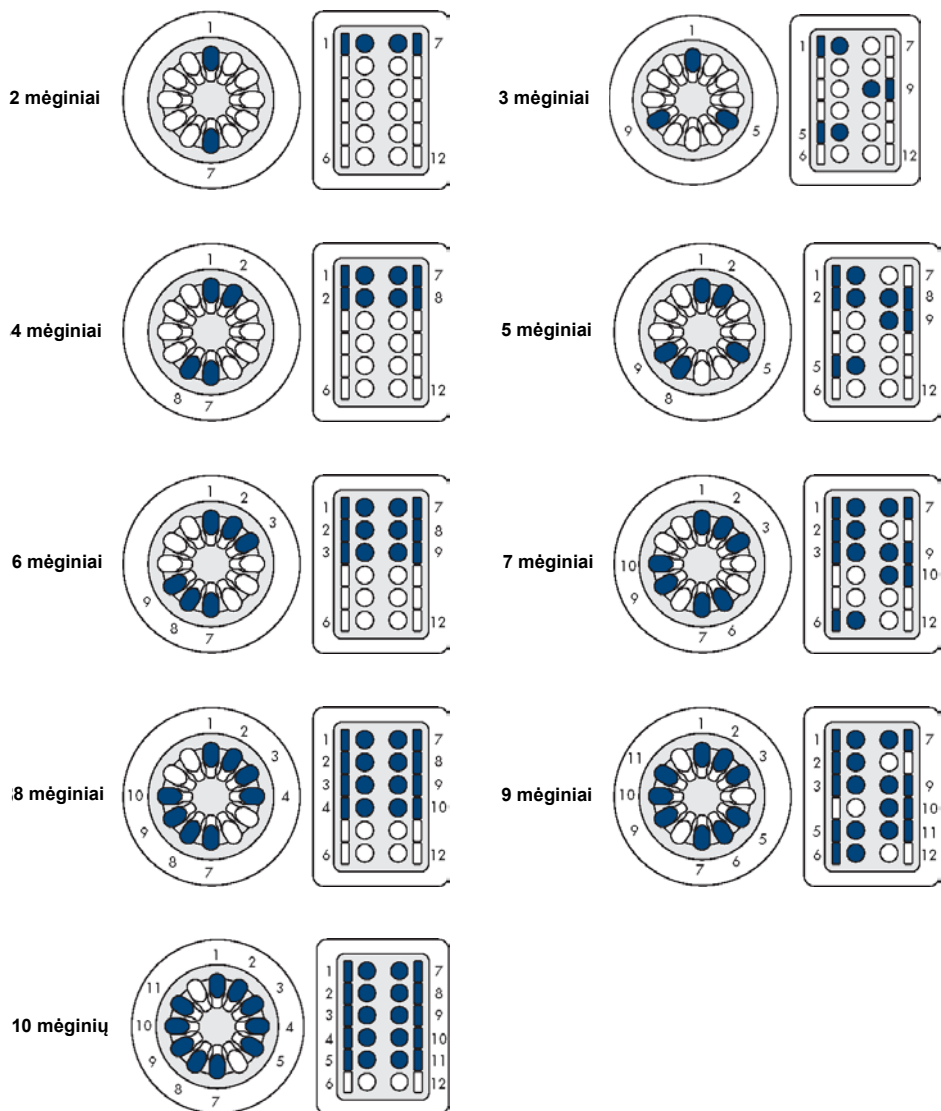
Įstatykite surinktus rotoriaus adapterius į centrifugavimo indelius, kaip pavaizduota 20 pav. toliau.



Jeigu apdorojama mažiau nei 12 mėginių, būtinai užpildykite centrifugos rotorių išlaikydami spindulinę simetriją (žr. 21 pav., 46 psl.). Visus centrifugavimo indelius reikia pritvirtinti prieš pradedant vykdyti protokolą, net jei bus apdorojama mažiau nei 12 mėginių. Negalima apdoroti atskiro (vieno) mėginio arba 11 mėginių.



**20 pav. Centrifugos užpildymas.** Įstatykite surinktus rotoriaus adapterius į centrifugavimo indelius.



**21 pav. Centrifugos ir kratytuvo užpildymas.** Vietos centrifugoje ir kratytuve pavaizduotos apdorojant nuo dviejų (2 mėginiai) iki dešimties (10 mėginių) mėginių. Negalima apdoroti vieno mėginio arba 11 mėginių.

## Apdorojimo mėgintuvėliai (PT)

Išimkite po ankstesnių vykdymų mikrocentrifugavimo mėgintuvėlių lizduose likusius apdorojimo mėgintuvėlius (PT) (žr. 17 pav., 42 psl.). Užpildykite 3 apdorojimo mėgintuvėlius (PT) 5 lentelėje nurodytais reagentų kiekiais, atsižvelgdami į vykdomų mėginių skaičių.

Norėdami paruošti DNazės I inkubavimo mišinį, perkelkite su pipete nurodytą tūrį DNR skaidymo buferinio tirpalo (RDD) į apdorojimo mėgintuvėlį (PT) ir įpilkite nurodytą tūrį DNazės I (RNFD) bazinio tirpalo. Švelniai išmaišykite visą mišinį pipete 3 kartus ištraukdami ir išleisdami, naudodami 1000 µl pipetės antgalį.

Naudokite „PAXgene Blood RNA Kit“ pateiktus 2 ml apdorojimo mėgintuvėlius (PT). Aiškiai pažymėkite reagentų pavadinimus ant mėgintuvėlių (PT) ir įdėkite juos į atitinkamą vietą mikrocentrifugavimo mėgintuvėlių lizduose, kaip nurodyta 6 lentelėje (48 psl.).



DNazė I (RNFD) ypač jautri fizinei denatūracijai. Maišykite tik pipete, naudodami pipečių antgalius plačiomis angomis, kad sumažintumėte fizinį poveikį. Nemašykite sūkuriniu maišytuvu.



Perkelkite pipete tik reikiamą kiekį, nurodytą 5 lentelėje.

**5 lentelė. Reagentų tūriai, reikalingai apdorojimo mėgintuvėliuose mikrocentrifugavimo mėgintuvėlių lizduose.**

Mėginių skaičius	Reagento tūris nurodytam mėginių skaičiui (µl)		
	Proteinazė K (PK)	DNazės I inkubavimo mišinys	Eliuavimo buferinis tirpalas (BR5)
2	126	187 (23 DNazės I + 164 „Buffer RDD“)	313
3	170	261 (33 DNazės I + 228 „Buffer RDD“)	399
4	213	334 (42 DNazės I + 292 „Buffer RDD“)	486
5	256	407 (51 DNazės I + 356 „Buffer RDD“)	572
6	299	481 (60 DNazės I + 421 „Buffer RDD“)	658
7	342	554 (69 DNazės I + 485 „Buffer RDD“)	745
8	386	627 (78 DNazės I + 549 „Buffer RDD“)	831
9	429	701 (88 DNazės I + 613 „Buffer RDD“)	918
10	472	775 (97 DNazės I + 678 „Buffer RDD“)	1004
12	558	921 (115 DNazės I + 806 „Buffer RDD“)	1177

6 lentelė. Mikrocentrifugavimo mėgintuvėlių lizdai

	Padėtis		
	A	B	C
<b>Turinys</b>	Proteinazė K (PK)	DNazės I inkubavimo mišinys	Eliuavimo buferinis tirpalas (BR5)
<b>Indas</b>	Apdorojimo mėgintuvėlis (PT)*	Apdorojimo mėgintuvėlis (PT)*	Apdorojimo mėgintuvėlis (PT)*

\* Naudokite „PAXgene Blood RNA Kit“ pateiktus 2 ml apdorojimo mėgintuvėlius (PT).



