

2020. gada janvāris

PAXgene[®]

Blood RNA Kit rokasgrāmata

2. versija



50 (kataloga Nr. 762174)

R3 **MAT** 1120409LV

REF

762174

IVD



PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon

Ražotājs: QIAGEN GmbH pēc PreAnalytiX pasūtījuma

 **PreAnalytiX**
A QIAGEN / BD Company

Sample to Insight

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

Komplekti PAXgene Blood RNA Kit nav pieejami visās valstīs; lūdzu, jautājiel.

Ierobežots licences līgums

Šī produkta izmantošana apliecina katra PAXgene Blood RNA Kit pircēja vai lietotāja piekrišanu tālāk minētajiem nosacījumiem.

1. PAXgene Blood RNA Kit drīkst izmantot tikai saskaņā ar norādījumiem *PAXgene Blood RNA Kit rokasgrāmatā* un tikai ar komplektā iekļautajiem komponentiem. Uzņēmums PreAnalytiX nepiešķir nekāda veida licenci uz nevienu no tā intelektuālajiem īpašumiem, lai šajā komplektā iekļautos komponentus izmantotu kopā ar jebkādiem komponentiem, kas nav iekļauti šajā komplektā, vai ar tiem apvienotu, izņemot gadījumus, kas aprakstīti *PAXgene Blood RNA Kit rokasgrāmatā* un papildu protokolos, kas pieejami vietnē www.preanalytix.com.
2. Izņemot skaidri norādītās licences, uzņēmums PreAnalytiX nesniedz citas garantijas, ka šis komplekts un/vai tā lietošana nepārkāpj trešo pušu tiesības.
3. Šis komplekts un tā komponenti ir licenciēti vienreizējai lietošanai, un tos nedrīkst izmantot atkārtoti, atjaunot vai pārdot tālāk.
4. Uzņēmums PreAnalytiX īpaši atsakās no jebkādām citām tiesām vai netiešām licencēm, kas nav skaidri norādītas.
5. Komplekta pircējs un lietotājs piekrīt neveikt un neatļaut citiem veikt nekādas darbības, kas varētu izraisīt vai veicināt jebkuras no iepriekš aizliegtajām darbībām.
6. Uzņēmums PreAnalytiX var pieprasīt šī ierobežotā licences līguma aizliegumu īstenošanu jebkurā tiesā un apņemas atgūt visus savus izmeklēšanas un tiesas izdevumus, ieskaitot advokātu honorārus, kas radušies, īstenojot šī ierobežotā licences līguma nosacījumus vai jebkuru no uzņēmuma intelektuālā īpašuma tiesībām saistībā ar komplektu un/vai tā komponentiem.

Jaunākos licences nosacījumus skatiet tīmekļa vietnē www.preanalytix.com.

Pārdošanas nosacījumi

Uz šo produktu attiecas licence atbilstoši noteiktām US-7,270,953, un US-7,682,790, kā arī EP-1820793 B1 (un šo patentu prasību ārvalstu ekvivalentu) prasībām lietot šo produktu, lai apstrādātu nukleīnskābju kompleksu, kas izveidots, savācot paraugu stobriņā PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-006 BD-8945 1120409 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, visas tiesības paturētas.

PreAnalytiX Company

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Šveice

www.preanalytix.com

PreAnalytiX izplatītāji

PreAnalytiX produktus pēc PreAnalytiX pasūtījuma ražo uzņēmums QIAGEN vai BD, un tos pēc PreAnalytiX pasūtījuma izplata uzņēmums QIAGEN vai BD. Uzņēmumā PreAnalytiX GmbH produktus nevar pasūtīt.


Vietējā PreAnalytiX izplatītāja kontaktinformāciju skatiet pēdējā lappusē.

Saturs

| | |
|--|----|
| Komplekta komponenti | 5 |
| Simboli..... | 6 |
| Uzglabāšanas apstākļi..... | 7 |
| Paredzētais lietojums | 8 |
| Produkta izmantošanas ierobežojumi..... | 8 |
| Kvalitātes kontrole | 9 |
| Tehniskā palīdzība | 9 |
| Drošības informācija..... | 9 |
| Ievads..... | 13 |
| Princips un procedūra | 13 |
| Paraugu savākšana un stabilizācija | 13 |
| RNS koncentrēšana un izdalīšana | 19 |
| Manuāla RNS izdalīšana..... | 19 |
| Automatizēta RNS izdalīšana..... | 29 |
| Aprīkojums un reaģenti, ko nodrošina lietotājs | 35 |
| Svarīgas piezīmes | 37 |
| QIAcube lietošana | 37 |
| Ierīces QIAcube ieslēgšana | 37 |
| Protokolu instalēšana ierīcē QIAcube | 37 |
| Ierīces QIAcube uzpilde | 39 |
| Protokols: manuāla summārās RNS izdalīšana no PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT) savāktām cilvēka pilnasinīm..... | 48 |

| | |
|--|----|
| Protokols: automatizēta summārās RNS izdalīšana no PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT) savāktām cilvēka pilnasinīm | 55 |
| Problēmu novēršanas ieteikumi..... | 62 |
| A pielikums. Vispārīgas piezīmes par RNS apstrādi..... | 64 |
| B pielikums. Summārās RNS kvantifikācija un kvalitātes noteikšana | 65 |
| C pielikums. Darbs ar PAXgene Blood RNA Tubes stobriņiem (BRT)..... | 67 |
| Informācija pasūtīšanai..... | 68 |
| Rokasgrāmatas rediģēšanas vēsture | 70 |

Komplekta komponenti

| | | | |
|------------------------------|---|---|-----------------------------------|
| PAXgene Blood RNA Kit | | | (50) |
| Kataloga nr. | | | 762174 |
| Sagatavju skaits | | | 50 |
| BR1 | Resuspension Buffer (Resuspendēšanas buferšķīdums) | RES BUF | 20 ml |
| BR2 | Binding Buffer (Fiksācijas buferšķīdums)* | BIND BUF | 18 ml |
| BR3 | Wash Buffer 1 (Skalošanas buferšķīdums 1)* | WASH BUF 1 | 45 ml |
| BR4 | Wash Buffer 2 (concentrate) (Skalošanas buferšķīdums 2 (koncentrāts)) [†] | WASH BUF 2 CONC | 11 ml |
| BR5 | Elution Buffer (Eluēšanas buferšķīdums) | ELU BUF | 6 ml |
| RNFW | RNase-free Water (bottle) (Ūdens, kas nesatur RNāzi (pudele)) | PEL WASH | 2 × 125 ml |
| PK | Proteinase K (green lid) (Proteināze K (ar zaļu vāciņu)) | PROTK | 2 × 1,4 ml |
| PRC | PAXgene RNA Spin Columns (red) (PAXgene RNA griešanas stobriņi (sarkani)) | PAXgene RNA COL | 5 × 10 |
| PT | Processing Tubes (2 ml) (Apstrādes stobriņi (2 ml)) | PROC TUBE | 6 × 50 |
| Hemogard | Secondary BD Hemogard Closures (Sekundārās BD Hemogard aizdares) | SEC CLOS | 50 |
| MCT | Microcentrifuge Tubes (1.5 ml) (Mikrocentrifūgas stobriņi (1,5 ml)) | MIC TUBE | 3 × 50, 1 × 10 |
| RNFD | DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNāze I bez RNāzes (liofilizēta)) | DNA REM | 1500 Kunitz vienības [‡] |
| RDD | DNA Digestion Buffer (white lid) (DNS noārdīšanas buferšķīdums (ar baltu vāciņu)) | DNA DIG BUF | 2 × 2 ml |
| DRB | DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (DNāzes resuspendēšanas buferšķīdums (stobriņā, ar violetu vāciņu)) | DNase RES BUF | 2 ml |
| PSC | PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (PAXgene Shredder griešanas stobriņi (violeti)) | PAXgene SHRED COL | 5 × 10 |
| Rokasgrāmata | PAXgene Blood RNA Kit rokasgrāmata (2. versija) |  | 1 |

* Nav saderīgs ar dezinfekcijas reaģentiem, kuri satur balinātāju. Satur guanidīna sāli. Drošības informāciju skatiet 9. lpp.

[†] Skalošanas buferšķīdums 2 (BR4) tiek piegādāts koncentrāta veidā. Pirms pirmās lietošanas reizes pievienojiet 4 reizes lielāku tilpumu etanola (96–100% tīrības pakāpe p.a.), lai iegūtu darba šķīdumu (ievērojiet norādījumus uz pudeles).

[‡] Kunitz vienības parasti tiek izmantotas DNāzes I mērīšanai, un tās ir definētas kā DNāzes I daudzums, kas rada A₂₆₀ pieaugumu par 0,001 minūtē/mililitrā pie temperatūras 25 °C un pH 5,0, kā substrātu izmantojot augsti polimerizētu DNS (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 un 363).

Simboli



Satur reaģentus, kuru daudzums ir pietiekams <N> testu veikšanai



Skatīt lietošanas norādījumus



Izlietot līdz



In vitro diagnostikas medicīnas ierīce



Kataloga numurs



Partijas numurs



Materiāla numurs



Komponenti



Numurs



Sterilizācijai izmantota apstarošana



Kunitz vienības



Jāpievieno



Satur














Pagatavots šķīdums



Dezoksiribonukleāze I



Etanols

| | |
|---|---|
|  | Guanidīna izotiocianāts |
|  | DNāzes komplekts bez RNāzes |
|  | Globālais tirdzniecības identifikācijas numurs |
|  | Nelietot atkārtoti |
|  | Temperatūras ierobežojums |
|  | Maksimālās temperatūras ierobežojums |
|  | Ražotājs |
|  | Svarīga piezīme |
|  | Pēc etanola pievienošanas pudeles saturam pierakstiet pašreizējo datumu |
|  | Saņemot |
|  | Izraisa |

Uzglabāšanas apstākļi

PAXgene RNA griešanas stobriņus (PRC), PAXgene Shredder griešanas stobriņus (PSC), proteināzi K (PK) un buferšķīdumus (BR1, BR2, BR3, BR4 un BR5) var uzglabāt sausā vietā temperatūrā, kas norādīta komplekta etiķetē.

DNāzes komplekts bez RNāzes, kas satur DNāzi I (RNFD), DNS noārdīšanas buferšķīdums (RDD) un DNāzes resuspendēšanas buferšķīdums (DRB) tiek piegādāti apkārtējās vides temperatūrā. Visus DNāzes komplekta bez RNāzes komponentus pēc saņemšanas

nekavējoties uzglabājiēt etiķetē norādītajā temperatūrā. Pareizi uzglabājot, komplekts ir stabils līdz derīguma termiņam, kas norādīts uz komplekta iepakojuma.

Paredzētais lietojums

Komplekts PAXgene Blood RNA Kit ir paredzēts intracelulārās RNS izdalīšanai no pilnasinīm, kas savāktas PAXgene Blood RNA Tube stobriņos (BRT). Ja komplekts tiek lietots kopā ar PAXgene Blood RNA Tube stobriņiem (BRT), sistēma nodrošina RT-PCR paredzētu, no pilnasinīm izdalītu intracelulāru RNS, ko izmanto molekulārās diagnostikas testēšanai. Informāciju par PAXgene Blood RNA Tubes stobriņiem (BRT) skatiet *PAXgene Blood RNA Tube rokasgrāmatā*.

Sistēmas PAXgene Blood RNA System veikspējas raksturlielumi ir noteikti tikai ar FOS un IL1B gēnu transkriptiem. Lietotājs ir atbildīgs par attiecīgo sistēmas PAXgene Blood RNA System veikspējas raksturlielumu noteikšanu citiem mērķa transkriptiem.

Produkta izmantošanas ierobežojumi

Komplekts PAXgene Blood RNA Kit ir paredzēts intracelulārās RNS izdalīšanai no cilvēka pilnasinīm ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leikocīti/ml) lietošanai *in vitro* diagnostikā. Tas nav paredzēts genomiskās DNS vai vīrusu nukleīnskābju izdalīšanai no cilvēka pilnasinīm. Stabilizācijas specifiskācijām ir validēts ierobežots skaits transkriptu (FOS un IL1B gēnu transkripti), tāpēc veikspējas raksturlielumi nav noteikti visiem transkriptiem. Laboratorijas darbiniekiem ir jāpārskata ražotāja dati un pašu iegūtie dati, lai noteiktu, vai ir jāveic validācija citiem transkriptiem.

Šo produktu ir paredzēts lietot tikai profesionāliem lietotājiem, piemēram, laborantiem un ārstiem, kuri ir apmācīti *in vitro* diagnostikas procedūru veikšanā.

Kvalitātes kontrole

Atbilstoši pēc ISO prasībām sertificētajai QIAGEN Kvalitātes vadības sistēmai katra PAXgene Blood RNA Kit partija ir pārbaudīta, salīdzinot ar iepriekš noteiktiem parametriem, lai nodrošinātu nemainīgu produkta kvalitāti.

Tehniskā palīdzība

Uzņēmums QIAGEN lepojas ar nodrošinātā tehniskā atbalsta kvalitāti un pieejamību. Mūsu tehniskā atbalsta dienesta komandā strādā pieredzējuši zinātnieki ar plašu praktisku un teorētisko pieredzi molekulārajā bioloģijā un PreAnalytiX produktu izmantošanā. Ja jums ir jebkādi jautājumi par PAXgene Blood RNA Kit, lūdzu, sazinieties ar mums.

Lai saņemtu tehnisko palīdzību un plašāku informāciju, lūdzu, zvaniet QIAGEN tehniskā atbalsta dienestam.

Drošības informācija

Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles.

Lai izvairītos no infekciju (piemēram, ar HIV vai B hepatīta vīrusiem) vai traumu riska, strādājot ar bioloģiskiem un ķīmiskiem materiāliem, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai iegūtu papildinformāciju, lūdzu, iepazīstieties ar attiecīgajām drošības datu lapām (DDL). Tās ērtā un kompaktā PDF formātā pieejamas vietnē **www.preanalytix.com**, kur var atrast, apskatīt un izdrukāt šī komplekta DDL.

UZMANĪBU!

Paraugu savienošanas atkritumiem NEDRĪKST tieši pievienot balinātāju vai skābju šķīdumus.

Fiksācijas buferšķīdums (BR2) un skalošanas buferšķīdums 1 (BR3) satur guanidīna tiocianātu, kurš ar balinātāju var veidot augsti reaktīvus savienojumus. Ja fikācijas buferšķīdums (BR2) vai skalošanas buferšķīdums 1 (BR3) izšķīdās, tīriet ar atbilstošu laboratorijas mazgāšanas līdzekli un ūdeni. Ja izšķīdās šķīdums, kas satur potenciāli infekciozas vielas, skarto apgabalu vispirms notīriet ar laboratorijas mazgāšanas līdzekli un ūdeni un pēc tam ar 1% (tilpumkoncentrācija) nātrija hipohlorītu.

RNS stabilizācijas šķīduma un asiņu maisījumu no PAXgene Blood RNA Tube stobriņiem (BRT) var dezinficēt, izmantojot 1 tilpumu rūpnieciskā balinātāja šķīduma (5% nātrija hipohlorīta) uz 9 tilpumiem RNS stabilizācijas šķīduma un asiņu maisījuma.

Paraugu sagatavošanas atkritumi, piemēram, supernatanti no centrifugēšanas darbībām RNS izdalīšanas procedūrā, ir jāuzskata par potenciāli infekcioziem. Pirms utilizēšanas atkritumi ir jāapstrādā autoklāvā vai jāsadedzina, lai iznīcinātu visus infekciozos materiālus. Utilizācija ir jāveic atbilstoši spēkā esošajiem noteikumiem.

Tālāk norādītie riska un piesardzības pasākumu paziņojumi attiecas uz PAXgene Blood RNA Kit komponentiem. PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) drošības informāciju skatiet *PAXgene Blood RNA Tube rokasgrāmātā*.

Buferšķīdums BR2



Satur: guanidīna tiocianātu. Bīstami! Kaitīgs, ja tiek norīts. Var būt kaitīgs, saskaroties ar ādu vai ieelpojot. Izraisa smagas acu traumas. Kaitīgs ūdens organismiem, ar ilgtermiņa ietekmi. Saskarē ar skābēm izdalās ļoti toksiska gāze. Izmantot aizsargcimdus/ aizsargapģērbus/acu aizsarglīdzekļus/sejas aizsarglīdzekļus. JA IEKĻŪST ACĪS: uzmanīgi skalojiet ar ūdeni vairākas minūtes. Izņemiet kontaktlēcas, ja tās ir ieliktas un tās var vienkārši izņemt. Turpiniet skalošanu. Nekavējoties zvaniet uz SAINDĒŠANĀS CENTRU vai ārstam/ģimenes ārstam.