# Protokolas: Rankinis bendros RNR gryninimas iš žmogaus viso kraujo, paimto į „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT)

## Svarbi informacija prieš pradedant

- Įsitikinkite, kad rinkinio dėžutė nepaliesta ir nepažeista, o buferiniai tirpalai nepratekėję. Nenaudokite pažeisto rinkinio.
- Naudodami pipetę, įsitikinkite, kad nustatytas tinkamas tūris ir kruopščiai ir visiškai įtraukiamas ir išpilamas visas skystis.
- Norėdami išvengti mėginio perkėlimo ne į reikiamą mėgintuvėlį arba sukimo cilindą, būtinai tinkamai pažymėkite visus mėgintuvėlius ir sukimo cilindrus ilgalaikiu rašikliu. Pažymėkite kiekvieno mėgintuvėlio dangtelį ir korpusą (PT, MCT). Pažymėkite sukimo cilindro korpusą, jei tai apdorojimo mėgintuvėlis (PT). Perkėlę skystį į mėgintuvėlį arba sukimo cilindą, uždarykite jį.
- Dėl procedūros metu išsiliejusio mėginio ir buferinių tirpalų gali sumažėti RNR išeiga ir grynumas.
- Jei nenurodyta kitaip, visus šio protokolo žingsnius, įskaitant centrifugavimo žingsnius, reikia atlikti kambario temperatūroje (15–25 °C).

Dėl nukleorūgščių amplifikavimo technologijų jautrumo, siekiant išvengti kryžminės taršos, tvarkant mėginius reikia taikyti šias atsargumo priemones:

- Atsargiai pipete perkelti mėginį į sukimo cilindą (PRC, PSC) nešlapindami cilindro krašto.
- Perkeldami skirtingus skysčius, visuomet keiskite pipetės antgalius. Naudokite pipetės antgalius su aerosolio barjeru.
- Stenkitės neliesti sukimo cilindro (PRC, PSC) membranos pipetės antgaliu.

- Išmaišę sūkuriniu maišytuvu arba pakaitinę mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį (MCT), trumpai centrifuguokite jį, kad pašalintumėte lašelius nuo vidinio dangtelio paviršiaus.
- Visos procedūros metu mūvėkite pirštines. Mėginio kontakto su pirštinėmis atveju, nedelsdami pasikeiskite pirštines.
- Prieš dėdami sukimo cilindrą (PRC, PSC) į mikrocentrifugą, uždenkite jį. Centrifuga aprašyta procedūroje.
- Vienu metu atidarykite tik vieną sukimo cilindrą (PRC, PSC) ir stenkitės, kad nesusidarytų aerozoliai.
- Jei norite efektyviai vienu metu apdoroti kelis mėginius, užpildykite stovą apdorojimo mėgintuvėliais (PT), į kuriuos po centrifugavimo bus galim perkelti sukimo cilindrų (PRC, PSC). Išmeskite panaudotus apdorojimo mėgintuvėlius (PT) su pratekėjusia frakcija ir įdėkite naujus apdorojimo mėgintuvėlius (PT) su sukimo cilindrais (PRC, PSC) tiesiai į mikrocentrifugą.

#### Prieš pradėdami atliekami veiksmai

- Kraują reikia paimti į „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT), laikantis „PAXgene Blood RNA Tube“ vadove pateiktų instrukcijų. Jei reikia, žr. „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) tvarkymo rekomendacijas žr. C priede (67 psl.).
- Užtikrinkite, kad paėmus kraują „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) būtų inkubuojami bent 2 valandas kambario temperatūroje, siekiant užtikrinti visišką kraujo ląstelių lizę. „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) inkubavimas per naktį gali padidinti išėigą. Jeigu paėmus kraują „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) buvo laikomas 2–8 °C, –20 °C arba –70 °C, pirmiausia leiskite pasiekti kambario temperatūrą, o tada prieš pradėdami procedūrą palaikykite kambario temperatūroje 2 valandas.
- Perskaitykite saugos informaciją 10 psl.
- Perskaitykite RNR tvarkymo rekomendacijas (A priedas, 65 psl.).
- Užtikrinkite, kad visi instrumentai, pvz., pipetės ir inkubuojantis kratytuvas, būtų reguliariai tikrinami ir kalibruojami pagal gamintojo rekomendacijas.

- Inkubuojantis kratytuvas reikalingas 5 ir 20 žingsniuose. Nustatykite inkubuojančio kratytuvo temperatūrą 55 °C.
- Rišamajame buferiniame tirpale (BR2) laikant gali susidaryti nuosėdos. Jei reikia, pašildykite iki 37 °C, kad ištirptų.
- 2 plovimo buferinis tirpalas (BR4) teikiamas kaip koncentratas. Prieš naudodami pirmą kartą, įpilkite 4 dalis etanolio (96–100 %, p.a. švarumo klasės), kaip nurodyta ant buteliuko, kad gautumėte darbinį tirpalą.
- Jei naudojate „RNase-Free DNase Set“ pirmą kartą, paruoškite DNazės I bazinį tirpalą. Ištirpinkite gryną DNazę I (RNFD; 1500 Kunitz vienetų)\* rinkinyje pateiktame 550 µl DNazės resusensijos buferiniame tirpale (DRB). Elkitės atsargiai, kad nė kiek neprarastumėte DNazės I (RNFD) atidarydami indelį. Nemaišykite atkurto DNazės I (RNFD) sukuriniu maišytuvu. DNazė I ypač jautri fizinei denatūracijai. Maišyti reikia tik švelniai apverčiant mėgintuvėlį.
- Turimi duomenys rodo, kad atkurtą DNazę I (RNFD) galima laikyti 2–8 °C 6 savaites. Jei DNazę I (RNFD) norite laikyti ilgiau, ištraukite bazinį tirpalą iš stiklinio indelio, padalykite į per vieną kartą sunaudojamas alikvotines dalis (naudokite rinkinyje pateiktus 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlius [MCT]; jų užtenka 5 alikvotinėms dalims) ir laikykite –20 °C ne ilgiau nei 9 mėnesius. Atitirpintas alikvotines dalis galima laikyti 2–8 °C ne ilgiau nei 6 savaites. Atitirpinę, alikvotinių dalių neužšaldykite pakartotinai.
- Atkurdami ir dalydami DNazę I (RNFD) į alikvotines dalis, laikykitės RNR tvarkymo rekomendacijų (A priedas, 65 psl.).