Buferšķīdums BR3



Satur: etanolu un guanidīna tiocianātu. Bīstami! Uzliesmojošs šķīdums un tvaiki. Izraisa smagas acu traumas. Saskarē ar skābēm izdalās ļoti toksiska gāze. Sargāt no karstuma/dzirkstelēm/atklātas liesmas/karstām virsmām. Nesmēķēt. Izmantot aizsargcimdus/ aizsargapģērbus/acu aizsarglīdzekļus/sejas aizsarglīdzekļus. JA IEKĻŪST ACĪS: uzmanīgi skalojiet ar ūdeni vairākas minūtes. Izņemiet kontaktlēcas, ja tās ir ieliktas un tās var vienkārši izņemt. Turpiniet skalošanu. Nekavējoties zvaniet uz SAINDĒŠANĀS CENTRU vai ārstam/ģimenes ārstam.

DNāze I



Satur: DNāzi. Bīstami! Var izraisīt alerģisku ādas reakciju. Var izraisīt alerģijas vai astmas simptomus, kā arī elpošanas problēmas, ja tiek ieelpots. Izvairieties no miglas/tvaiku/gāzes/izgarojumu/garaiņu/aerosola ieelpošanas. Izmantot aizsargcimdus/aizsargapģērbu/acu aizsarglīdzekļus/sejas aizsarglīdzekļus. Lietojiet elpošanas aizsarglīdzekļus. JA ir bijusi saskare vai ir aizdomas par to: Zvaniet uz SAINDĒŠANĀS CENTRU vai ārstam/ģimenes ārstam. Pārvietot cietušo svaigā gaisā un novietot mierīgā pozīcijā, kurā nav apgrūtināta elpošana.

Proteināze K



Satur: proteināzi K. Bīstami! Izraisa mērenu ādas kairinājumu. Var izraisīt alerģijas vai astmas simptomus, kā arī elpošanas problēmas, ja tiek ieelpots. Izvairieties no miglas/tvaiku/gāzes/izgarojumu/garaiņu/aerosola ieelpošanas. Izmantot aizsargcimdus/aizsargapģērbu/acu aizsarglīdzekļus/sejas aizsarglīdzekļus. Lietojiet elpošanas aizsarglīdzekļus. JA ir bijusi saskare vai ir aizdomas par to: Zvaniet uz SAINDĒŠANĀS CENTRU vai ārstam/ģimenes ārstam. Pārvietot cietušo svaigā gaisā un novietot mierīgā pozīcijā, kurā nav apgrūtināta elpošana.

Ievads

Pilnasiņu savākšana ir pirmā darbība daudzās molekulārās analizēs, ko izmanto šūnu RNS izpētei. Tomēr nozīmīga problēma šādos eksperimentos ir šūnu RNS profila nestabilitāte *in vitro*. PreAnalytiX veiktos pētījumos ir pierādīts, ka, glabājot un transportējot istabas temperatūrā, atsevišķu mRNS veidu kopiju skaits pilnasinīs var mainīties vairāk nekā tūkstoškārtīgi.* To izraisa gan strauja RNS noārdīšanās, gan noteiktu gēnu inducēta ekspresija pēc asiņu paņemšanas. Šādu RNS ekspresijas profila izmaiņu dēļ nav iespējams veikt uzticamus pētījumus par gēnu ekspresiju. Tāpēc, lai varētu precīzi analizēt gēnu ekspresiju cilvēka pilnasinīs, ir nepieciešama metode, kas saglabā RNS ekspresijas profilu flebotomijas laikā un pēc tās.

Princips un procedūra

Uzņēmums PreAnalytiX ir izstrādājis jaunu sistēmu, kura sniedz iespēju savākt, stabilizēt, uzglabāt un transportēt cilvēka pilnasiņu paraugus, kā arī nodrošina ātru un efektīvu protokolu intracelulārās RNS izdalīšanai. Sistēmā asiņu savākšanai un RNS stabilizācijai ir jāizmanto PAXgene Blood RNA Tubes stobriņi (BRT; ASV patenti 6,602,718 un 6,617,170) un pēc tam manuāli vai automatizēti jāveic RNS izdalīšana, izmantojot komplektu PAXgene Blood RNA Kit. Gan manuālais, gan automatizētais protokols nodrošina būtībā līdzvērtīgu veiktspēju attiecībā uz RNS kvalitāti un daudzumu. Manuālā protokola (22.–29. lpp.) un automatizētā protokola (32.–34. lpp.) veiktspējas dati ir iekļauti šajā rokasgrāmatā.

Paraugu savākšana un stabilizācija

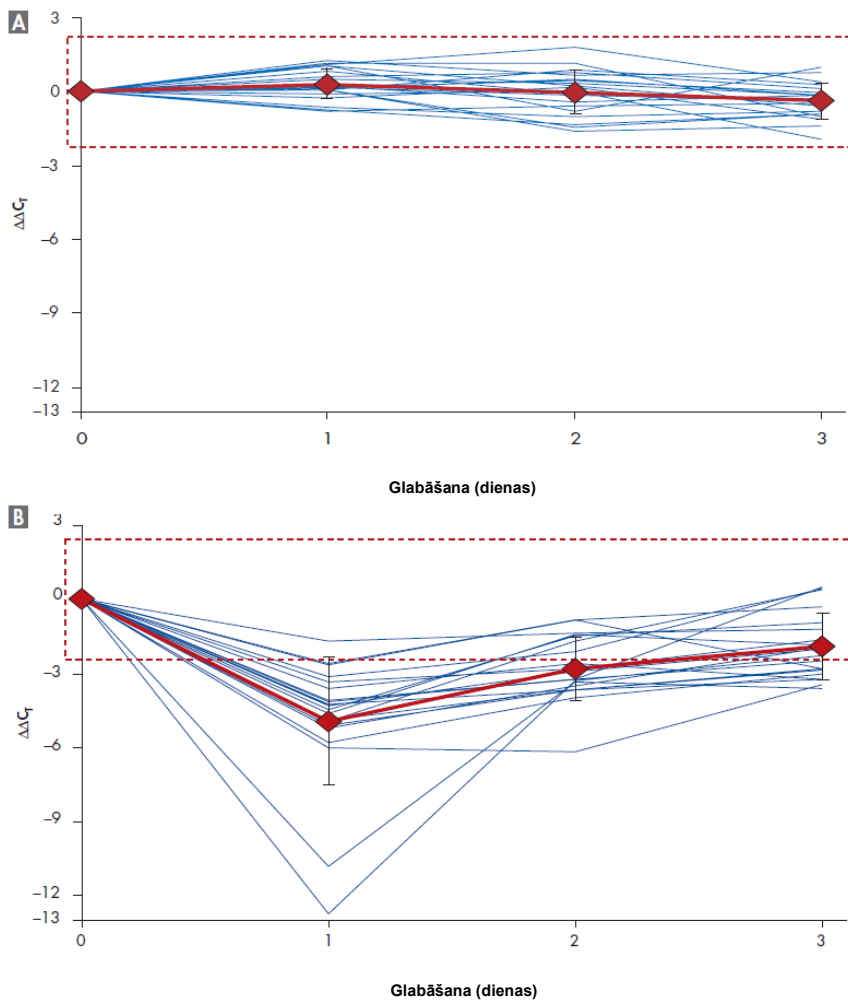
PAXgene Blood RNA Tubes stobriņi (BRT) satur patentētu reaģentu maisījumu, kura pamatā ir patentēta RNS stabilizācijas tehnoloģija. Šis reaģentu maisījums novērš RNāžu izraisītu RNS molekulu noārdīšanos un minimizē *ex vivo* gēnu ekspresijas izmaiņas. PAXgene Blood RNA Tubes stobriņi (BRT) ir paredzēti cilvēka pilnasiņu savākšanai un šūnu RNS

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

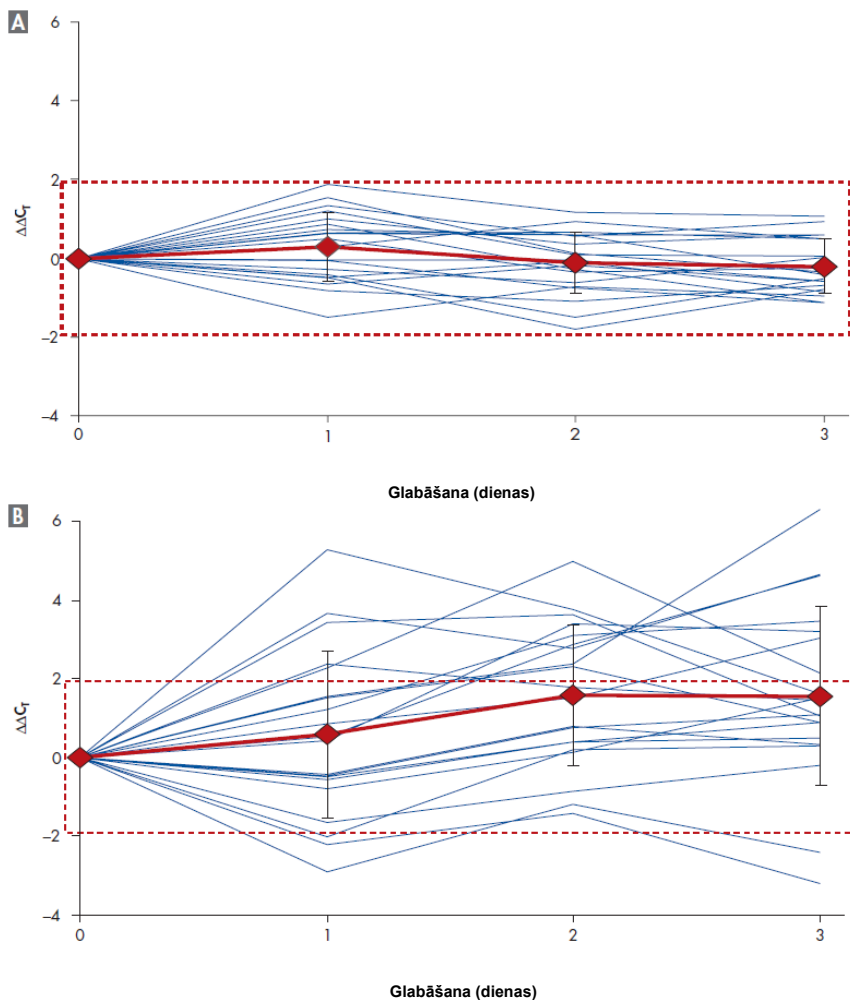
stabilizācijai līdz pat 3 dienām 18–25 °C temperatūrā (1. un 2. att., 15. un 16. lpp.) vai līdz pat 5 dienām 2–8 °C temperatūrā (3. un 4. att., 17. un 18. lpp.). Pašlaik pieejamie dati uzrāda šūnu RNS stabilizāciju vismaz 11 gadus –20 °C vai –70 °C temperatūrā*. Lai saņemtu plašāku informāciju par notiekošajiem pētījumiem, kuros tiek novērtēta stabilitāte ilgstošos laika periodos, lūdzu, sazinieties ar QIAGEN tehniskā atbalsta dienestu.

Faktiskais RNS stabilizācijas ilgums var atšķirties atkarībā no šūnu RNS veida un izmantotā lejupvērstā lietojuma. Stabilizācijas specifikācijām ir validēts ierobežots skaits transkriptu (FOS un IL1B gēnu transkripti), tāpēc veikspējas raksturlielumi nav noteikti visiem transkriptiem. Laboratorijas darbiniekiem ir jāpārskata ražotāja dati un pašu iegūtie dati, lai noteiktu, vai ir jāveic validācija citiem transkriptiem.

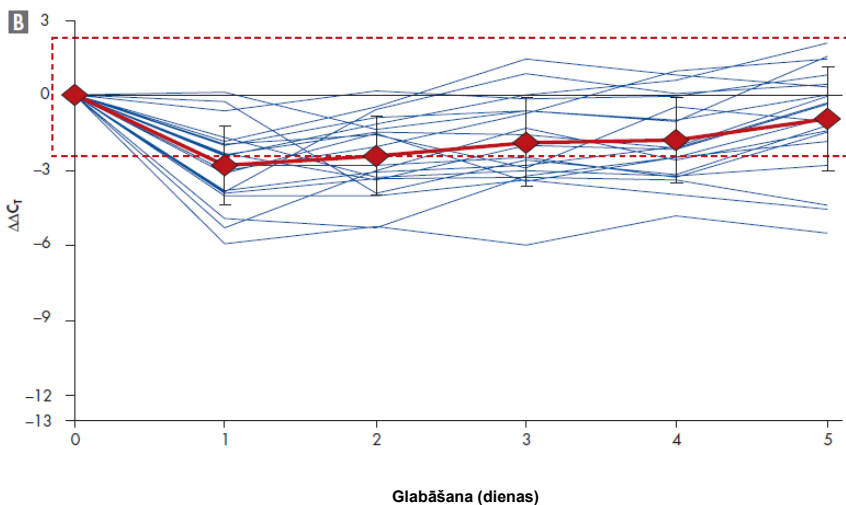
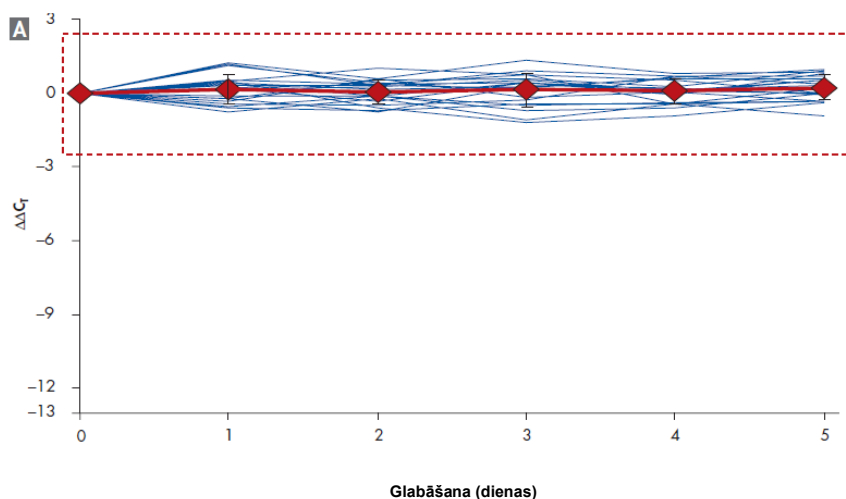
* Pašlaik turpinās ilgtermiņa pētījums par asiņu glabāšanu PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos.



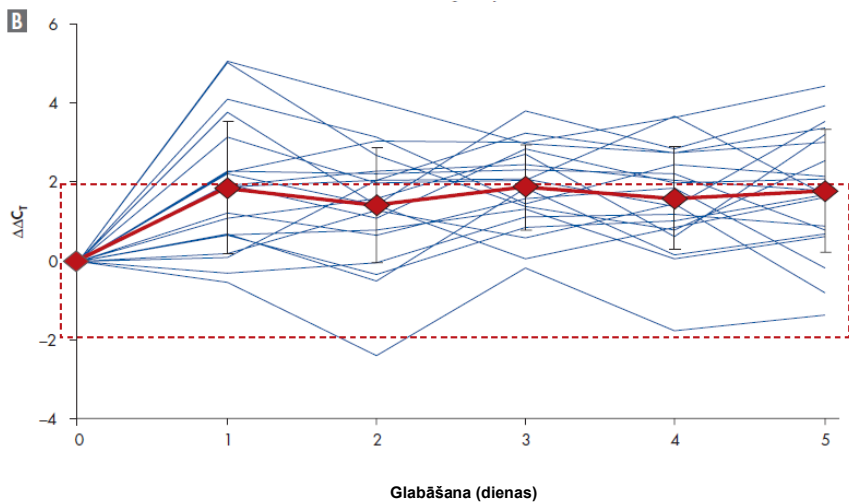
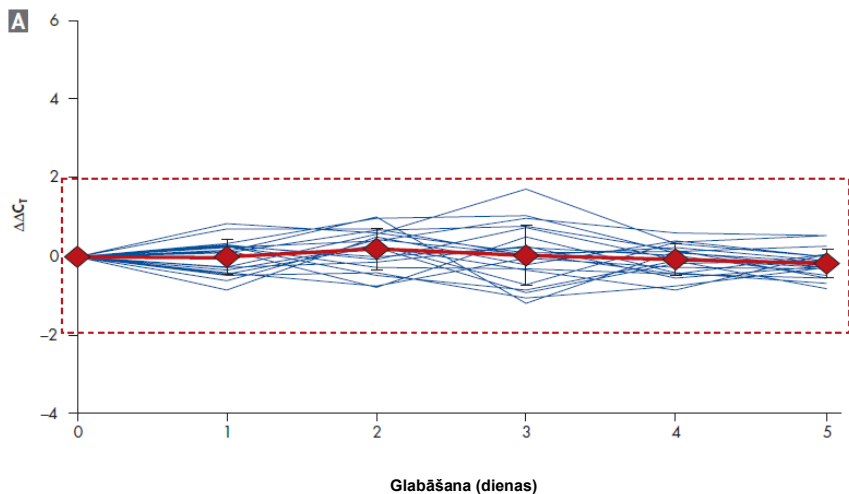
1. attēls. RNS stabilitāte asins paraugos 18–25 °C temperatūrā: FOS. Asinis tika ņemtas no 10 donoriem, no katra ņemot divus parauga eksemplārus, un tās tika 18–25 °C temperatūrā glabātas norādīto dienu skaitu; pēc tam tika izdalīta summārā RNS. **[A]** Asinis tika savāktas un uzglabātas PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT), un summārā RNS tika izdalīta, izmantojot komplektu PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Asinis tika savāktas un uzglabātas standarta asins paraugu savākšanas stobriņos, kā antikoagulantu izmantojot EDTA, un summārā RNS tika izdalīta, izmantojot standarta organiskās ekstrakcijas metodi, kuras pamatā ir RNS attīrīšana ar kvarca membrānu. Relatīvie FOS transkriptu līmeņi tika noteikti, izmantojot reālā laika divu amplikonu RT-PCR, kā iekšējo standartu lietojot 18S rRNS. Grafikā ir attēlotas visu paraugu vērtības, un ir parādītas vidējās vērtības un standartnovirze. Pārtrauktās līnijas norāda testa $\pm 3x$ kopējo precizitāti ($2,34 C_t$).