\* Kunitz vienetai – dažniausiai naudojami vienetai matuojant I DNazę, apibrėžiami kaip DNazės I kiekis, dėl kurio  $A_{260}$  padidėja 0,001 per minutę mililitre, esant 25 °C, pH 5,0, kaip substratą naudojant stipriai polimerizuotą DNR (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 and 363).

## Procedūra

1. Centrifuguokite „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) 10 minučių 3000–5000 x g, naudodami kintamojo kampo rotorį.



Siekiant užtikrinti visą kraujo ląstelių lizę, inkubuokite kraujo mėginį „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) mažiausiai 2 valandas kambario temperatūroje (15–25 °C).



Rotoriuje turi būti apvaliadugnių mėgintuvėlių adapteriai. Naudojant kito tipo mėgintuvėlių adapterius, centrifuguojant mėgintuvėliai gali sudūžti.

2. Pašalinkite supernatantą nupildami arba pipete. Įpilkite į mėgintuvėlį su granule 4 ml vandens be RNazės (RNFV) ir mėgintuvėlį uždarykite šviežiu antriniu „BD Hemogard“ dangteliu (pateikiamu rinkinyje).

Jeigu supernatantą nupilate, elkitės atsargiai, kad nesudrumstumėte granulės, ir nusauskite mėgintuvėlio kraštą švariu popieriniu rankšluosčiu.

3. Maišykite sūkuriniu maišytuvu, kol granulė aiškiai ištirps, ir centrifuguokite 10 minučių 3000–5000 x g, naudodami kintamojo kampo rotorį. Pašalinkite ir išmeskite visą supernatantą.

Smulkios atliekos likusios supernatante išmaišius jį sūkuriniu maišytuvu, bet prieš centrifuguojant, neturės įtakos procedūrai.



Pašalinus ne visą supernatantą, bus slopinama lizė ir praskiestas lizatas, dėl to pasikeis RNR surišimo su „PAXgene“ membrana sąlygos.

4. Įpilkite 350 µl resuspensijos buferinio tirpalo (BR1) ir maišykite sūkuriniu maišytuvu, kol granulė aiškiai ištirps.
5. Pipete perkeltite mėginį į 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį (MCT). Įpilkite 300 µl rišamojo buferinio tirpalo (BR2) ir 40 µl proteinazės K (PK). Pamašykite sūkuriniu maišytuvu 5 sekundes ir inkubuokite 10 minučių 55 °C, naudodami inkubuojantį kratytuvą 400–1400 aps./min. Baigę inkubuoti, nustatykite inkubuojančio kratytuvo temperatūrą 65 °C (20 žingsnis).



Nemaišykite rišamojo buferinio tirpalo (BR2) ir proteinazės K (PK) prieš įpildami į mėginį.

6. Pipete perkelkite lizatą tiesiai į „PAXgene Shredder“ sukimo cilindrą (PSC; alyvų spalvos), įdėtą į 2 ml apdorojimo mėgintuvėlį (PT), ir centrifuguokite 3 minutes didžiausiu greičiu (bet neviršykite 20 000 x g).



Atsargiai perkelkite pipete lizatą į sukimo cilindrą (PSC) ir pažiūrėkite, ar lizatas visiškai perkeltas į sukimo cilindrą (PSC).

Neviršykite 20,000 x g, kad nepažeistumėte cilindrų (PSC) ir mėgintuvėlių (PT).



Kai kurie mėginiai gali pratekėti per „PAXgene Shredder“ sukimo cilindrą (PSC) necentrifuguojant. Taip gali būti dėl mažo kai kurių mėginių klampumo ir tai nėra netinkamo produkto indikacija.

7. Atsargiai perkelkite visą pratekėjusios frakcijos supernatantą į 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį (MCT), nedrumsdami granulės apdorojimo mėgintuvėlyje.
8. Įpilkite 350 µl etanolio (96–100 %, p.a. švarumo klasė). Sumaišykite sukuriniu maišytuvu ir trumpai centrifuguokite (1–2 sekundes 500–1000 x g), kad pašalintumėte lašelius nuo vidinio dangtelio paviršiaus.



Nereikėtų centrifuguoti ilgiau nei 1–2 sekundes, nes gali pradėti granuluotis nukleorūgštys ir bendrosios RNR išeiga bus mažesnė.

9. Pipete perkelkite 700 µl mėginio į „PAXgene RNA“ sukimo cilindrą (PRC; raudonas), įdėtą į 2 ml apdorojimo mėgintuvėlį (PT), ir centrifuguokite 1 minutę 8000–20 000 x g. Įdėkite sukimo cilindrą (PRC) į naują 2 ml apdorojimo mėgintuvėlį (PT) ir išmeskite seną apdorojimo mėgintuvėlį (PT) su pratekėjusia frakcija.
10. Pipete perkelkite likusį mėginį į „PAXgene RNA“ sukimo cilindrą (PRC) ir centrifuguokite 1 minutę 8000–20 000 x g. Įdėkite sukimo cilindrą (PRC) į naują 2 ml apdorojimo mėgintuvėlį (PT) ir išmeskite seną apdorojimo mėgintuvėlį (PT) su pratekėjusia frakcija.



Atsargiai pipete perkelkite mėginį į sukimo cilindrą (PRC) ir pažiūrėkite, ar mėginys visiškai perkeltas į sukimo cilindrą (PRC).

11. Pipete perkelkite 350 µl 1 plovimo buferinio tirpalo (BR3) į „PAXgene RNA“ sukimo cilindrą (PRC). Centrifuguokite 1 minutę 8000–20 000 x g. Įdėkite sukimo cilindrą (PRC) į naują 2 ml apdorojimo mėgintuvėlį (PT) ir išmeskite seną apdorojimo mėgintuvėlį (PT) su pratekėjusia frakcija.

12. Įpilkite 10 µl DNazės I (RNFD) bazinio tirpalo į 70 µl DNR skaidymo buferinį tirpalą (RDD) 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlyje (MCT). Išmaišykite švelniai plekšnodami mėgintuvėlį ir trumpai centrifuguokite, kad surinktumėte likusį skystį nuo mėgintuvėlio sienelių.

Pavyzdžiui, jei apdorojate 10 mėginių, įpilkite 100 µl DNazės I (RNFD) bazinio tirpalo į 700 µl DNR skaidymo buferinį tirpalą (RDD). Naudokite rinkinyje pateiktus 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlius (MCT).



DNazė I ypač jautri fizinei denatūracijai. Maišyti reikia tik švelniai tapšnojanč mėgintuvėlį. Nemaišykite sūkuriniu maišytuvu.