2. attēls. RNS stabilitāte asins paraugos 18–25 °C temperatūrā: IL1B. Asinis tika ņemtas un summārā RNS tika izdalīta pēc glabāšanas 18–25 °C temperatūrā, kā aprakstīts 1. att. Relatīvie IL1B transkriptu līmeņi tika noteikti, izmantojot reālā laika divu amplikonu RT-PCR, kā iekšējo standartu lietojot 18S rRNS. Grafikā ir attēlotas visu paraugu vērtības, un ir parādītas vidējās vērtības un standartnovirze. Pārtrauktās līnijas norāda testa $\pm 3x$ kopējo precizitāti (1,93 C_t).



3. attēls. RNS stabilitāte asins paraugos 2–8 °C temperatūrā: FOS. Asinis tika ņemtas no 10 donoriem, no katra paņemot divus parauga eksemplārus, un tās tika 2-8°C temperatūrā glabātas norādīto dienu skaitu; pēc tam tika izdalīta summārā RNS. **[A]** Asinis tika savāktas un uzglabātas PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT), un summārā RNS tika izdalīta, izmantojot komplektu PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Asinis tika savāktas un uzglabātas standarta asins paraugu savākšanas stobriņos, kā antikoagulantu izmantojot EDTA, un summārā RNS tika izdalīta, izmantojot standarta organiskās ekstrakcijas metodi, kuras pamatā ir RNS attīrīšana ar kvarca membrānu. Relatīvie FOS transkriptu līmeņi tika noteikti, izmantojot reālā laika divu amplikonu RT-PCR, kā iekšējo standartu lietojot 18S rRNS. Grafikā ir attēlotas visu paraugu vērtības, un ir parādītas vidējās vērtības un standartnovirze. Pārtrauktās līnijas norāda testa $\pm 3x$ kopējo precizitāti ($2,34 C_T$).



4. attēls. RNS stabilitāte asins paraugos 2–8 °C temperatūrā: IL1B. Asinis tika ņemtas un summārā RNS tika izdalīta pēc glabāšanas 2–8 °C temperatūrā, kā aprakstīts 3. att. Relatīvie IL1B transkriptu līmeņi tika noteikti, izmantojot reālā laika divu amplikonu RT-PCR, kā iekšējo standartu lietojot 18S rRNS. Grafikā ir attēlotas visu paraugu vērtības, un ir parādītas vidējās vērtības un standartnovirze. Pārtrauktās līnijas norāda testa $\pm 3x$ kopējo precizitāti ($1,93 C_T$).

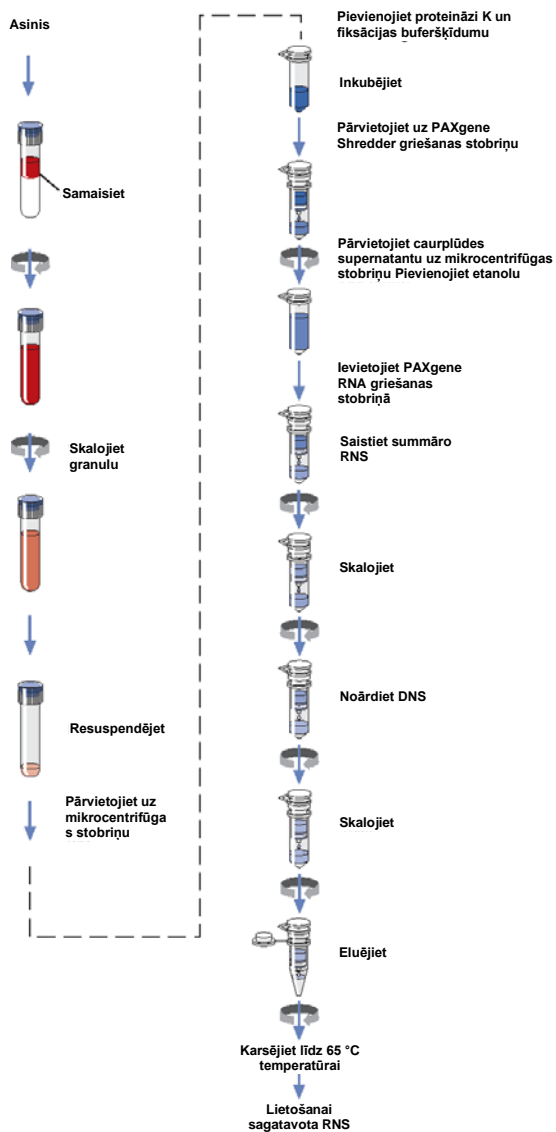
RNS koncentrēšana un izdalīšana

Komplekts PAXgene Blood RNA Kit ir paredzēts summārās RNS izdalīšanai no 2,5 ml cilvēka pilnasiņu, kas savāktas PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT). Process ir vienkāršs, un to var veikt, izmantojot manuālās vai automatizētās procedūras (sk. 5. un 10. att. 20. un 30. lpp.). Abos protokolos izdalīšana sākas ar centrifugēšanas darbību, lai granulētu nukleīnskābes PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT). Granula tiek skalota un resuspendēta, un pēc tam tiek veikta manuāla vai automatizēta RNS izdalīšana. Abos protokolos būtībā tiek veiktas vienādas protokola darbības ar vieniem un tiem pašiem komplekta komponentiem.

Manuāla RNS izdalīšana

Detalizēts skaidrojums: resuspendētā granula tiek inkubēta optimizētos buferšķīdumos kopā ar proteīnāzi K (PK), lai izraisītu proteīnu noārdīšanu. Tiek veikta papildu centrifugēšana ar PAXgene Shredder griešanas stobriņu (PSC), lai homogenizētu šūnu lizātu un noņemtu šūnu atliekas, un caurplūdes frakcijas supernatants tiek pārvietots uz jaunu mikrocentrifūgas stobriņu. Tiek pievienots etanols, lai pielāgotu saistīšanās apstākļus, un lizāts tiek ievietots PAXgene RNA griešanas stobriņā (PRC). Veicot īsu centrifugēšanu, RNS selektīvi saistās ar PAXgene kvarca membrānu, bet kontaminanti izplūst tai cauri. Atlikušie kontaminanti tiek noņemti, veicot vairākas efektīvas skalošanas darbības. Starp pirmo un otro skalošanas darbību membrāna tiek apstrādāta ar DNāzi I (RNFD), lai noņemtu DNS, kas nelielā daudzumā ir saistījusies. Pēc skalošanas darbībām RNS tiek eluēta eluēšanas buferšķīdumā (BR5) un denaturēta karstuma ietekmē.

Summārā RNS, kas izdalīta, izmantojot PAXgene Blood RNA System, ir tīra. Izmantojot manuālo protokolu, A_{260}/A_{280} vērtības ir no 1,8 līdz 2,2, bet $\geq 95\%$ visu paraugu ir atrodams $\leq 1\%$ (masas daļa) genomiskās DNS, kā noteikts kvantitatīvā beta-aktīna gēna sekvences reālā laika PCR. Vismaz 95% paraugu neuzrāda inhibīciju RT-PCR procesā, izmantojot līdž pat 30% eluāta.

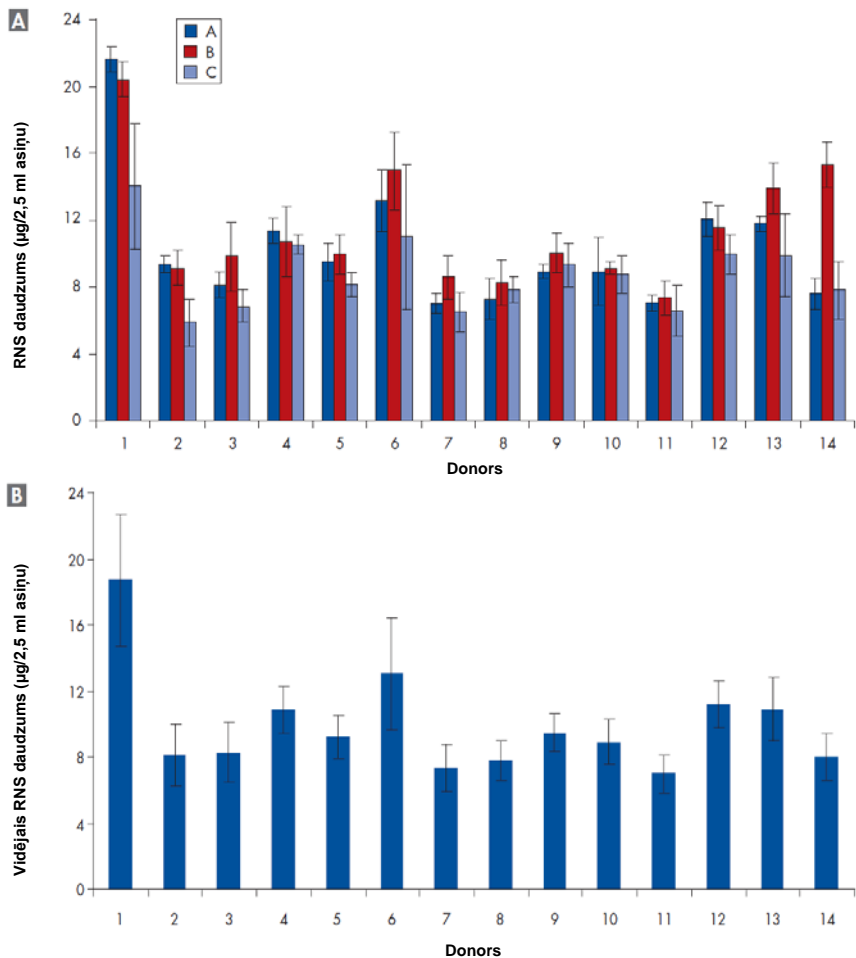


5. attēls. PAXgene Blood RNA manuālā procedūra.

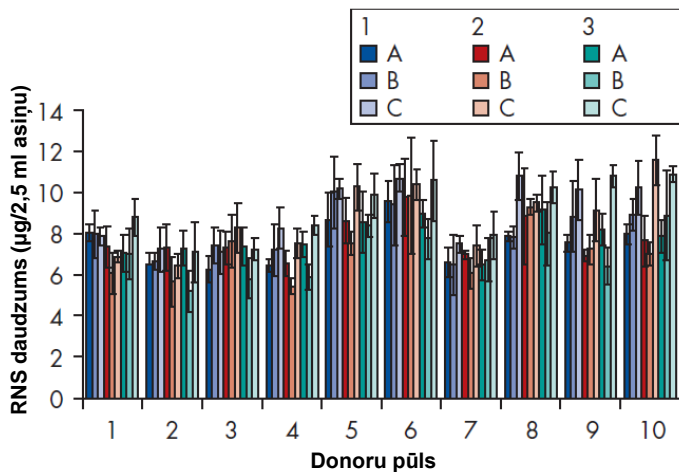
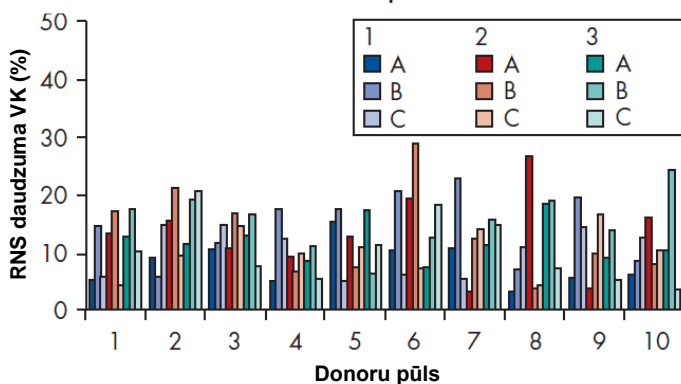
Izmantojot manuālo protokolu, vidējais parauga sagatavošanas laiks (balstoties uz datiem no 12 paraugu sagatavošanas izpildes reizēm) ir aptuveni 90 minūtes*, un roku darba laiks ir tikai 40 minūtes. Iegūtais RNS daudzums no 2,5 ml vesela cilvēka pilnasiņu $\geq 95\%$ apstrādāto paraugu ir $\geq 3 \mu\text{g}$. Iegūtais daudzums ir lielā mērā atkarīgs no donora, tāpēc daudzums katrā atsevišķā gadījumā var atšķirties. Atsevišķiem donoriem PAXgene Blood RNA System nodrošina augsti reproducējamu un atkārtojamu iegūto daudzumu (6. un 7. att., 22. un 23. lpp.) un reproducējamu un atkārtojamu RT-PCR (8. un 9. att., 27. un 28. lpp.), tāpēc tas ir ļoti noturīgs klīniskiem diagnostiskiem izmeklējumiem.

6. attēlā (22. lpp.) ir parādīta sistēmas PAXgene Blood RNA System kopējā atkārtojamība un reproducējamība. Tika veikti papildu pētījumi, lai parādītu dažādu komplekta PAXgene Blood RNA Kit partiju un dažādu operatoru ietekmi uz iegūtā RNS daudzuma un reālā laika RT-PCR izpildes reproducējamību. Šiem pētījumiem tika izmantoti apkopoti asins paraugi, nevis individuāli PAXgene Blood RNA Tubes stobriņi (BRT), tāpēc rezultāti neatspoguļo sistēmas atkārtojamību, ieskaitot atšķirības starp atsevišķām asins paraugu ņemšanas reizēm, bet gan tikai paraugu sagatavošanas atkārtojamību (sk. 7. att., 23. lpp.).

* Kopējais protokola izpildlaiks, ieskaitot PAXgene Blood RNA Tubes stobriņu iepriekšēju apstrādi (centrifugēšanas, granulas skalošanu un granulas resuspendēšanu).



6. attēls. Reproducējama un atkārtojama RNS izdalīšana. No 14 donoriem iegūtus asins paraugus četros eksemplāros katru manuāli apstrādāja 3 tehnikā (A, B, C). Tika izmantoti trīs aprīkojuma komplekti, un visi viena tehnikā sagatavotie paraugi tika apstrādāti, izmantojot vienu un to pašu aprīkojumu. **[A]** Parādītais RNS daudzuma vidējās vērtības un standartnovirze katram atkārtotajam paraugam no vieniem un tiem pašiem donoriem un atšķirīgiem tehnikām. **[B]** 3 dažādi tehnikā apstrādāja divpadsmit atkārtotus asins paraugus no katra no 14 donoriem. Parādītais RNS daudzuma vidējās vērtības un standartnovirze katram paraugam no vieniem un tiem pašiem donoriem un visiem tehnikām. Visiem RNS paraugiem A_{260}/A_{280} attiecība bija no 1,8 līdz 2,2.

A**B**

7. attēls. Iegūtā RNS daudzums atkārtotamība un reproducējamība atšķirīgiem operatoriem un komplekta PAXgene Blood RNA Kit partijām, izmantojot apkopotus asins paraugus. PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT) tika savākti asins paraugi no 30 dažādiem donoriem (12 stobriņi no katra donora, kopā 360 stobriņi). Stobriņu saturs no 3 donoriem tika apkopots un pēc tam atkārtoti sadalīts alikvotos 36 paraugos. Šos 36 paraugus no 3 donoru pūla manuāli apstrādāja 3 dažādi operatori. Katrs operators ekstrakcijai izmantoja 3 dažādas PAXgene Blood RNA Kit partijas un apstrādāja četrus paraugu eksemplārus no katra no 10 donoru pūliem. **[A]** RNS daudzums un standartnovirze katrai operatora–partijas kombinācijai. Četrus asins paraugu eksemplārus no 10 donoru pūliem apstrādāja 3 dažādi operatori (A, B, C) ar katru no 3 komplekta partijām (1, 2, 3). Parādītas iegūtā daudzuma vidējās vērtības (kolonnas) un standartnovirze (kļūdu stabiņi) četriem paraugu eksemplāriem no viena un tā paša donoru pūla dažādiem operatoriem un dažādām komplekta partijām. **[B]** 7.A attēlā ir parādīts RNS daudzuma VK katram donoru pūlam visām operatora–partijas kombinācijām (A, B, C; 1, 2, 3), aprēķinot pēc daudzuma vidējās vērtības un standartnovirzes.

1.A tabula. Reproducējamība katras partijas ietvaros un katram lietotājam izvēlētajos donoru pūlos (1, 6, 9, 10)

| Datu kombinācija | Donoru pūls 1 5,1 x 10 ⁶ šūnas/ml | | | Donoru pūls 6 6,5 x 10 ⁶ šūnas/ml | | |
|-------------------------|---|---------|--------|---|---------|--------|
| | Vidējais daudzums (μg) | SN (μg) | VK (%) | Vidējais daudzums (μg) | SN (μg) | VK (%) |
| 1. partija, lietotājs A | 8,03 | 0,42 | 5 | 9,55 | 0,99 | 10 |
| 1. partija, lietotājs B | 7,98 | 1,17 | 15 | 9,38 | 1,94 | 21 |
| 1. partija, lietotājs C | 7,87 | 0,45 | 6 | 10,71 | 0,65 | 6 |
| 2. partija, lietotājs A | 7,32 | 0,98 | 13 | 9,78 | 1,89 | 19 |
| 2. partija, lietotājs B | 6,09 | 1,04 | 17 | 9,82 | 2,83 | 29 |
| 2. partija, lietotājs C | 6,87 | 0,31 | 4 | 10,37 | 0,74 | 7 |
| 3. partija, lietotājs A | 7,04 | 0,90 | 13 | 8,96 | 0,68 | 8 |
| 3. partija, lietotājs B | 6,98 | 1,22 | 17 | 7,73 | 0,97 | 13 |
| 3. partija, lietotājs C | 8,78 | 0,89 | 10 | 10,59 | 1,94 | 18 |
| Datu kombinācija | Donoru pūls 9 8,4 x 10 ⁶ šūnas/ml | | | Donoru pūls 10 10,2 x 10 ⁶ šūnas/ml | | |
| | Vidējais daudzums (μg) | SN (μg) | VK (%) | Vidējais daudzums (μg) | SN (μg) | VK (%) |
| 1. partija, lietotājs A | 7,52 | 0,41 | 6 | 7,96 | 0,49 | 6 |
| 1. partija, lietotājs B | 8,82 | 1,72 | 19 | 8,90 | 0,76 | 9 |
| 1. partija, lietotājs C | 10,14 | 1,46 | 14 | 10,22 | 1,29 | 13 |
| 2. partija, lietotājs A | 6,92 | 0,27 | 4 | 7,63 | 1,23 | 16 |
| 2. partija, lietotājs B | 7,20 | 0,71 | 10 | 7,00 | 0,56 | 8 |
| 2. partija, lietotājs C | 9,14 | 1,52 | 17 | 11,56 | 1,21 | 10 |
| 3. partija, lietotājs A | 8,18 | 0,76 | 9 | 7,85 | 0,82 | 10 |
| 3. partija, lietotājs B | 6,41 | 0,88 | 14 | 8,88 | 2,17 | 24 |
| 3. partija, lietotājs C | 10,78 | 0,56 | 5 | 10,88 | 0,37 | 3 |

1.B tabula. Reproducējamība katram lietotājam un starp visām partijām izvēlētajos donoru pūšos (1, 6, 9, 10).

| Datu kombinācija | Donoru pūšs 1 5,1 x 10 ⁶ šūnas/ml | | | Donoru pūšs 6 6,5 x 10 ⁶ šūnas/ml | | |
|-----------------------------|---|---------|--------|---|---------|--------|
| | Vidējais daudzums (μg) | SN (μg) | VK (%) | Vidējais daudzums (μg) | SN (μg) | VK (%) |
| Lietotājs A, visas partijas | 7,46 | 0,85 | 11 | 9,43 | 1,22 | 13 |
| Lietotājs B, visas partijas | 7,02 | 1,31 | 19 | 8,98 | 2,09 | 23 |
| Lietotājs C, visas partijas | 7,84 | 0,98 | 13 | 10,56 | 1,15 | 11 |
| Datu kombinācija | Donoru pūšs 9 8,4 x 10 ⁶ šūnas/ml | | | Donoru pūšs 10 10,2 x 10 ⁶ šūnas/ml | | |
| | Vidējais daudzums (μg) | SN (μg) | VK (%) | Vidējais daudzums (μg) | SN (μg) | VK (%) |
| Lietotājs A, visas partijas | 7,54 | 0,72 | 10 | 7,81 | 0,82 | 11 |
| Lietotājs B, visas partijas | 7,48 | 1,50 | 20 | 8,26 | 1,54 | 19 |
| Lietotājs C, visas partijas | 10,02 | 1,34 | 13 | 10,89 | 1,10 | 10 |

1.C tabula. Reproducējamība katras partijas ietvaros un starp visiem lietotājiem izvēlētajos donoru pūšos (1, 6, 9, 10).

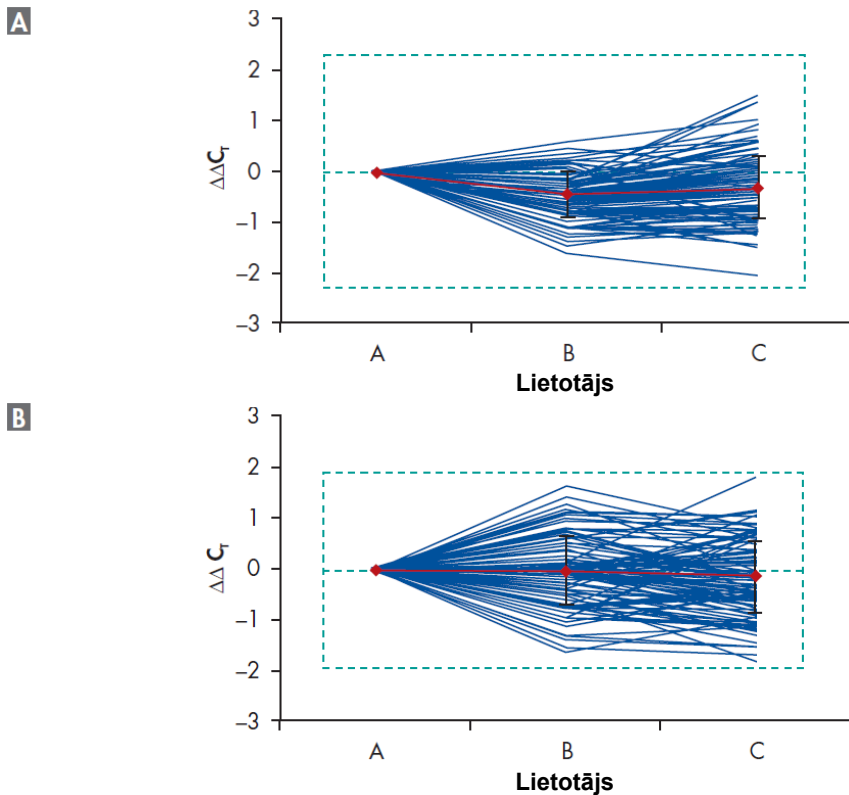
| Datu kombinācija | Donoru pūšs 1 5,1 x 10 ⁶ šūnas/ml | | | Donoru pūšs 6 6,5 x 10 ⁶ šūnas/ml | | |
|----------------------------|---|---------|--------|---|---------|--------|
| | Vidējais daudzums (μg) | SN (μg) | VK (%) | Vidējais daudzums (μg) | SN (μg) | VK (%) |
| 1. partija, visi lietotāji | 7,96 | 0,69 | 9 | 9,88 | 1,34 | 14 |
| 2. partija, visi lietotāji | 6,76 | 0,93 | 14 | 9,99 | 1,84 | 18 |
| 3. partija, visi lietotāji | 7,60 | 1,27 | 17 | 9,09 | 1,71 | 19 |
| Datu kombinācija | Donoru pūšs 9 8,4 x 10 ⁶ šūnas/ml | | | Donoru pūšs 10 10,2 x 10 ⁶ šūnas/ml | | |
| | Vidējais daudzums (μg) | SN (μg) | VK (%) | Vidējais daudzums (μg) | SN (μg) | VK (%) |
| 1. partija, visi lietotāji | 8,83 | 1,63 | 19 | 9,02 | 1,27 | 14 |
| 2. partija, visi lietotāji | 7,75 | 1,36 | 18 | 8,73 | 2,31 | 26 |
| 3. partija, visi lietotāji | 8,46 | 1,99 | 24 | 9,20 | 1,80 | 20 |

1.D tabula. Reproducējamība starp visām partijām un visiem lietotājiem izvēlētajos donoru pūlos (1, 6, 9, 10).

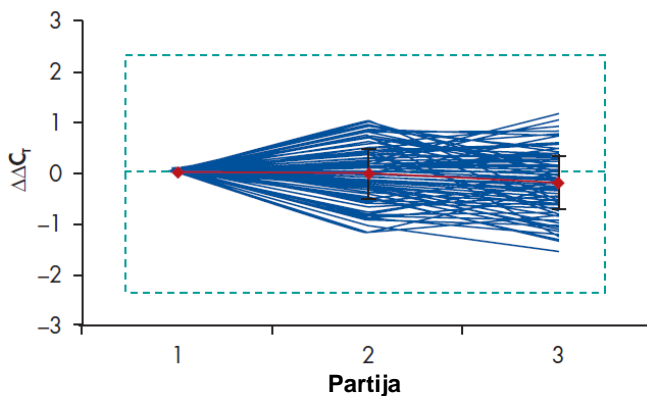
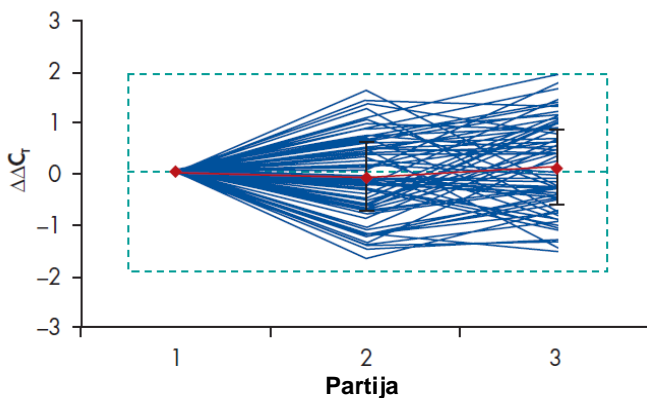
| Datu kombinācija | Donoru pūls 1 5,1 x 10 ⁶ šūnas/ml | | | Donoru pūls 6 6,5 x 10 ⁶ šūnas/ml | | |
|----------------------------|---|---------|--------|---|---------|--------|
| | Vidējais daudzums (μg) | SN (μg) | VK (%) | Vidējais daudzums (μg) | SN (μg) | VK (%) |
| 1. partija, visi lietotāji | 7,44 | 1,09 | 15 | 9,66 | 1,65 | 17 |

| Datu kombinācija | Donoru pūls 9 8,4 x 10 ⁶ šūnas/ml | | | Donoru pūls 10 10,2 x 10 ⁶ šūnas/ml | | |
|----------------------------|---|---------|--------|---|---------|--------|
| | Vidējais daudzums (μg) | SN (μg) | VK (%) | Vidējais daudzums (μg) | SN (μg) | VK (%) |
| 1. partija, visi lietotāji | 8,35 | 1,70 | 20 | 8,99 | 1,80 | 20 |

4 reprezentatīvo donoru pūlu detalizēta analīze. Šie pūli tika izvēlēti pēc balto asins šūnu skaita un atspoguļo balto asins šūnu skaita standarta diapazona augstāko, vidējo un zemāko vērtību ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leikocīti/ml). Balto asins šūnu skaits parāda 3 donoru pūlā iekļauto donoru 3 balto asins šūnu skaita vidējo vērtību.



8. attēls. RT-PCR reproducējamība — starp lietotājiem. 7. attēlā aprakstītajā eksperimentā izdalītā RNS tika izmantota reālā laika RT-PCR. Relatīvie **[A]** FOS un **[B]** IL1B transkriptu līmeņi tika noteikti, izmantojot reālā laika divu amplikonu RT-PCR, kā iekšējo standartu lietojot 18S rRNS. Grafikā ir attēlotas visu paraugu vērtības attiecībā pret 1. lietotāja vērtībām (10 donoru pūli x 3 komplekta partijas x 4 atkārtojumi = 120 datu kopas katram gēnam), un ir parādītas visu paraugu vidējās vērtības (sarkanās līnijas) un standartnovirze (melnie stabiņi). Pārtrauktās līnijas norāda testu $\pm 3x$ kopējo precizitāti (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).

A**B**

9. attēls. RT-PCR reproducējamība — starp komplekta partijām. 7. attēlā aprakstītajā eksperimentā izdalītā RNS tika izmantota reālā laika RT-PCR. Relatīvie **[A]** FOS un **[B]** IL1B transkriptu līmeņi tika noteikti, izmantojot reālā laika divu amplikonu RT-PCR, kā iekšējo standartu lietojot 18S rRNS. Grafikā ir attēlotas visu paraugu vērtības attiecībā pret 1. komplekta partijas vērtībām (10 donoru pūli x 3 lietotāji x 4 atkārtojumi = 120 datu kopas katram gēnam), un ir parādītas visu paraugu vidējās vērtības (sarkanās līnijas) un standartnovirze (melnie stabiņi). Pārtrauktās līnijas norāda testu $\pm 3x$ kopējo precizitāti (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).

2. tabula. 8. un 9. attēlā parādīto RT-PCR datu kopsavilkums.

| Testēšanas sistēma | FOS/18S rRNS tests | | IL1B/18S rRNS tests | |
|--|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Datu salīdzinājums | Vidējais ($\Delta\Delta C_T$) | \pm SN ($\Delta\Delta C_T$) | Vidējais ($\Delta\Delta C_T$) | \pm SN ($\Delta\Delta C_T$) |
| Reproducējamība katram lietotājam un starp visām partijām | | | | |
| Visi lietotāji, 1. partija–1. partija | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Visi lietotāji, 1. partija–2. partija | -0,03 | 0,48 | -0,07 | 0,66 |
| Visi lietotāji, 1. partija–3. partija | -0,21 | 0,52 | 0,11 | 0,71 |
| Reproducējamība katram lietotājam un starp visām partijām | | | | |
| Visas partijas, lietotājs A–lietotājs A | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Visas partijas, lietotājs A–lietotājs B | -0,46 | 0,44 | -0,06 | 0,69 |
| Visas partijas, lietotājs A–lietotājs C | -0,31 | 0,60 | -0,15 | 0,71 |

Lietotājs: tehniķis, veica pētījumu.
Partija: šajā pētījumā izmantotais komplekta partijas numurs.
SN: standartnovirze.
Parādītas vidējās $\Delta\Delta C_T$ vērtības (N = 120) un standartnovirze datiem, kas attēloti 8. un 9. attēlā.

Automatizēta RNS izdalīšana

Paraugu sagatavošana tiek automatizēta, izmantojot standarta ierīci QIAcube® (kat. Nr. 9001882 [110 V], kat. Nr. 9001293 [230 V]; nav iekļauts QIAcube Connect), un tiek veiktas tādas pašas darbības kā manuālajā procedūrā, lai jūs varētu turpināt lietot komplektu PAXgene Blood RNA Kit augstas kvalitātes RNS izdalīšanai. Plašāku informāciju par QIAcube skatiet *QIAcube lietotāja rokasgrāmatā* un vietnē www.qiagen.com/MyQIAcube.