13. Pipete perkelti DNazės I (RNFD) inkubavimo mišinį (80 µl) tiesiai ant „PAXgene RNA“ sukimo cilindą (PRC) membranos ir padėkite ant darbaltalio (20–30°C) 15 minučių.



Įsitikinkite, kad DNazės I (RNFD) inkubavimo mišinys perkeltas tiesiai ant membranos. Bus suskaityta ne visa DNazė, jei dalis mišinio bus perkelta ir liks ant sukimo cilindro (PRC) sienelių arba žiedinio tarpiklio.

14. Pipete perkelti 350 µl 1 plovimo buferinio tirpalo (BR3) į „PAXgene RNA“ sukimo cilindą (PRC) ir centrifuguokite 1 minutę 8000–20 000 x g. Įdėkite sukimo cilindą (PRC) į naują 2 ml apdorojimo mėgintuvėlį (PT) ir išmeskite seną apdorojimo mėgintuvėlį (PT) su pratekėjusia frakcija.

15. Pipete perkelti 500 µl 2 plovimo buferinio tirpalo (BR4) į „PAXgene RNA“ sukimo cilindą (PRC) ir centrifuguokite 1 minutę 8000–20 000 x g. Įdėkite sukimo cilindą (PRC) į naują 2 ml apdorojimo mėgintuvėlį (PT) ir išmeskite seną apdorojimo mėgintuvėlį (PT) su pratekėjusia frakcija.



2 plovimo buferinis tirpalas (BR4) teikiamas kaip koncentratas. Prieš naudodami būtinai į 2 plovimo buferinį tirpalą (BR4) įpilkite etanolio (žr. „Prieš pradedant atliekami veiksmai“ 50 psl.).

16. Įpilkite dar 500 µl 2 plovimo buferinio tirpalo (BR4) į „PAXgene RNA“ sukimo cilindą (PRC). Centrifuguokite 3 minutes 8000–20 000 x g.

17. Išmeskite apdorojimo mėgintuvėlį (PT) su pratekėjusia frakcija ir įdėkite „PAXgene RNA“ sukimo cilindą (PRC) į naują 2 ml apdorojimo mėgintuvėlį (PT). Centrifuguokite 1 minutę 8000–20 000 x g.

18. Išmeskite apdorojimo mėgintuvėlį (PT) su pratekėjusia frakcija. Įdėkite „PAXgene RNA“ sukimo cilindą (PRC) į 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį (MCT) ir pipete perkelkite 40 µl eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) tiesiai ant „PAXgene RNA“ sukimo cilindro (PRC) membranos. Centrifuguokite 1 minutę 8000–20 000 x g, kad eliuotumėte.

Norint pasiekti didžiausią eliuavimo efektyvumą, svarbu eliuavimo buferiniu tirpalu (BR5) sudrėkinti visą membraną.

19. Kartokite eliuavimo žingsnį (18 žingsnis) kaip aprašyta, naudodami 40 µl eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) ir tą patį mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį (MCT).

20. Inkubuokite eluatą 5 minutes 65 °C inkubuojamame kratytuve (nuo 5 žingsnio) nekratydami. Baigę inkubuoti, nedelsdami atvėsinkite ant ledo.

Šio inkubavimo 65 °C temperatūroje metu paskesniai panaudojimui denatūruojama RNR. Neviršykite inkubavimo trukmės ir temperatūros.

21. Jeigu RNR mėginiai nebus naudojami iš karto, laikykite –20 °C arba –70 °C temperatūroje.

Pakartotinai užšaldžius ir atitirpinus RNR lieka denatūruota, todėl nebūtina kartoti inkubavimo 65 °C temperatūroje. Jei naudojate RNR mėginius diagnostiniam tyrimui, vykdykite gamintojo pateiktas instrukcijas.

Norint tiksliai kiekybiškai įvertinti RNR pagal absorbciją ties 260 nm, rekomenduojame praskiesti mėginius 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. \* Skiedžiant mėginį vandeniu be RNazės, galima gauti neteisingai mažas reikšmes.

Nustatykite spektrofotometro nulio reikšmę, naudodami tuščią mėginį su tokia pačia dalimi, kaip ir matuojamuose mėginiuose, eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) ir Tris-HCl buferinio tirpalo. Jei netinkamai nustatyta spektrofotometro nulio reikšmė, dėl didelės eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) absorbcijos ties 220 nm gali būti aukštas foninis absorbcijos lygis.

**Pastaba.** Norėdami kiekybiškai įvertinti Tris-HCl buferiniame tirpale, naudokite šį sąryšį

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$ . Žr. B priedą 66 psl.

\* Dirbdami su cheminėmis medžiagomis visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalātą, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose saugos duomenų lapuose (safety data sheets, SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas.

# Protokolas: Automatizuotas bendros RNR gryninimas iš žmogaus viso kraujo, paimto į „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT)

## Svarbi informacija prieš pradedant

- Įsitikinkite, kad rinkinio dėžutė nepaliesta ir nepažeista, o buferiniai tirpalai nepratekėję. Nenaudokite pažeisto rinkinio.
- Naudodami pipetę, įsitikinkite, kad nustatytas tinkamas tūris ir kruopščiai ir visiškai įtraukiamas ir išpilamas visas skystis.
- Kad apsisaugotumėte nuo mėginio perkėlimo į netinkamą mėgintuvėlį arba plastikines laboratorines priemones, būtinai tinkamai pažymėkite visus apdorojimo mėgintuvėlius (PT), mikrocentrifugavimo mėgintuvėlius (MCT) ir rotoriaus adapterius ilgalaikiu rašikliu. Pažymėkite kiekvieno mikrocentrifugavimo mėgintuvėlio (MCT) dangtelį ir korpusą, kiekvieno apdorojimo mėgintuvėlio (PT) korpusą ir kiekvieno rotoriaus adapterio išorinę sienelę.
- Dėl procedūros metu išsiliejusio mėginio ir buferinių tirpalų gali sumažėti RNR išeiga ir grynumas.
- Jei nenurodyta kitaip, visus šio protokolo žingsnius, įskaitant centrifugavimo žingsnius, reikia atlikti kambario temperatūroje (15–25 °C).

Dėl nukleorūgščių amplifikavimo technologijų jautrumo, siekiant išvengti kryžminės taršos, tvarkant mėginius reikia taikyti šias atsargumo priemones:

- Pipete atsargiai perkeltkite mėginį į apdorojimo mėgintuvėlio (PT) dugną, nešlapindami mėgintuvėlio krašto.
- Perkeldami skirtingus skysčius, visuomet keiskite pipetės antgalius. Naudokite pipetės antgalius su aerozolio barjeru.



- Stenkitės neliesti sukimo cilindro (PRC, PSC) membranos pipetės antgaliu.
- Išmaišę sūkuriniu maišytuvu arba pakaitinę mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį (MCT), trumpai centrifuguokite jį, kad pašalintumėte lašelius nuo vidinio dangtelio paviršiaus.
- Visos procedūros metu mūvėkite pirštines. Mėginio kontakto su pirštinėmis atveju, nedelsdami pasikeiskite pirštines.




### Prieš pradėdant atliekami veiksmai

- Kraują reikia paimti į „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT), laikantis „PAXgene Blood RNA Tube“ vadove pateiktų instrukcijų. Jei reikia, žr. „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) tvarkymo rekomendacijas žr. C priede (67 psl.).
- Užtikrinkite, kad paėmus kraują „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) būtų inkubuojami bent 2 valandas kambario temperatūroje, siekiant užtikrinti visišką kraujo ląstelių lizę. „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) inkubavimas per naktį gali padidinti išeigą. Jeigu paėmus kraują „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) buvo laikomas 2–8 °C, –20 °C arba –70 °C, pirmiausia leiskite pasiekti kambario temperatūrą, o tada prieš pradėdami procedūrą palaikykite kambario temperatūroje 2 valandas.
- Perskaitykite saugos informaciją 10 psl.
- Perskaitykite skyrių „Svarbios pastabos“ 38 psl.
- Perskaitykite RNR tvarkymo rekomendacijas (A priedas, 65 psl.).
- Perskaitykite „QIAcube“ naudotojo vadovą ir visą su „QIAcube“ pateiktą papildomą informaciją, ypatingą dėmesį atkreipdami į saugos informaciją.
- Užtikrinkite, kad visi instrumentai, pvz., pipetės ir „QIAcube“, būtų reguliariai tikrinami ir kalibruojami pagal gamintojo rekomendacijas.
- Rišamajame buferiniame tirpale (BR2) laikant gali susidaryti nuosėdos. Jei reikia, pašildykite iki 37 °C, kad ištirptų.
- 2 plovimo buferinis tirpalas (BR4) teikiamas kaip koncentratas. Prieš naudodami pirmą kartą, įpilkite 4 dalis etanolio (96–100 %, p.a. švarumo klasės), kaip nurodyta ant buteliuko, kad gautumėte darbinį tirpalą.

- Jei naudojate „RNase-Free DNase Set“ pirmą kartą, paruoškite DNazės I bazinį tirpalą. Ištirpinkite gryną DNazę I (RNFD; 1500 Kunitz vienetų)\* rinkinyje pateiktame 550 µl DNazės resuspenzijos buferiniame tirpale (DRB). Elkitės atsargiai, kad nė kiek neprarastumėte DNazės I (RNFD) atidarydami indelį. Nemaišykite atkurtos DNazės I (RNFD) sūkuriniu maišytuvu. DNazė I ypač jautri fizinei denatūracijai. Maišyti reikia tik švelniai apverčiant mėgintuvėlį.
- Turimi duomenys rodo, kad atkurtą DNazę I (RNFD) galima laikyti 2–8 °C 6 savaites. Jei DNazę I (RNFD) norite laikyti ilgiau, ištraukite bazinį tirpalą iš stiklinio indelio, padalykite jį per vieną kartą sunaudojamas alikvotines dalis (naudokite rinkinyje pateiktus 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlius [MCT]; jų užtenka 5 alikvotinėms dalims) ir laikykite –20 °C ne ilgiau nei 9 mėnesius. Atitirpintas alikvotines dalis galima laikyti 2–8 °C ne ilgiau nei 6 savaites. Atitirpinę, alikvotinių dalių neužšaldykite pakartotinai.
- Atkurdami ir dalydami DNazę I (RNFD) į alikvotines dalis, laikykitės RNR tvarkymo rekomendacijų (A priedas, 65 psl.).
- Sumontuokite tinkamą kratytuvo adapterį (pateikiamas su „QIAcube“; naudokite 2 ml „safe-lock“ mėgintuvėliams skirtą adapterį, pažymėtą „2“) ir ant adapterio viršaus uždėkite kratytuvo stovą.
- Patikrinkite ir, jei reikia, ištuštinkite atliekų stalčių.
- Įdiekite protokolus, jei dar neįdiegėte jų prieš ankstesnius vykdymus. Įdiekite ir „PAXgene Blood RNA Part A“, ir „PAXgene Blood RNA Part B“ protokolus. Žr. „Protokolų diegimas „QIAcube“ 38 psl.

\* Kunitz vienetai – dažniausiai naudojami vienetai matuojant I DNazę, apibrėžiami kaip DNazės I kiekis, dėl kurio  $A_{260}$  padidėja 0,001 per minutę mililitre, esant 25 °C, pH 5,0, kaip substratą naudojant stipriai polimerizuotą DNR (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 and 363).

## Procedūra

1. Uždarykite „QIAcube“ dureles ir įjunkite „QIAcube“ maitinimo jungikliu (žr. 15 pav., 39 psl.). Pasigirsta pyptelėjimas ir įsijungia pradžios ekranas. Instrumentas automatiškai atlieka inicijavimo patikras.
2. Atidarykite „QIAcube“ dureles ir įdėkite į „QIAcube“ reikiamus reagentus bei plastikines priemonės. Žr. „QIAcube“ įkėlimas“ 40 psl.  
Taupant laiką, įkelti galima vieno arba abiejų 10 minučių centrifugavimo žingsnių metu (3 ir 5 žingsniai).
3. Centrifuguokite „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) 10 minučių 3000–5000 x g, naudodami kintamojo kampo rotorius.
  -  Siekiant užtikrinti visą kraujo ląstelių lizę, inkubuokite kraujo mėginį „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) mažiausiai 2 valandas kambario temperatūroje (15–25 °C).
  -  Rotoriuje turi būti apvaliadugnių mėgintuvėlių adapteriai. Naudojant kito tipo mėgintuvėlių adapterius, centrifuguojant mėgintuvėliai gali sudūžti.
4. Pašalinkite supernatantą nupildami arba pipete. Įpilkite į mėgintuvėlį su granule 4 ml vandens be RNazės (RNFW) ir mėgintuvėlį uždarykite šviežiu antriniu „BD Hemogard“ dangteliu (pateikiamu rinkinyje).  
Jeigu supernatantą nupilate, elkitės atsargiai, kad nesudrumstumėte granulės ir nusauskite mėgintuvėlio kraštą švariu popieriniu rankšluosčiu.
5. Maišykite sūkuriniu maišytuvu, kol granulė aiškiai ištirps, ir centrifuguokite 10 minučių 3000–5000 x g, naudodami kintamojo kampo rotorius. Pašalinkite ir išmeskite visą supernatantą.  
Smulkios atliekos likusios supernatante išmaišius jį sūkuriniu maišytuvu, bet prieš centrifuguojant, neturės įtakos procedūrai.
  -  Pašalinus ne visą supernatantą, bus slopinama lizė ir praskiestas lizatas, dėl to pasikeis RNR surišimo su „PAXgene“ membrana sąlygos.
6. Įpilkite 350 µl resuspensijos buferinio tirpalo (BR1) ir maišykite sūkuriniu maišytuvu, kol granulė aiškiai ištirps.