Automatizētais RNS izdalīšanas protokols sastāv no 2 daļām (jeb protokoliem): “PAXgene Blood RNA Part A” (A daļa) un “PAXgene Blood RNA Part B” (B daļa), un starp abām daļām nepieciešama neliela manuāla iejaukšanās (sk. 10. att., 30. lpp.).

izdalīto RNS uz QIAcube termomaisītāja ierīci. Operatoram izvēlnē jāatlasa un jāpalaiž protokols “PAXgene Blood RNA Part B” (PAXgene Blood RNA B daļa), un QIAcube veic denaturāciju karstuma ietekmē.

Vidējais parauga sagatavošanas laiks (balstoties uz datiem no 12 paraugu sagatavošanas izpildes reizēm) ir 151 minūte*, bet, salīdzinot ar manuālo protokolu, būtiski mazāk laika jāvelta roku darbam.

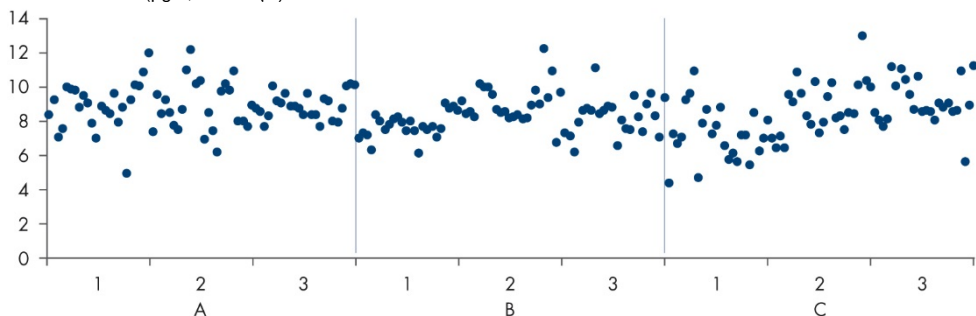
Iegūtais RNS daudzums no 2,5 ml vesela cilvēka pilnasiņu $\geq 95\%$ apstrādāto paraugu ir $\geq 3 \mu\text{g}$. 11. attēlā (32. lpp.) ir parādīts iegūtais RNS daudzums no kopumā 216 paraugiem, kas sagatavoti, izmantojot automatizēto protokolu, 3 komplekta partijas un 3 operatorus. Šiem pētījumiem tika izmantoti apkopotu asins paraugi, nevis individuāli PAXgene Blood RNA Tubes stobriņi (BRT), tāpēc rezultāti neatspoguļo RNS daudzumu, ko paredzēts iegūt no viena parauga eksemplāra, kas iegūts atsevišķā asins parauga ņemšanas reizē. Iegūtais daudzums ir lielā mērā atkarīgs no donora, tāpēc daudzums katrā atsevišķā gadījumā var atšķirties (11. att., 32. lpp.).

Vismaz 95% paraugu neuzrāda inhibīciju RT-PCR procesā, izmantojot līdz pat 30% eluāta. Izmantojot automatizēto protokolu, krusteniskā kontaminācija starp paraugiem nav nosakāma, kā noteikts, veicot kvantitatīvu reālā laika RT-PCR ar ABL1 un FOS transkriptu sekvencēm RNS negatīvos paraugos (ūdens), kas sakārtotas pāros ar RNS pozitīviem paraugiem (cilvēka pilnasinis) vienā izpildes reizē.

Ar sistēmu PAXgene Blood RNA System un automatizēto protokolu izdalītā RNS ir tīra, ko pierāda RT-PCR inhibīcijas neesamība (sk. 11. att., 32. lpp.) un A_{260}/A_{280} vērtības no 1,8 līdz 2,2. $\geq 95\%$ visu paraugu ir atrodams $\leq 1\%$ (masas daļa) genomiskās DNS, kā noteikts kvantitatīvā beta-aktīna gēna sekvences reālā laika PCR. 12. un 13. attēlā (32. un 33. lpp.) ir parādītas A_{260}/A_{280} vērtības un relatīvais genomiskās DNS daudzums kopumā 216 paraugos, kas sagatavoti, izmantojot automatizēto protokolu, 3 komplektu partijas un 3 operatorus.

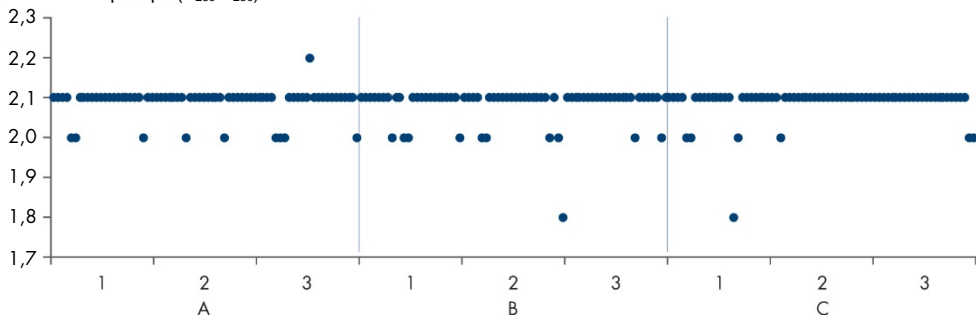
* Kopējais protokola izpildlaiks, ieskaitot PAXgene Blood RNA Tubes stobriņu iepriekšēju apstrādi (centrifugēšanas, granulas skalošanu un granulas resuspendēšanu).

RNS daudzums ($\mu\text{g}/2,5 \text{ ml}$ asiņu)

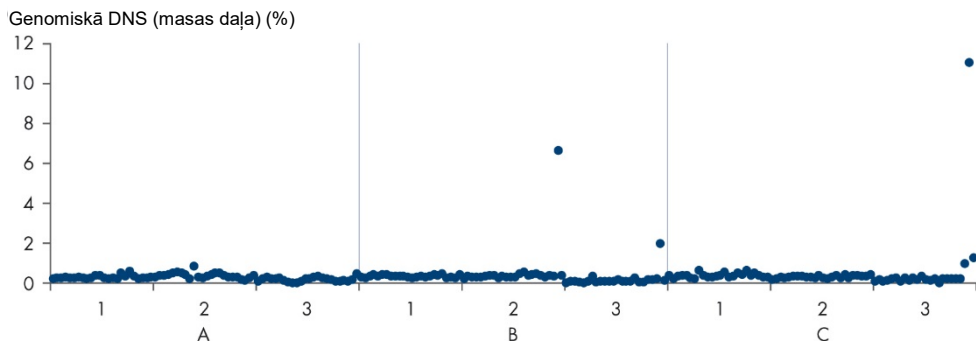


11. attēls. RNS daudzums — automatizēta apstrāde. PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT) tika savākti asins paraugi no 36 dažādiem donoriem (6 stobriņi no katra donora, kopā 216 stobriņi). Stobriņu saturs no 6 donoriem tika apkopots un pēc tam atkārtoti sadalīts alikvotos 36 paraugos. Šos 36 paraugus no 6 donoru pūla manuāli apstrādāja 3 dažādi operatori (A, B, C). Katrs operators automatizētai ekstrakcijai izmantoja 3 dažādas PAXgene Blood RNA Kit partijas (1, 2, 3) un apstrādāja četrus paraugu eksemplārus no katra no 6 donoru pūliem. Parādīts katra atsevišķā parauga RNS daudzums katrai operatora–partijas kombinācijai.

RNS tīrības pakāpe (A_{260}/A_{280})

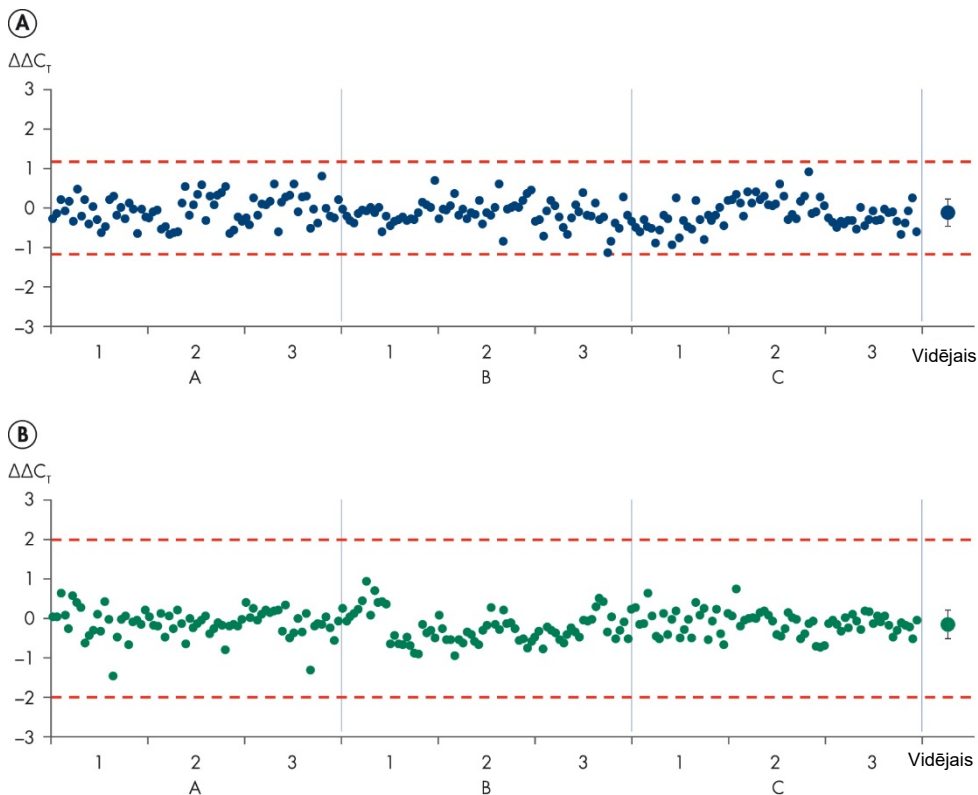


12. attēls. RNS tīrības pakāpe (A_{260}/A_{280} vērtības) — automatizēta apstrāde. 11. attēlā aprakstītajā eksperimentā RNS izdalīšanu veica 3 dažādi operatori (A, B, C), izmantojot 3 dažādas PAXgene Blood RNA Kit partijas (1, 2, 3). Parādītas katra atsevišķā parauga A_{260}/A_{280} vērtības katrai operatora–partijas kombinācijai.



13. attēls. RNS tīrības pakāpe (% genomiskās DNS kontaminācijas) — automatizēta apstrāde. 11. attēlā aprakstītajā eksperimentā RNS izdalīšanu veica 3 dažādi operatori (A, B, C), izmantojot 3 dažādas PAXgene Blood RNA Kit partijas (1, 2, 3). Parādīts genomiskās DNS daudzums (masas daļa) katrā atsevišķajā paraugā katrai operatora-partijas kombinācijai.

RNS izdalīšanas automatizētais protokols, izmantojot sistēmu PAXgene Blood RNA System, nodrošina augsti reproducējamus un atkārtojamus RT-PCR rezultātus, kā parādīts 14. attēlā (34. lpp.), tāpēc tas ir ļoti noturīgs klīniskiem diagnostiskiem izmeklējumiem.



14. attēls. RT-PCR reproducējamība — starp automatizēto un manuālo protokolu. 11. attēlā aprakstītajā eksperimentā RNS izdalīšanu veica 3 dažādi operatori (A, B, C), izmantojot 3 dažādas PAXgene Blood RNA Kit partijas (1, 2, 3) un automatizēto protokolu. Paraleli RNS tika izdalīta no atbilstošajiem atkārtotajiem stobriņiem, izmantojot manuālo protokolu. Relatīvie **[A]** FOS un **[B]** IL1B transkriptu līmeņi tika noteikti, izmantojot reālā laika divu amplikonu RT-PCR, kā iekšējo standartu lietojot 18S rRNS. Iespējamās transkriptu līmeņa atšķirības RNS, kas sagatavota no pāros sakārotiem asins paraugiem, izmantojot abus ekstrakcijas protokolus (automatizēto un manuālo protokolu), tika aprēķinātas, izmantojot $\Delta\Delta C_T$ metodi. Atsevišķas $\Delta\Delta C_T$ vērtības visiem paraugu pāriem (4 atkārtojumi x 6 donoru pūli x 3 komplekta partijas x 3 operatori = 216 pāri katram gēnam) visiem paraugiem diagrammā ir parādītas kā atsevišķi punkti ar vidējām vērtībām (lielāki punkti) un standartnovirzi (melni stabīņi). Pārtrauktās līnijas norāda testu $\pm 3x$ kopējo precizitāti (FOS: 1,16 C_T ; IL1B: 1,98 C_T ; testu precizitāte atšķiras no 1.–4., 8. un 9. attēlā norādītās atšķirīgu testa versiju dēļ).

Aprīkojums un reaģenti, ko nodrošina lietotājs

Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai saņemtu papildinformāciju, iepazīstieties ar attiecīgajām drošības datu lapām (DDL), kas ir pieejamas pie produkta piegādātāja.

Visiem protokoliem

- PAXgene Blood RNA Tubes stobriņi (BRT; kat. Nr. 762165)
- Etanols (96–100% tīrības pakāpe p.a.)
- Pipetes* (10 µl–4 ml)
- Sterili pipešu uzgaļi bez RNāzes, ar aerosola barjeru†
- Cilindrs ar iedaļām‡
- Centrifūga*, kura spēj sasniegt 3000–5000 x g, aprīkota ar svārstīgo rotoru un kausiem PAXgene Blood RNA Tubes stobriņu (BRT) ievietošanai
- Maisītājs*
- Drupināts ledus
- Ūdensnoturīgā pildspalva marķēšanai

Manuālajam protokolam

- Mikrocentrifūga* ar regulējamu ātrumu, kura spēj sasniegt vismaz 1000–8000 x g diapazonu, kaut arī ir pieļaujams mazāks vai lielāks g spēka rādītājs (detalizētu informāciju sk. protokola darbībā), aprīkota ar rotoru 2 ml mikrocentrifūgas stobriņiem

* Pārļiecinieties, vai instrumenti ir regulāri pārbaudīti, apkopti un kalibrēti saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.

† Noteikti iepazīstieties ar RNS apstrādes vadlīnijām (A pielikums, 64. lpp.).

‡ Etanola pievienošanai buferšķīduma BR4 koncentrātam.

- Maisītājs-inkubators*, kurš spēj veikt inkubāciju 55 °C un 65 °C temperatūrā un sakratīšanu ar ≥400 apgr./min., nepārsniedzot 1400 apgr./min. (piemēram, Eppendorf® Thermomixer Compact vai ekvivalents)

Automatizētajam protokolam

- Ierīce QIAcube* (QIAGEN, kat. Nr. 9001882 [110 V], kat. Nr. 9001293 [230 V])
- Šķēres

QIAcube palīgmateriāli

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

QIAcube piederumi

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

* Pārliecinieties, vai instrumenti ir regulāri pārbaudīti, apkopti un kalibrēti saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.

[†] Iekļauti arī sākuma komplektā Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, kat. Nr. 990395)

Svarīgas piezīmes

QIAcube lietošana

Obligāti iepazīstieties ar QIAcube darbības principiem. Pirms PAXgene Blood RNA automatizēto protokolu izmantošanas, lūdzu, izlasiet *QIAcube lietotāja rokasgrāmatu* un visu QIAcube komplektā iekļauto papildinformāciju, pievēršot īpašu uzmanību drošības informācijai.

Ierīces QIAcube ieslēgšana

Aizveriet QIAcube durvis un ieslēdziet ierīci QIAcube ar ieslēgšanas/izslēgšanas slēdzi (sk. 15. att., 38. lpp.).

Atskan skaņas signāls, un tiek parādīts sākuma ekrāns. Instruments automātiski veic inicializēšanas pārbaudes.

Protokolu instalēšana ierīcē QIAcube

Lai ierīcē QIAcube varētu veikt pirmo RNS sagatavošanu, vispirms ir jāinstalē protokoli. Instalējiet protokolus "PAXgene Blood RNA Part A" un "PAXgene Blood RNA Part B".

Protokoli ir pieejami vietnē **www.qiagen.com/MyQIAcube**, tos nepieciešams lejupielādēt QIAcube komplektācijā iekļautajā USB atmiņas ierīcē un pārsūtīt uz ierīci QIAcube, izmantojot USB portu.

Izmantojot USB portu, kas atrodas aiz aizsargpaneļa (sk. 15. att., 38. lpp.), ierīci QIAcube var savienot ar USB atmiņas ierīci (iekļauta QIAcube komplektācijā). Izmantojot USB portu, var arī pārsūtīt no ierīces QIAcube uz USB atmiņas ierīci datu failus, piemēram, žurnālfailus vai pārskata failus.