7. Pipete perkelkite mėginį į 2 ml apdorojimo mėgintuvėlį (PT).



Naudokite „PAXgene Blood RNA Kit“ pateiktus 2 ml apdorojimo mėgintuvėlius (PT).

8. Įdėkite atidarytus apdorojimo mėgintuvėlius (PT) su mėginiu „QIAcube“ kratytuvą (žr. 17 pav., 42 psl.). Mėginių vietos pažymėtos, kad būtų paprasčiau įdėti. Įstatykite kratytuvo stovo kamščius (pateikiami su „QIAcube“) į angas kratytuvo stovo krašte šalia kiekvieno apdorojimo mėgintuvėlio. Tai leidžia aptikti mėginius tikrinant įkrovą.



Įsitikinkite, kad sumontuotas tinkamas kratytuvo adapteris (kratytuvo adapteris, 2 ml, „safe-lock“ mėgintuvėliams, pažymėtas „2“, pateikiamas su „QIAcube“).



Jei apdorojama mažiau nei 12 mėginių, būtinai užpildykite kratytuvo stovą, kaip pavaizduota 21 pav., 46 psl. Negalima apdoroti vieno mėginio arba 11 mėginių.

9. Uždarykite „QIAcube“ instrumento dureles (žr. 15 pav., 39 psl.).

10. Pasirinkite „PAXgene Blood RNA Part A“ protokolą ir jį paleiskite.

Vykdykite „QIAcube“ jutikliniame ekrane rodomas instrukcijas.



Įsitikinkite, kad „QIAcube“ įdiegtos abi (A ir B) programos dalys (žr. „Protokolų diegimas „QIAcube“ 38 psl.).



„QIAcube“ atliks mėginių, atgalių, rotoriaus adapterių ir reagentų buteliukų įkrovos patikras.

11. Kai „PAXgene Blood RNA Part A“ protokolą užbaigiamas, atidarykite „QIAcube“ instrumento dureles (žr. 15 pav., 39 psl.). Išimkite ir išmeskite „PAXgene RNA“ sukimo cilindrus (PRC) iš rotoriaus adapterių ir ištuštinkite kratytuve esančius apdorojimo mėgintuvėlius (PT).



Vykdomo metu instrumentas perkelia sukimo cilindrus iš rotoriaus adapterio 1 padėties (L1 dangtelio padėtis) į rotoriaus adapterio 3 padėtį (L2 dangtelio padėtis) (žr. 19 pav., 44 psl.).

12. Uždarykite dangtelius visų 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlių (MCT), kuriuose yra išgryninta RNR, rotoriaus adapteriuose (3 padėtis, L3 dangtelio padėtis, žr. 19 pav., 44 psl.). Perkelkite 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlius (MCT) į „QIAcube“ kratytuvo adapterį (žr. 17 pav., 42 psl.).
13. Uždarykite „QIAcube“ instrumento dureles (žr. 15 pav., 39 psl.).
14. Pasirinkite „PAXgene Blood RNA Part B“ protokolą ir jį paleiskite.

Vykdykite „QIAcube“ jutikliniame ekrane rodomas instrukcijas.



Ši programa inkubuoja mėginius 65 °C temperatūroje ir denatūruoja RNR paskesniam panaudojimui. Nepraleiskite šio žingsnio, net jei denatūravimo karščiu žingsnis yra paskesniuose taikymuose. Pakankamai denatūruoti RNR būtina, norint užtikrinti didžiausią paskesnio naudojimo efektyvumą.

15. Kai „PAXgene Blood RNA Part B“ programa užbaigiama, atidarykite „QIAcube“ instrumento dureles (žr. 15 pav., 39 psl.). Nedelsdami padėkite mikrocentrifugavimo mėgintuvėlius (MCT) su išgryninta RNR ant ledo.



**ĮSPĖJIMAS:** karštas paviršius. Kratytuvo temperatūra gali pakilti iki 70 °C. Venkite liesti, kol jis karštas.



Nepalikite išgrynintos RNR „QIAcube“. Neatvėsinus mėginių, išgryninta RNR gali degraduoti. Todėl nerekomenduojama atlikti mėginių paruošimo vykdymų be priežiūros per naktį.

16. Jeigu RNR mėginiai nebus naudojami iš karto, laikykite –20 °C arba –70 °C temperatūroje.

Pakartotinai užšaldžius ir atšildžius RNR lieka denatūruota, todėl nebūtina kartoti karšto inkubavimo protokolo („PAXgene Blood RNA Part B“). Jeigu RNR mėginius naudojate diagnostiniame tyrime, vykdykite gamintojo pateiktas instrukcijas.

Norint tiksliai kiekybiškai įvertinti RNR pagal absorbciją ties 260 nm, rekomenduojame praskiesti mėginius 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. \* Skiedžiant mėginį vandeniu be RNazės, galima gauti neteisingai mažas reikšmes.

Nustatykite spektrofotometro nulio reikšmę, naudodami tuščią mėginį su tokia pačia dalimi, kaip ir matuojamuose mėginiuose, eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) ir Tris-HCl buferinio tirpalo. Jei netinkamai nustatyta spektrofotometro nulio reikšmė, dėl didelės eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) absorbcijos ties 220 nm gali būti aukštas foninis absorbcijos lygis.



Norėdami kiekybiškai įvertinti Tris-HCl buferiniame tirpale, naudokite šį sąryšį

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ } \mu\text{g/ml}$ . Žr. B priedą 66 psl.

17. Išimkite reagentų buteliukų stovą iš „QIAcube“ darbatalio (žr. 17 pav., 42 psl.) ir uždenkite visus buteliukus atitinkamais pažymėtais dangteliais. Buferinius tirpalus buteliukuose kambario temperatūroje (15–25 °C) galima laikyti ne ilgiau nei 3 mėnesius. Išimkite ir išmeskite „QIAcube“ mikrocentrifugavimo mėgintuvėlių lizduose esančiuose apdorojimo mėgintuvėliuose (PT) likusius reagentus (žr. 17 pav., 42 psl.). Išimkite iš centrifugos ir išmeskite rotorius adapterius (žr. 17 pav., 42 psl.). Ištuštinkite „QIAcube“ atliekų stalčių (žr. 15 pav., 39 psl.). Uždarykite „QIAcube“ instrumento dureles ir išjunkite instrumentą maitinimo jungikliu (žr. 15 pav., 39 psl.).

\* Dirbdami su cheminėmis medžiagomis visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalātą, mūvėkite vienkartinės pirstinės ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose saugos duomenų lapuose (safety data sheets, SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas.

# Trikčių šalinimo vadovas

Šis trikčių šalinimo vadovas gali padėti šalinant atsiradusias triktis. Daugiau informacijos rasite mūsų techninės pagalbos centro svetainės puslapyje „Frequently Asked Questions“ (dažniausiai užduodami klausimai) adresu [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). QIAGEN techninėse tarnybose dirbantys mokslininkai visada mielai atsakys į visus jums kilusius klausimus apie šiame vadove ir protokoluose pateiktą informaciją, mėginius ir tyrimų technologijas (kontaktingę informaciją žr. paskutiniame puslapyje arba apsilankykite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Pastabos ir pasiūlymai

### Degradavusi RNR

Užteršimas RNaze



Elkitės atsargiai, kad procedūros metu ar tvarkant vėliau į reagentus nepatektų RNazių (žr. A priedą, 65 psl.).

### Maža RNR išeiga

a) Į „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) paimta mažiau nei 2,5 ml kraujo



Įsitinkite, kad į „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT; žr. „PAXgene Blood RNA Tube“ vadovą) paimta 2,5 ml kraujo.

b) RNR koncentracija išmatuota vandenyje



Norint tiksliai kiekybiškai įvertinti, RNR reikia skiesti 10 mM Tris-HCl, pH 7,5\* (žr. B priedą, 66 psl.).



c) Vykdamy protokoly 9 ir 10 žingsnius rankiniu būdu, ląstelių atliekos perkeltos į „PAXgene RNA“ sukimo cilindrą (PRC)





Stenkitės neperkelti didelių dalelių pipete perkeldami supernatantą rankinio protokoly 7 žingsnyje (mažų atliekų perkėlimas procedūrai įtakos neturės).

\* Dirbdami su cheminėmis medžiagomis visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalātą, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose saugos duomenų lapuose (safety data sheets, SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas.

## Pastabos ir pasiūlymai

- d) Supernatantas ne visiškai pašalintas 3 žingsnyje  Įsitinkinkite, kad pašalintas visas supernatantas. Jeigu supernatantas nupilamas, pašalinkite lašelius nuo „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) krašto švelniai paliesdami popierinį rankšluostį. Imkitės atitinkamų atsargumo priemonių, kad išvengtumėte kryžminės taršos.
- e) Paėmus į „PAXgene Blood RNA Tube (BRT)“, kraujas inkubuotas trumpiau nei 2 valandas  Paėmę, inkubuokite „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) ne mažiau nei 2 valandas.

### Maža $A_{260}/A_{280}$ reikšmė

- a) Matuojant  $A_{260}/A_{280}$ , RNR buvo skiedžiama vandeniui  Prieš matuodami RNR grynumą, skiedimui naudokite 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 \* (žr. B priedą, 66 psl.).
- b) Netinkamai nustatyta spektrofotometro nulinio reikšmė  Nustatykite spektrofotometro nulinio reikšmę, naudodami tuščią mėginį su tokia pačia dalimi, kaip ir matuojamuose mėginiuose, eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) ir 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, buferinio tirpalo. Jei netinkamai nustatyta spektrofotometro nulinio reikšmė, dėl didelės eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) absorbcijos ties 220 nm gali būti aukštas foninis absorbcijos lygis.

### Instrumento triktis

„QIAcube“ eksploatuojamas netinkamai

Perskaitykite „QIAcube“ *naudotojo vadovą*, atkreipdami ypatingą dėmesį į trikčių šalinimo skyrių. Įsitinkinkite, kad „QIAcube“ tinkamai prižiūrimas, kaip aprašyta „QIAcube“ *naudotojo vadove*.

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



# A priedas. Bendrosios RNR tvarkymo pastabos

## RNR naudojimas



Ribonukleazės (RNazės) – tai labai stabilūs ir aktyvūs fermentai, paprastai veikiantys ir be kofaktorių. RNazes labai sunku inaktyvinti, o degraduoti RNR pakanka labai mažo jų kiekio, todėl nenaudokite jokių plastikinių ar stiklinių indų prieš tai nepašalinę galimo jų užteršimo RNaze. Būtina atidžiai saugotis, kad RNazių nenumatytai nepatektų į RNR mėginį atliekant gryninimo procedūrą ar po jos. Siekiant sukurti ir išlaikyti aplinką be RNazės, dirbant su RNR, vienkartinį ir daugkartinio naudojimo indų bei tirpalų pirminio apdorojimo metu ir juos naudojant reikia imtis atsargumo priemonių.

## Bendrasis naudojimas



Dirbant su RNR visuomet reikia taikyti tinkamus mikrobiologinius, aseptinius metodus. Ant rankų ir dulkių dalelių pernešamos bakterijos ir mielės, kurios yra dažniausi taršos RNaze šaltiniai. Tvarkydami reagentus ir RNR mėginius, visuomet mūvėkite latekso arba vinilo pirštines, kad išvengtumėte užteršimo RNaze nuo odos paviršiaus arba dulkėtos laboratorinės įrangos. Dažnai keiskite pirštines ir, kai tik įmanoma, laikykite mėgintuvėlius uždengtus. Pipete perkeldami alikvotines dalis paskesniam naudojimui, išgrynintą RNR laikykite ant ledo.

Užteršimo RNaze šalinimo iš stiklinių indų ir tirpalų protokolus rasite bendrosiose molekulinės biologijos rekomendacijose, pvz., Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

# B priedas. Bendrosios RNR kiekybinis įvertinimas ir kokybės nustatymas

## RNR kiekybinis įvertinimas

RNR koncentraciją nustatoma spektrofotometru matuojant absorbciją ties 260 nm ( $A_{260}$ ). Siekiant užtikrinti reikšmingumą, reikšmės turi būti spektrofotometro tiesiniame diapazone. 1 vieneto absorbcija ties 260 nm atitinka 44  $\mu\text{g}$  RNR/ml ( $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ ). Šis santykis galioja tik 10 mM Tris-HCl,\* pH 7,5 atliekamiems matavimams. Todėl, jei RNR mėginį būtina skiesti, jį reikia skiesti 10 mM Tris-HCl. Kaip aptarta toliau (žr. „RNR grynumas“ 67 psl.), absorbcijos ties 260 nm ir ties 280 nm reikšmių santykis rodo apskaičiuotą RNR grynumą. Matuodami RNR mėginius, įsitikinkite, kad kiuvetės yra be RNazės. Nustatykite spektrofotometro nulio reikšmę, naudodami tuščią mėginį su tokia pačia dalimi, kaip ir matuojamuose mėginiuose, eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) ir Tris-HCl buferinio tirpalo. Jei netinkamai nustatyta spektrofotometro nulio reikšmė, dėl didelės eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) absorbcijos ties 220 nm gali būti aukštas foninis absorbcijos lygis. Toliau pateiktas RNR kiekybinio įvertinimo skaičiavimo pavyzdys.

RNR mėginio tūris	=	80 $\mu\text{l}$
Skiedimas (1/15)	=	10 $\mu\text{l}$ RNR mėginio + 140 $\mu\text{l}$ 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Išmatuokite praskiesto mėginio absorbciją kiuvetėje (be RNazės).		
$A_{260}$	=	0,3
Mėginio koncentracija	=	$44 \times A_{260} \times \text{skiedimo koeficientas}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 $\mu\text{g/ml}$
Bendroji išeiga	=	koncentracija x mėginio tūris mililitrais
	=	$198 \mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml}$
	=	15,8 $\mu\text{g RNA}$

\* Dirbdami su cheminėmis medžiagomis visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose saugos duomenų lapuose (safety data sheets, SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas.