USB portu ir paredzēts izmantot tikai ar QIAGEN nodrošināto USB atmiņas ierīci. Nepievienojiet šim portam citas ierīces.



Nenoņemiet USB atmiņas ierīci, kamēr tiek lejupielādēti protokoli vai pārsūtīti datu faili, kā arī protokolu izpildes laikā.



15. attēls. Ierīces QIAcube priekšpuses skats.

1

Skārienekrāns

2

Durvis

3

RS232 seriālais ports aiz aizsargpaneļa (to paredzēts lietot tikai QIAGEN instrumentu servisa speciālistiem)

4

USB ports aiz aizsargpaneļa

5

Ieslēgšanas/izslēgšanas slēdzis

6

Atkritumu atvilktnē

Ierīces QIAcube uzpilde

Lai taupītu laiku, uzpildi var veikt vienas vai abu 10 minūšu ilgo centrifugēšanas darbību laikā (3. un 5. darbība), kā aprakstīts sadaļā “Protokols: automatizēta summārās RNS izdalīšana no PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT) savāktām cilvēka pilnasinām”, 55. lpp.

Reaģentu pudeles

Pirms katras izpildes reizes ierīcē QIAcube rūpīgi piepildiet 4 reaģentu pudeles ar 3. tabulā norādītajiem reaģentiem līdz maksimālā līmeņa indikatoram vai, ja tas nav iespējams, līdz līmenim, ko nodrošina komplektā PAXgene Blood RNA Kit iekļautais buferšķīdumu daudzums. Skaidri marķējiet pudeles un vāciņus, norādot buferšķīdumu nosaukumus, un ielieciet uzpildītās reaģentu pudeles atbilstošajās pozīcijās reaģentu pudelīšu statīvā. Ievietojiet statīvu QIAcube darba platē, kā parādīts (16. un 17. att., 40 un 41. lpp.).



Buferšķīduma BR2 komplektā iekļautais daudzums nepiepildīs reaģenta pudeli līdz indikatoram. Buferšķīdumi BR3 un BR4, iespējams, nepiepilda pudeli līdz indikatora līmenim, ja iepriekšējās izpildes reizēs ir apstrādāti vairāki paraugi.



Pirms pudeļu ievietošanas darba platē obligāti noņemiet pudeļu vāciņus.

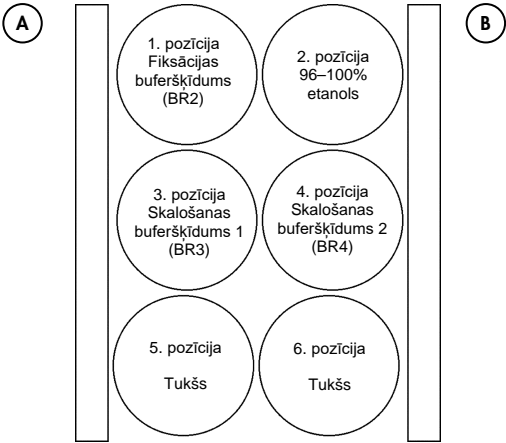


Ar buferšķīdumu tilpumu, kas iekļauts komplektā PAXgene Blood RNA Kit (50), pietiek ne vairāk kā 7 RNS izdalīšanas izpildes reizēm ierīcē QIAcube, vienā izpildes reizē apstrādājot 2–12 paraugus. Parasti nav ieteicams veikt izpildes ar nelielu paraugu skaitu, lai ar vienu komplektu varētu apstrādāt kopumā 50 paraugus, veicot ne vairāk kā 7 RNS izdalīšanas izpildes. Veicot vairāk nekā 7 RNS izdalīšanas izpildes, pēdējo paraugu apstrādei buferšķīdumu var nepietikt.

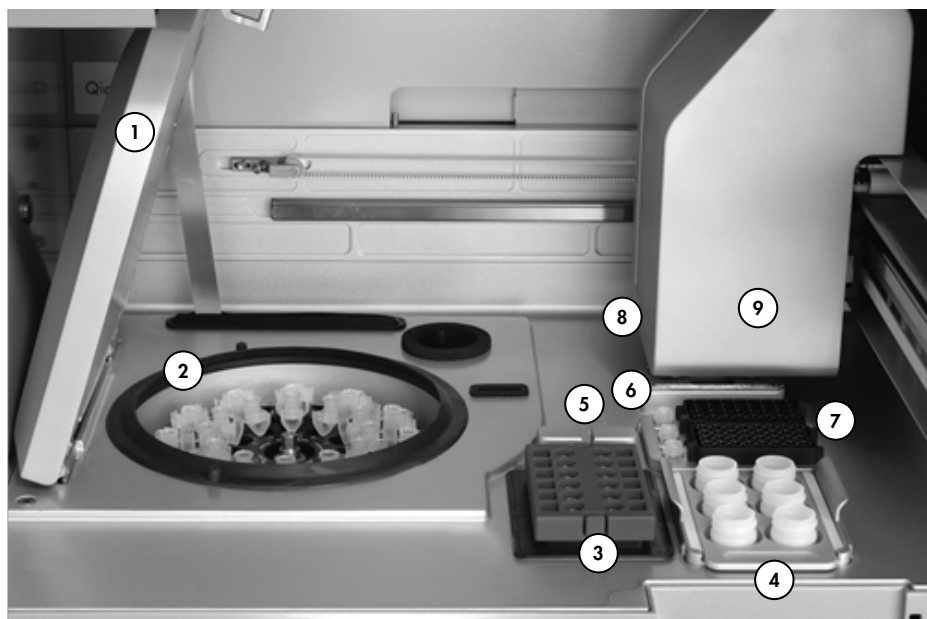
3. tabula. Pozīcijas reaģentu pudeļu statīvā

| Pozīcija | Reaģents |
|----------|----------------------------------|
| 1 | Fiksācijas buferšķīdums (BR2) |
| 2 | 96–100% etanols |
| 3 | Skalošanas buferšķīdums 1 (BR3) |
| 4 | Skalošanas buferšķīdums 2 (BR4)* |
| 5 | – (atstāriet tukšu) |
| 6 | – (atstāriet tukšu) |

* Skalošanas buferšķīdums 2 (BR4) tiek piegādāts koncentrāta veidā. Pirms pirmās lietošanas reizes pievienojiet 4 reizes lielāku tilpumu etanola (96–100% tīrības pakāpe p.a.), lai iegūtu darba šķīdumu (ievērojiet norādījumus uz pudeles).



16. attēls. Reaģentu pudeļu statīva ievietošana. [A] Pozīciju un pudeļu satura shēma reaģentu pudeļu statīvā. [B] Statīva ievietošana ierīcē QIAcube.



17. attēls. Ierīces QIAcube iekšpuses skats.

- | | |
|---------------------------|---|
| ① Centrifūgas vāks | ⑥ Mikrocentrifūgas stobriņu ligzdas |
| ② Centrifūga | ⑦ Uzgaļu statīvi |
| ③ Maisītājs | ⑧ Utilizācijas ligzdas uzgaļiem un stobriņiem |
| ④ Reaģentu pudeļu statīvs | ⑨ Robotizēta svira |
| ⑤ Uzgaļu sensors | |

Griešanas stobriņi (PRC, PSC), mikrocentrifūgas stobriņi (MCT) un QIAcube plastmasas piederumi

Ievietojiet 2 ar filtru uzgaļiem Filter-Tips 1000 µl piepildītas uzgaļu statīvus ierīcē QIAcube (sk. 17. att., 41. lpp.). Kad nepieciešams, papildiniet statīvus ar uzgaļiem.



Izmantojiet tikai 1000 µl filtru uzgaļus, kas paredzēti lietošanai ierīcē QIAcube.

Marķējiet katru parauga rotora adapteri un mikrocentrifūgas stobriņu (MCT), izmantojot ūdensnoturīgo pildspalvu. Atveriet izmantojamās PAXgene Shredder griešanas stobriņus (PSC) un ar šķērēm pilnībā nogrieziet vāciņus (sk. 18. att., 43. lpp.).



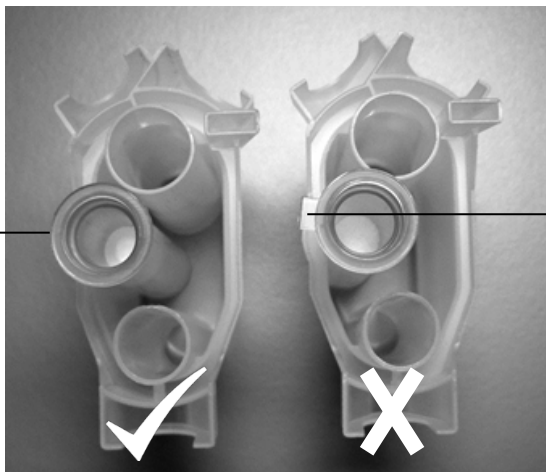
Lai QIAcube robotizētais satvērējs darbotos pareizi, pilnībā noņemiet (nogrieziet) vāciņus un visas plastmasas daļas, kas vāciņu savieno ar PAXgene Shredder griešanas stobriņiem (PSC; sk. 16. att.). Pretējā gadījumā robotizētais satvērējs nevar pareizi satvert griešanas stobriņus (PSC, PRC).

Ievietojiet PAXgene RNA griešanas stobriņu (PRC), PAXgene Shredder griešanas stobriņu (PSC, bez vāciņa) un marķēto mikrocentrifūgas stobriņu (MCT) atbilstošajās pozīcijās katrā no marķētajiem rotora adapteriem, kā parādīts 4. tabulā un 19. attēlā (43. lpp.).



Pārliecinieties, vai griešanas stobriņa (PRC) un mikrocentrifūgas stobriņa (MCT) vāciņi ir nobīdīti uz leju līdz līdzdu apakšdaļai rotora adaptera malā; pretējā gadījumā centrifugēšanas laikā vāciņi nolūzīs.

Pareizi
noņemts
stobriņa
vāciņš



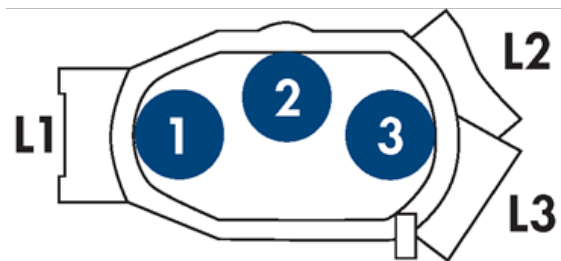
Nepareizi
noņemts
stobriņa
vāciņš — daļa
vāciņa joprojām
ir piestiprināta

18. attēls. PAXgene Shredder griešanas stobriņu (PSC) ievietošana. PAXgene Shredder griešanas stobriņš (PSC) jāievieto rotora adaptera vidējā pozīcijā. Pirms stobriņa (PSC) ievietošanas nogrieziet vāciņu.

4. tabula. Laboratorijas piederumi rotora adapterī

| Pozīcija | Reaģents | Vāciņa pozīcija |
|----------|--|-----------------|
| 1 | PAXgene RNA griešanas stobriņš (sarkans, PRC) | L1 |
| 2 | PAXgene Shredder griešanas stobriņš (violets, PSC) (pirms ievietošanas rotora adapterī nogrieziet vāciņu) | — |
| 3 | Mikrocentrifūgas stobriņš (MCT)* | L3 |

* Izmantojiet komplektā PAXgene Blood RNA Kit iekļautos mikrocentrifūgas stobriņus (1,5 ml).



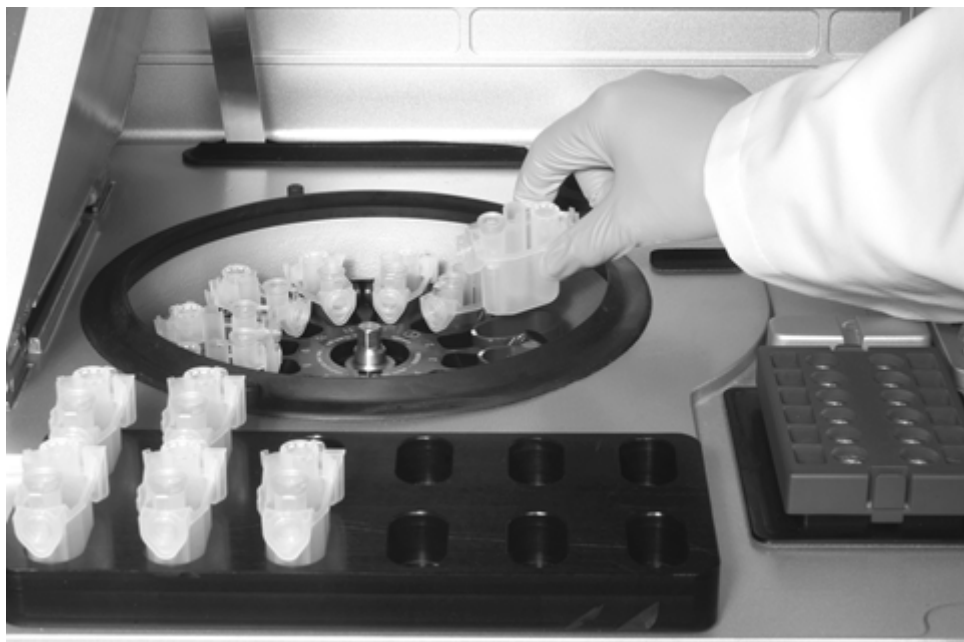
19. attēls. Pozīcijas rotora adapterī. Rotora adapterim ir trīs stobriņu pozīcijas (1–3) un trīs vāciņu pozīcijas (L1–L3).

Centrifūgas uzpilde

Ievietojiet saliktos rotoru adapterus centrifūgas kausos, kā tālāk parādīts 20. att.

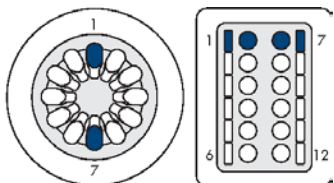


Ja apstrādājat mazāk nekā 12 paraugus, noslogojiet centrifūgas rotoru radiāli līdzsvaroti (sk. 21. att., 45. lpp.). Pirms tiek sākta protokola izpilde, ir jāievieto visi centrifūgas kausi, pat ja paredzēts apstrādāt mazāk nekā 12 paraugus. Nevar apstrādāt vienu paraugu vai 11 paraugus.

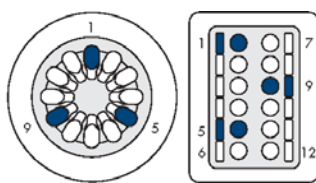


20. attēls. Centrifūgas uzpilde. Ievietojiet saliktos rotoru adapterus centrifūgas kausos.

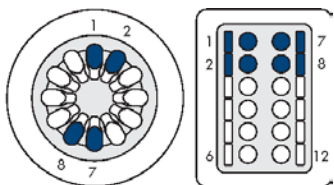
2 paraugi



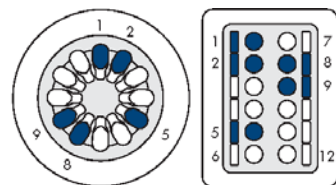
3 paraugi



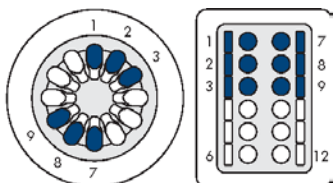
4 paraugi



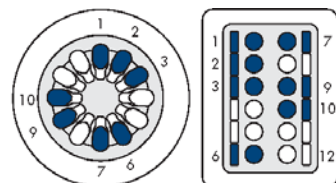
5 paraugi



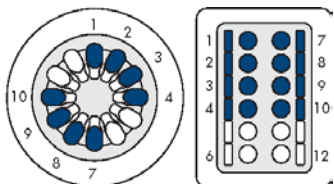
6 paraugi



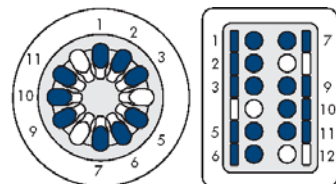
7 paraugi



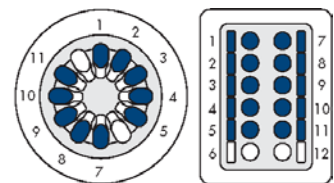
8 paraugi



9 paraugi



10 paraugi



21. attēls. Centrifūgas un maisītāja uzpilde. Parādītas centrifūgas un maisītāja pozīcijas divu (2 paraugi) līdz desmit (10 paraugi) paraugu apstrādei. Nevar apstrādāt vienu paraugu vai 11 paraugus.