## RNR grynumas

Ties 260 nm ir 280 nm išmatuotų reikšmių santykis ( $A_{260}/A_{280}$ ) rodo apskaičiuotą RNR grynumą, atsižvelgiant į priemaišas, kurios absorbuoja UV šviesą, pvz., baltymus. Tačiau  $A_{260}/A_{280}$  santykiui didelę įtaką daro pH. Dėl mažesnio pH gaunamas mažesnis  $A_{260}/A_{280}$  santykis ir mažesnis jautrumas taršai baltymais.\* Norint gauti tikslias reikšmes, absorbciją rekomenduojame matuoti 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Grynos RNR  $A_{260}/A_{280}$  santykis yra 1,8–2,2, kai matuojama 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Nustatykite spektrofotometro nulio reikšmę, naudodami tuščią mėginį su tokia pačia dalimi, kaip ir matuojamuose mėginiuose, eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) ir Tris-HCl buferinio tirpalo. Jei netinkamai nustatyta spektrofotometro nulio reikšmė, dėl didelės eliuavimo buferinio tirpalo (BR5) absorbcijos ties 220 nm gali būti aukštas foninis absorbcijos lygis.

## C priedas. „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) tvarkymas



Toliau pateiktos BD rekomendacijos gali būti naudingos tvarkant „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT). Daugiau informacijos apie „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT) žr. „PAXgene Blood RNA Tube“ vadove.

### „BD Hemogard“ dangtelio pašalinimo instrukcijos

1. Viena ranka suimkite „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT), laikydami nykštį po „BD Hemogard“ dangteliu. (Kad būtų stabiliau, ranką laikykite ant kieto paviršiaus.) Kita ranka sukite „BD Hemogard“ dangtelį ir tuo pačiu metu kitos rankos nykščiu stumkite aukštyn, TIK KOL ATLAISVINSITE MĖGINTUVĖLIO KAMŠTELĮ.

\* 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.

2. Patraukite nykštį, kol nepakėlėte dangtelio. NESTUMKITE nykščiu taip, kad nustumtumėte dangtelį nuo „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT). Dėmesio: jeigu „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) yra kraujo, yra poveikio pavojus. Siekiant išvengti sužeidimų pašalinant dangtelį, svarbu kad nykštys, kuriuo stumiate šalinamą dangtelį aukštyn, neprisiliestų prie „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT), kai tik atlaisvinsite „BD Hemogard“ dangtelį.
3. Nukelkite „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) dangtelį. Jei mažai tikėtina atveju plastikinis skydelis atsiskirtų nuo guminio kamštelio, NEBANDYKITE IŠ NAUJO SURINKTI DANGTELIO. Atsargiai nuimkite guminį kamštelį nuo „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT).

### **Antrinio „BD Hemogard“ dangtelio pašalinimo instrukcijos**

1. Pakeiskite dangtelį ant „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT).
2. Pasukite ir tvirtai paspauskite, kad gerai įstatytumėte kamštelį. Būtina visiškai įkišti kamštelį, kad „PAXgene Blood RNA Tube“ (BRT) dangtelis liktų tvirtai uždarytas tvarkant.

# Užsakymo informacija

Produktas	Turinys	Kat. Nr.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 „PAXgene“ sukimo cilindrų, 50 „Shredder“ sukimo cilindrų, apdorojimo mėgintuvėliai, DNazė I be RNazės, reagentai ir buferiniai tirpalai be RNazės. Naudojama kartu su „PAXgene Blood RNA Tubes“	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 kraujo surinkimo mėgintuvėlių	762165
<b>Susiję produktai, kuriuos galima užsakyti iš QIAGEN</b>		
Starter Pack, QIAcube	Pakuotėje: reagentų buteliukų stovai (3); stovo žymėjimo juostelės (8); 200 µl filtrų antgaliai (1024); 1000 µl filtrų antgaliai (1024); 1000 µl filtrų antgaliai, plačia anga (1024); 30 ml reagentų buteliukai (18); rotorius adapteriai (240); rotorius adapterio laikiklis	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Sterilūs, vienkartiniai filtrų antgaliai, stovelyje	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Reagentų buteliukai (30 ml) su dangteliais; 6 vnt. pakuotėje; skirti naudoti „QIAcube“ reagentų buteliukų stovė	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	240 preparatų: 240 vienkartinų rotorius adapterių; skirtų naudoti su „QIAcube“	990394

Reagent Bottle Rack	Stovas, į kurį telpa 6 x 30 ml reagentų buteliukai, „QIAcube“ darbistalyje	990390
Rotor Adapter Holder	12 vienkartinį rotorius adapterių laikiklis; skirtas naudoti su „QIAcube“	990392
<b>Susiję produktai, kuriuos galima užsakyti iš BD*</b>		
Blood Collection Set	„BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set“: 21G, 0,75 colio (0,8 x 19 mm) adata, 12 colių (305 mm) vamzdelis su Luerio adapteriu; 50 vnt. dėžutėje, 200 vnt. pakuotėje	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Pakuotė tik 13 mm ir 16 mm skersmens; 1000 vnt./pak.	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm, 4,0 ml paimti, su raudonu „BD Hemogard“ dangteliu ir popierine etikete; 100 vnt./dėž., 1000 vnt./pak.	368975

\* Šie kraujo paėmimo priedai yra tipiniai produktai, kuriuos galima naudoti su „PAXgene Blood RNA Tubes“ (BRT).  
Jei norite sužinoti daugiau apie šiuos priedus, įskaitant informaciją apie užsakymą, apsilankykite [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

Norėdami gauti naujausios informacijos apie licencijavimą ir atsakomybės už produktus apribojimus, žr. atitinkamą „PreAnalytiX“ arba QIAGEN rinkinio vadovą arba naudotojo vadovą. „PreAnalytiX“ ir QIAGEN rinkinio vadovai ir naudotojo vadovai pasiekiami [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) ir [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) arba jų galima paprašyti „PreAnalytiX“ techninėse tarnybose.

# Vadovo peržiūros istorija

Dokumentas ir pataisymai	Keitimai	Data
HB-0101-004, R2	GHS taisyklių laikymusi susiję pakeitimai visame dokumente	2015 birželis
HB-0101-005, R3	Naujas šablonas; automatizuoto protokolo ir efektyvumo duomenų pataisymai; saugos informacijos, atsižvelgiant į GHS taisykles, naujinimas; instrumento išsamios informacijos pakeitimai ir Produkto naudojimo apribojimų informacija.	2019 vasaris
HB-0101-006, R3	Pataisytas rinkinio pavadinimas 5 psl. pateiktoje rinkinio turinio lentelėje.	2020 sausis

## **PreAnalytiX Worldwide**

„PreAnalytiX“ produktus platina QIAGEN ir BD įmonės

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**