Apstrādes stobriņi (PT)

Izņemiet apstrādes stobriņus (PT), ja tādi centrifūgas stobriņu ligzdās palikuši no iepriekšējām izpildes reizēm (sk. 17. att., 41. lpp.). Piepildiet 3 apstrādes stobriņus (PT) ar 5. tabulā norādīto reaģentu daudzumu atbilstoši paraugu skaitam izpildes reizē.

DNāzes I inkubācijas maisījumam pipetējiet norādīto tilpumu DNS noārdīšanas buferšķīduma (RDD) apstrādes stobriņā (PT) un pievienojiet norādīto tilpumu DNāzes I (RNFD) rezerves standartšķīduma. Lai samaisītu, visu maisījumu 3 reizes uzmanīgi pipetējiet uz augšu un uz leju, izmantojot 1000 µl pipetes uzgali.

Izmantojiet komplektā PAXgene Blood RNA Kit iekļautos 2 ml apstrādes stobriņus (PT). Skaidri marķējiet stobriņus (PT), norādot reaģentu nosaukumus, un ievietojiet tos atbilstošajā pozīcijā mikrocentrifūgas stobriņu ligzdās, kā norādīts 6. tabulā (47. lpp.).



DNāze I (RNFD) ir īpaši jutīga pret fizikālu denaturāciju. Maisīšanai izmantojiet tikai pipetēšanu ar liela diametra pipešu uzgaļiem, lai samazinātu bīdi. Nesaskaliniet.



Pipetējiet tikai nepieciešamo tilpumu, kā norādīts 5. tabulā.

5. tabula. Apstrādes stobriņos nepieciešamais reaģentu tilpums mikrocentrifūgas stobriņu ligzdās

| Paraugu skaits | Reaģentu tilpums norādītajam skaitam paraugu (µl) | | |
|----------------|---|------------------------------------|------------------------------|
| | Proteināze K (PK) | DNāzes I inkubācijas maisījums | Eluēšanas buferšķīdums (BR5) |
| 2 | 126 | 187 (23 DNāze I + 164 Buffer RDD) | 313 |
| 3 | 170 | 261 (33 DNāze I + 228 Buffer RDD) | 399 |
| 4 | 213 | 334 (42 DNāze I + 292 Buffer RDD) | 486 |
| 5 | 256 | 407 (51 DNāze I + 356 Buffer RDD) | 572 |
| 6 | 299 | 481 (60 DNāze I + 421 Buffer RDD) | 658 |
| 7 | 342 | 554 (69 DNāze I + 485 Buffer RDD) | 745 |
| 8 | 386 | 627 (78 DNāze I + 549 Buffer RDD) | 831 |
| 9 | 429 | 701 (88 DNāze I + 613 Buffer RDD) | 918 |
| 10 | 472 | 775 (97 DNāze I + 678 Buffer RDD) | 1004 |
| 12 | 558 | 921 (115 DNāze I + 806 Buffer RDD) | 1177 |

6. tabula. Mikrocentrifūgas stobriņu ligzdas

| | Pozīcija | | |
|--------|--------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| | A | B | C |
| Saturs | Proteināze K (PK) | DNāzes I inkubācijas maisījums | Eluēšanas buferšķīdums (BR5) |
| Trauks | Apstrādes stobriņš (PT)* | Apstrādes stobriņš (PT)* | Apstrādes stobriņš (PT)* |

* Izmantojiet komplektā PAXgene Blood RNA Kit iekļautos 2 ml apstrādes stobriņus (PT).

Protokols: manuāla summārās RNS izdalīšana no PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT) savāktām cilvēka pilnasinīm

Svarīga informācija pirms darba sākšanas

- Pārliecinieties, vai komplekta iepakojums ir neskarts un bez bojājumiem un vai nav radusies buferšķīdumu noplūde. Nelietojiet komplektu, ja tas ir bojāts.
- Izmantojot pipeti, pārliecinieties, vai tai ir iestatīts pareizs tilpums un vai šķidrums tiek rūpīgi un pilnībā aspirēts un dozēts.
- Lai nepieļautu paraugu ievietošanu nepareizajos stobriņos vai griešanas stobriņos, nodrošiniet, lai visi stobriņi un griešanas stobriņi būtu atbilstoši marķēti, izmantojot ūdensnoturīgo pildspalvu. Marķējiet katra stobriņa vāciņu un korpusu (PT, MCT). Griešanas stobriņiem marķējiet apstrādes stobriņu (PT) korpusu. Pēc šķidruma ievietošanas noslēdziet visus stobriņu un griešanas stobriņus.
- Paraugu un buferšķīdumu izšķakstīšanās procedūras laikā var samazināt iegūtās RNS daudzumu un tās tīrību.
- Ja vien nav norādīts citādi, visas šī protokola darbības, ieskaitot centrifugēšanas darbības, ir jāveic istabas temperatūrā (15–25 °C).

Nukleīnskābju amplifikācijas tehnoloģijas ir ļoti jutīgas, tāpēc, apstrādājot paraugus, ir jāievēro tālāk aprakstītie piesardzības pasākumi, lai izvairītos no krusteniskās kontaminācijas.

- Uzmanīgi pipetējiet paraugu griešanas stobriņā (PRC, PSC), nesamitrinot stobriņa malu.
- Starp šķidrumu pārvešanas reizēm vienmēr nomainiet pipešu uzgaļus. Izmantojiet pipešu uzgaļus ar aerosola barjeru.
- Ar pipetes galu nepieskarieties griešanas stobriņa (PRC, PSC) membrānai.

- Pēc mikrocentrifūgas stobriņa (MCT) saskalošanas vai sildīšanas īsi to centrifugējiet, lai noņemtu vāka iekšpusē esošos pilienus.
- Visu procedūras laiku izmantojiet aizsargcimdus. Ja cimdi saskaras ar paraugu, nekavējoties nomainiet cimdus.
- Pirms griešanas stobriņa (PRC, PSC) ievietošanas mikrocentrifūgā noslēdziet to. Centrifugējiet, kā norādīts procedūras aprakstā.
- Vienlaikus atveriet tikai vienu griešanas stobriņu (PRC, PSC) un uzmanieties, lai neradītu aerosolu.
- Lai paralēli efektīvi apstrādātu vairākus paraugus, papildiet statīvu ar apstrādes stobriņiem (PT), kuros pēc centrifugēšanas var pārvietot griešanas stobriņus (PRC, PSC). Izmetiet izmantotos apstrādes stobriņus (PT), kuros atrodas caurplūdes materiāls, un jaunus apstrādes stobriņus (PT) ar griešanas stobriņiem (PRC, PSC) ievietojiet tieši mikrocentrifūgā.

Pirms darba sākšanas veicamās darbības

- Asinis jāsavāc PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT), kā norādīts *PAXgene Blood RNA Tube rokasgrāmātā*. Ja nepieciešams, skatiet C pielikumu (67. lpp.), kur ir sniegti ieteikumi par darbu ar PAXgene Blood RNA Tubes stobriņiem (BRT).
- Nodrošiniet, lai PAXgene Blood RNA Tubes stobriņi (BRT) pēc asins paraugu savākšanas vismaz 2 stundas tiktu inkubēti istabas temperatūrā, lai nodrošinātu pilnīgu asins šūnu līzi. Inkubējot PAXgene Blood RNA Tube stobriņus (BRT) visu nakti, var palielināt iegūto daudzumu. Ja PAXgene Blood RNA Tube stobriņš (BRT) pēc asins parauga savākšanas ir glabāts 2–8 °C, –20 °C vai –70 °C temperatūrā, vispirms ļaujiet tam sasniegt istabas temperatūru un pēc tam pirms procedūras sākšanas vismaz 2 stundas glabāiet to istabas temperatūrā.
- Izlasiet 9. lpp. sniegto drošības informāciju.
- Izlasiet vadlīnijas par RNS apstrādi (A pielikums, 64. lpp.).
- Pārliedziniet, vai instrumenti, piemēram, pipetes un maisītājs-inkubators, ir regulāri pārbaudīti un kalibrēti saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.

- Maisītājs-inkubators ir nepieciešams 5. un 20. darbībā. Iestatiet maisītājam-inkubatoram temperatūru 55 °C.
- Buferšķīdumā (BR2) glabāšanas laikā var rasties nogulsnes. Ja nepieciešams, sasildiet līdz 37 °C temperatūrai, lai tās izšķīdinātu.
- Skalošanas buferšķīdums 2 (BR4) tiek piegādāts koncentrāta veidā. Pirms pirmās lietošanas reizes pievienojiet 4 reizes lielāku tilpumu etanola (96–100% tīrības pakāpe p.a.), lai iegūtu darba šķīdumu (ievērojiet norādījumus uz pudeles).
- Ja DNāzes komplektu bez RNāzes lietojat pirmo reizi, sagatavojiet DNāzes I rezerves standartšķīdumu. Izšķīdiniet cieto DNāzi I (RNFD; 1500 Kunitz vienības)* 550 µl komplektā iekļautā DNāzes resuspendēšanas buferšķīduma (DRB). Atverot flakonu, rīkojieties uzmanīgi, lai nezaudētu daļu DNāzes I (RNFD). Nesaskaliniet pagatavoto DNāzes I (RNFD) šķīdumu. DNāze I ir īpaši jutīga pret fizikālu denaturāciju. Lai maisītu, drīkst izmantot tikai stobriņa uzmanīgu apgriešanu.
- Pašreizējie dati rāda, ka pagatavotu DNāzes I (RNFD) šķīdumu var glabāt 2–8 °C temperatūrā līdz pat 6 nedēļām. Lai DNāzi I (RNFD) uzglabātu ilgstoši, izlejiet rezerves standartšķīdumu no stikla flakona, sadaliet to vienai lietošanas reizei paredzētās alikvotās daļās (izmantojiet komplektā iekļautos 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņus (MCT); to pietiek 5 alikvotām daļām) un glabājiet –20 °C temperatūrā līdz pat 9 mēnešiem. Atkausētas alikvotās daļas var glabāt 2–8 °C temperatūrā līdz pat 6 nedēļām. Pēc atkausēšanas alikvotās daļas nedrīkst atkārtoti sasaldēt.
- Gatavojot DNāzes I (RNFD) šķīdumu un to sadalot alikvotās daļās, obligāti ievērojiet RNS apstrādes vadlīnijas (A pielikums, 64. lpp.).

* Kunitz vienības parasti tiek izmantotas DNāzes I mērīšanai, un tās ir definētas kā DNāzes I daudzums, kas rada A_{260} pieaugumu par 0,001 minūtē/mililitrā pie temperatūras 25 °C un pH 5,0, kā substrātu izmantojot augsti polimerizētu DNS (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 un 363).

Procedūra

1. Centrifugējiet PAXgene Blood RNA Tube stobriņu (BRT) 10 minūtes ar 3000–5000 x g, izmantojot svārstīgo rotoru.



Pārliecinieties, vai asins paraugs ir vismaz 2 stundas istabas temperatūrā (15–25 °C) inkubēts PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT), lai sasniegtu asins šūnu pilnīgu līzi.



Rotorā ir jābūt stobriņu adapteriem, kas paredzēti stobriņiem ar noapaļotu galu. Ja tiek izmantoti citu veidu stobriņu adapteri, stobriņi centrifugēšanas laikā var saplīst.

2. Noņemiet supernatantu, to nolejot vai pipetējot. Pievienojiet granulai 4 ml ūdens, kas nesatur RNāzi (RNFW), un noslēdziet stobriņu ar jaunu sekundāro BD Hemogard aizdari (iekļautas komplektā).

Ja supernatants tiek noliets, rīkojieties uzmanīgi, lai nesabojātu granulu, un nosusiniet stobriņa malu ar tīru papīra dvieļi.

3. Saskaliniet, līdz ir redzams, ka granula ir izšķīdusi, un 10 minūtes centrifugējiet ar 3000–5000 x g, izmantojot svārstīgo rotoru. Noņemiet un izmetiet visu supernatantu.

Nelielas atliekas, kas paliek supernatantā pēc saskalošanas, bet pirms centrifugēšanas, neietekmē procedūru.



Nepilnīga supernatanta noņemšana var kavēt līzi un izšķīdināt lizātu, tādējādi ietekmējot apstākļus, kuros RNS saistās ar PAXgene membrānu.

4. Pievienojiet 350 µl resuspendēšanas buferšķīduma (BR1) un saskalojiet, līdz ir redzams, ka granula ir izšķīdusi.
5. Pipetējiet paraugu 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņā (MCT). Pievienojiet 300 µl fiksācijas buferšķīduma (BR2) un 40 µl proteināzes K (PK). Saskalojot maisiet 5 sekundes un 10 minūtes inkubējiet 55 °C temperatūrā, izmantojot maisītāju-inkubatoru ar 400–1400 apgr./min. Pēc inkubācijas iestatiet maisītājam-inkubatoram temperatūru 65 °C (20. darbībai).



Pirms pievienošanas paraugam nesamaisiet kopā fiksācijas buferšķīdumu (BR2) un proteināzi K (PK).

6. Pipetējiet lizātu tieši PAXgene Shredder griešanas stobriņā (PSC; violets), kas ievietots 2 ml apstrādes stobriņā (PT), un centrifugējiet 3 minūtes ar maksimālo ātrumu (bet nepārsniedzot 20 000 x g).



Uzmanīgi pipetējiet lizātu griešanas stobriņā (PSC) un vizuāli pārbaudiet, vai viss lizāts pilnībā ir pārvietots uz griešanas stobriņu (PSC).

Lai neradītu stobriņu (PSC un PT) bojājumus, nepārsniedziet 20 000 x g.



Daži paraugi bez centrifugēšanas var izplūst caur PAXgene Shredder griešanas stobriņu (PSC). To izraisa dažu paraugu zemā viskozitāte, un tā nav uzskatāma par produkta kļūmes pazīmi.

7. Uzmanīgi pārvietojiet visu caurplūdes frakcijas supernatantu uz jaunu 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņu (MCT), nebojājot apstrādes stobriņā esošo granulu.
8. Pievienojiet 350 µl etanola (96–100% tīrības pakāpe p.a.). Saskalinot samaisiet un īsi centrifugējiet (1–2 sekundes ar 500–1000 x g), lai noņemtu vāka iekšpusē esošos pilienus.



Centrifugēšanas ilgums nedrīkst pārsniegt 1–2 sekundes; pretējā gadījumā var veidoties nukleīnskābju granulas un samazināties iegūtais summārās RNS daudzums.

9. Pipetējiet 700 µl parauga PAXgene RNA griešanas stobriņā (PRC; sarkans), kas ievietots 2 ml apstrādes stobriņā (PT), un 1 minūti centrifugējiet ar 8000–20 000 x g. Ielieciet griešanas stobriņu (PRC) jaunā 2 ml apstrādes stobriņā (PT) un izmetiet veco apstrādes stobriņu (PT), kurā ir caurplūdes materiāls.
10. Pipetējiet atlikušo parauga daļu PAXgene RNA griešanas stobriņā (PRC) un 1 minūti centrifugējiet ar 8000–20 000 x g. Ielieciet griešanas stobriņu (PRC) jaunā 2 ml apstrādes stobriņā (PT) un izmetiet veco apstrādes stobriņu (PT), kurā ir caurplūdes materiāls.



Uzmanīgi pipetējiet paraugu griešanas stobriņā (PRC) un vizuāli pārbaudiet, vai viss paraugs pilnībā ir pārvietots uz griešanas stobriņu (PRC).

11. Pipetējiet 350 µl skalošanas buferšķīduma 1 (BR3) PAXgene RNA griešanas stobriņā (PRC). 1 minūti centrifugējiet ar 8000–20 000 x g. Ielieciet griešanas stobriņu (PRC) jaunā 2 ml apstrādes stobriņā (PT) un izmetiet veco apstrādes stobriņu (PT), kurā ir caurplūdes materiāls.

12. Pievienojiet 10 µl DNāzes I (RNFD) rezerves standartšķīduma pie 70 µl DNS noārdīšanas buferšķīduma (RDD) 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņā (MCT). Samaisiet, viegli kustinot stobriņu, un īsi centrifugējiet, lai savāktu atlikušo šķidrumu no stobriņa malām.

Ja apstrādājat, piemēram, 10 paraugus, pievienojiet 100 µl DNāzes I (RNFD) rezerves standartšķīduma pie 700 µl DNS noārdīšanas buferšķīduma (RDD). Izmantojiet komplektā iekļautos 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņus (MCT).



DNāze I ir īpaši jutīga pret fizikālu denaturāciju. Lai maisītu, drīkst izmantot tikai vieglu stobriņa kustību. Nesaskaliniet.

13. Pipetējiet DNāzes I (RNFD) inkubācijas maisījumu (80 µl) tieši uz PAXgene RNA griešanas stobriņa (PRC) membrānas un uz 15 minūtēm nolieciet uz galda (20–30 °C temperatūrā).



Pārliecinieties, vai DNāzes I (RNFD) inkubācijas maisījums ir uzlikts tieši uz membrānas. Ja daļa maisījuma tiks uzlikta un paliks uz griešanas stobriņa (PRC) sienīnām vai gredzenblīves, DNāzes noārdīšanās būs nepilnīga.

14. Pipetējiet 350 µl skalošanas buferšķīduma 1 (BR3) PAXgene RNA griešanas stobriņā (PRC) un 1 minūti centrifugējiet ar 8000–20 000 x g. Ielieciet griešanas stobriņu (PRC) jaunā 2 ml apstrādes stobriņā (PT) un izmetiet veco apstrādes stobriņu (PT), kurā ir caurplūdes materiāls.

15. Pipetējiet 500 µl skalošanas buferšķīduma 2 (BR4) PAXgene RNA griešanas stobriņā (PRC) un 1 minūti centrifugējiet ar 8000–20 000 x g. Ielieciet griešanas stobriņu (PRC) jaunā 2 ml apstrādes stobriņā (PT) un izmetiet veco apstrādes stobriņu (PT), kurā ir caurplūdes materiāls.



Skalošanas buferšķīdums 2 (BR4) tiek piegādāts koncentrāta veidā. Nodrošiniet, lai pirms lietošanas skalošanas buferšķīdumam 2 (BR4) tiktu pievienots etanols (sk. sadaļu “Pirms darba sākšanas veicamās darbības”, 49. lpp.).

16. Pievienojiet vēl 500 µl skalošanas buferšķīduma 2 (BR4) PAXgene RNA griešanas stobriņā (PRC). 3 minūtes centrifugējiet ar 8000–20 000 x g.

17. Izmetiet apstrādes stobriņu (PT), kurā ir caurplūdes materiāls, un ielieciet PAXgene RNA griešanas stobriņu (PRC) jaunā 2 ml apstrādes stobriņā (PT). 1 minūti centrifugējiet ar 8000–20 000 x g.

18. Izmetiet apstrādes stobriņu (PT), kurā ir caurplūdes materiāls. Ielieciet PAXgene RNA griešanas stobriņu (PRC) 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņā (MCT) un pipetējiet 40 µl eluēšanas buferšķīduma (BR5) tieši uz PAXgene RNA griešanas stobriņa (PRC) membrānas. 1 minūti centrifugējiet ar 8000–20 000 x g, lai eluētu RNS.

Ir svarīgi ar eluēšanas buferšķīdumu (BR5) samitrināt visu membrānu, lai nodrošinātu maksimālu eluēšanas efektivitāti.

19. Atkārtojiet eluēšanas darbību (18. darbību), kā aprakstīts, izmantojot 40 µl eluēšanas buferšķīduma (BR5) un to pašu mikrocentrifūgas stobriņu (MCT).

20.5 minūtes inkubējiet eluātu 65 °C temperatūrā maisītājā-inkubatorā (no 5. darbības) bez maisīšanas. Pēc inkubācijas nekavējoties atdzesējiet uz ledus.

Inkubējot 65 °C temperatūrā, RNS tiek denaturēta lejupvērstam lietojumam.

Nepārsniedziet inkubācijas laiku un temperatūru.

21. Ja RNS paraugus nav paredzēts izmantot tūlīt, glabājiet –20 °C vai –70 °C temperatūrā.

Pēc atkārtotas sasaldēšanas un atkausēšanas RNS paliek denaturēta, tāpēc inkubēšanu 65 °C temperatūrā nav nepieciešams atkārtot. Ja RNS paraugus izmantojat diagnostikas testam, izpildiet ražotāja sniegtos norādījumus.

Precīzai RNS kvantifikācijai ar absorbcijas vērtību pie 260 nm mēs iesakām paraugus atšķaidīt ar 10 mM Tris-HCl ar pH 7,5.* Paraugu atšķaidot ar ūdeni, kas nesatur RNāzi, var tikt uzrādītas neatbilstoši zemas vērtības.

Nullējiet spektrofotometru, izmantojot tukšu paraugu, kurā ir tāda pati eluēšanas buferšķīduma (BR5) un Tris-HCl buferšķīduma proporcija kā mērāmajos paraugos. Eluēšanas buferšķīdumam (BR5) ir augsta absorbcijas vērtība pie 220 nm, kas var radīt augstu fona absorbcijas līmeni, ja spektrofotometrs nav atbilstoši nullēts.

Piezīme. Kvantifikācijai Tris-HCl buferšķīdumā izmantojiet šādu sakarību:

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$. Sk. B pielikumu, 65. lpp.

* Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai saņemtu papildinformāciju, iepazīstieties ar attiecīgajām drošības datu lapām (DDL), kas ir pieejamas pie produkta piegādātāja.

Protokols: automatizēta summārās RNS izdalīšana no PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT) savāktām cilvēka pilnasinām

Svarīga informācija pirms darba sākšanas

- Pārliecinieties, vai komplekta iepakojums ir neskarts un bez bojājumiem un vai nav radusies buferšķīdumu noplūde. Nelietojiet komplektu, ja tas ir bojāts.
- Izmantojot pipeti, pārliecinieties, vai tai ir iestatīts pareizs tilpums un vai šķidrums tiek rūpīgi un pilnībā aspirēts un dozēts.
- Lai nepieļautu paraugu ievietošanu nepareizajos stobriņos vai plastmasas palīgmateriālos, nodrošiniet, lai visi apstrādes stobriņi (PT), mikrocentrifūgas stobriņi (MCT) un rotoru adapteri būtu atbilstoši marķēti, izmantojot ūdensnoturīgo pildspalvu. Marķējiet katra mikrocentrifūgas stobriņa (MCT) vāciņu un korpusu, katra apstrādes stobriņa (PT) korpusu un katra rotora adaptera ārējo sienīņu.
- Paraugu un buferšķīdumu izšķakstīšanās procedūras laikā var samazināt iegūtās RNS daudzumu un tās tīrību.
- Ja vien nav norādīts citādi, visas šī protokola darbības, ieskaitot centrifugēšanas darbības, ir jāveic istabas temperatūrā (15–25 °C).

Nukleīnskābju amplifikācijas tehnoloģijas ir ļoti jutīgas, tāpēc, apstrādājot paraugus, ir jāievēro tālāk aprakstītie piesardzības pasākumi, lai izvairītos no krusteniskās kontaminācijas.

- Uzmanīgi pipetējiet paraugu apstrādes stobriņā (PT) stobriņa apakšdaļā, nesamitrinot stobriņa malu.
- Starp šķidrumu pārvešanas reizēm vienmēr nomainiet pipešu uzgaļus. Izmantojiet pipešu uzgaļus ar aerosola barjeru.
- Ar pipetes galu nepieskarieties griešanas stobriņa (PRC, PSC) membrānai.

- Pēc mikrocentrifūgas stobriņa (MCT) saskalošanas vai sildīšanas īsi to centrifugējiet, lai noņemtu vāka iekšpusē esošos pilienus.
- Visu procedūras laiku izmantojiet aizsargcimdus. Ja cimdi saskaras ar paraugu, nekavējoties nomainiet cimdus.

Pirms darba sākšanas veicamās darbības

- Asinis jāsavāc PAXgene Blood RNA Tubes stobriņos (BRT), kā norādīts *PAXgene Blood RNA Tube rokasgrāmatā*. Ja nepieciešams, skatiet C pielikumu (67. lpp.), kur ir sniegti ieteikumi par darbu ar PAXgene Blood RNA Tubes stobriņiem (BRT).
- Nodrošiniet, lai PAXgene Blood RNA Tubes stobriņi (BRT) pēc asins paraugu savākšanas vismaz 2 stundas tiktu inkubēti istabas temperatūrā, lai nodrošinātu pilnīgu asins šūnu līzi. Inkubējot PAXgene Blood RNA Tube stobriņus (BRT) visu nakti, var palielināt iegūto daudzumu. Ja PAXgene Blood RNA Tube stobriņš (BRT) pēc asins parauga savākšanas ir glabāts 2–8 °C, –20 °C vai –70 °C temperatūrā, vispirms ļaujiet tam sasniegt istabas temperatūru un pēc tam pirms procedūras sākšanas vismaz 2 stundas glabāiet to istabas temperatūrā.
- Izlasiet 9. lpp. sniegto drošības informāciju.
- Izlasiet sadaļu Svarīgas piezīmes, 37. lpp.
- Izlasiet vadlīnijas par RNS apstrādi (A pielikums, 64. lpp.).
- Izlasiet *QIAcube lietotāja rokasgrāmatu* un visu QIAcube komplektā iekļauto papildinformāciju, pievēršot īpašu uzmanību drošības informācijai.
- Pārliecinieties, vai instrumenti, piemēram, pipetes un ierīce QIAcube, ir regulāri pārbaudīti un kalibrēti saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.
- Buferšķīdumā (BR2) glabāšanas laikā var rasties nogulsnes. Ja nepieciešams, sasildiet līdz 37 °C temperatūrai, lai tās izšķīdinātu.
- Skalošanas buferšķīdums 2 (BR4) tiek piegādāts koncentrāta veidā. Pirms pirmās lietošanas reizes pievienojiet 4 reizes lielāku tilpumu etanola (96–100% tīrības pakāpe p.a.), lai iegūtu darba šķīdumu (ievērojiet norādījumus uz pudeles).

- Ja DNāzes komplektu bez RNāzes lietojat pirmo reizi, sagatavojiet DNāzes I rezerves standartšķīdumu. Izšķīdiniet cieto DNāzi I (RNFD; 1500 Kunitz vienības)* 550 µl komplektā iekļautā DNāzes resuspendēšanas buferšķīduma (DRB). Atverot flakonu, rīkojieties uzmanīgi, lai nezaudētu daļu DNāzes I (RNFD). Nesaskaliniet pagatavoto DNāzes I (RNFD) šķīdumu. DNāze I ir īpaši jutīga pret fizikālu denaturāciju. Lai maisītu, drīkst izmantot tikai stobriņa uzmanīgu apgriešanu.
- Pašreizējie dati rāda, ka pagatavotu DNāzes I (RNFD) šķīdumu var glabāt 2–8 °C temperatūrā līdz pat 6 nedēļām. Lai DNāzi I (RNFD) uzglabātu ilgstoši, izlejiet rezerves standartšķīdumu no stikla flakona, sadaliet to vienai lietošanas reizei paredzētās alikvotās daļās (izmantojiet komplektā iekļautos 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņus (MCT); to pietiek 5 alikvotām daļām) un glabājiet –20 °C temperatūrā līdz pat 9 mēnešiem. Atkausētas alikvotās daļas var glabāt 2–8 °C temperatūrā līdz pat 6 nedēļām. Pēc atkausēšanas alikvotās daļas nedrīkst atkārtoti sasaldēt.
- Gatavojot DNāzes I (RNFD) šķīdumu un to sadalot alikvotās daļās, obligāti ievērojiet RNS apstrādes vadlīnijas (A pielikums, 64. lpp.).
- Uzstādiet atbilstošo maisītāja adapteri (iekļauts ierīces QIAcube komplektācijā; izmantojiet adapteri 2 ml droši noslēdzamiem stobriņiem, kas marķēti ar ciparu “2”) un uzlieciet maisītāja statīvu uz adaptera.
- Pārbaudiet atkritumu atvilktni un, ja nepieciešams, iztukšojiet to.
- Instalējiet protokolus, ja tas vēl nav paveikts iepriekšējām izpildes reizēm. Instalējiet protokolus “PAXgene Blood RNA Part A” un “PAXgene Blood RNA Part B”. Sk. sadaļu “Protokolu instalēšana ierīcē QIAcube”, 37. lpp.

* Kunitz vienības parasti tiek izmantotas DNāzes I mērīšanai, un tās ir definētas kā DNāzes I daudzums, kas rada A_{260} pieaugumu par 0,001 minūtē/mililitrā pie temperatūras 25 °C un pH 5,0, kā substrātu izmantojot augsti polimerizētu DNS (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 un 363).

Procedūra

1. Aizveriet QIAcube durvis un ieslēdziet ierīci QIAcube ar ieslēgšanas/izslēgšanas slēdzi (sk. 15. att., 38. lpp.).

Atskan skaņas signāls, un tiek parādīts sākuma ekrāns. Instruments automātiski veic inicializēšanas pārbaudes.

2. Atveriet ierīces QIAcube durvis un ievietojiet ierīcē QIAcube nepieciešamos reaģentus un plastmasas piederumus. Sk. sadaļu “Ierīces QIAcube uzpilde”, 39. lpp.

Lai taupītu laiku, uzpildi var veikt vienas vai abu 10 minūšu ilgo centrifugēšanas darbību laikā (3. un 5. darbība).

3. Centrifugējiet PAXgene Blood RNA Tube stobriņu (BRT) 10 minūtes ar 3000–5000 x g, izmantojot svārstīgo rotoru.



Pārliecinieties, vai asins paraugs ir vismaz 2 stundas istabas temperatūrā (15–25 °C) inkubēts PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT), lai sasniegtu asins šūnu pilnīgu līzi.



Rotorā ir jābūt stobriņu adapteriem, kas paredzēti stobriņiem ar noapaļotu galu. Ja tiek izmantoti citu veidu stobriņu adapteri, stobriņi centrifugēšanas laikā var saplīst.

4. Noņemiet supernatantu, to nolejot vai pipetējot. Pievienojiet granulai 4 ml ūdens, kas nesatur RNāzi (RNFW), un noslēdziet stobriņu ar jaunu sekundāro BD Hemogard aizdari (iekļautas komplektā).

Ja supernatants tiek noliets, rīkojieties uzmanīgi, lai nesabojātu granulu, un nosusiniet stobriņa malu ar tīru papīra dvieli.

5. Saskaliniet, līdz ir redzams, ka granula ir izšķīdusi, un 10 minūtes centrifugējiet ar 3000–5000 x g, izmantojot svārstīgo rotoru. Noņemiet un izmetiet visu supernatantu.

Nelielas atliekas, kas paliek supernatantā pēc saskalošanas, bet pirms centrifugēšanas, neietekmē procedūru.



Nepilnīga supernatanta noņemšana var kavēt līzi un izšķīdināt lizātu, tādējādi ietekmējot apstākļus, kuros RNS saistās ar PAXgene membrānu.

6. Pievienojiet 350 µl resuspendēšanas buferšķīduma (BR1) un saskalojiet, līdz ir redzams, ka granula ir izšķīdusi.

7. Pipetējiet paraugu 2 ml apstrādes stobriņā (PT).



Izmantojiet komplektā PAXgene Blood RNA Kit iekļautos 2 ml apstrādes stobriņus (PT).

8. Ielieciet atvērtos apstrādes stobriņus (PT), kuros ir paraugs, QIAcube maisītājā (sk. 17. att., 41. lpp.). Lai atvieglotu ievietošanu, paraugu pozīcijas ir numurētas. Ievietojiet maisītāja statīva aizbāžņus (iekļauti ierīces QIAcube komplektācijā) ligzdās maisītāja statīva malā blakus katram apstrādes stobriņam. Tādējādi ielādes pārbaudes laikā varēs noteikt paraugus.



Pārliecinieties, vai ir uzstādīts atbilstošais maisītāja adapteris (maisītāja adapteris, 2 ml droši noslēdzami stobriņi, kas marķēti ar ciparu “2”; iekļauti ierīces QIAcube komplektācijā).



Ja apstrādājat mazāk nekā 12 paraugus, ievietojiet maisītāja statīvu, kā parādīts 21. att., 45. lpp. Nevar apstrādāt vienu paraugu vai 11 paraugus.

9. Aizveriet ierīces QIAcube durvis (sk. 15. att., 38. lpp.).

10. Atlasiet protokolu “PAXgene Blood RNA Part A” (PAXgene Blood RNA A daļa) un palaidiet protokola izpildi.

Izpildiet ierīces QIAcube skārienekrānā parādītos norādījumus.



Nodrošiniet, lai ierīcē QIAcube būtu instalētas abas programmas daļas (A daļa un B daļa) (sk. sadaļu “Protokolu instalēšana ierīcē QIAcube”, 37. lpp.).



Ierīce QIAcube veic pārbaudi, lai noteiktu paraugus, uzgaļus, rotora adapterus un reaģentu pudeles.

11. Kad protokola “PAXgene Blood RNA Part A” izpilde ir pabeigta, atveriet ierīces QIAcube durvis (sk. 15. att., 38. lpp.). Izņemiet PAXgene RNA griešanas stobriņus (PRC) no rotora adapteriem un tukšos apstrādes stobriņus (PT) no maisītāja un izmetiet tos.



Izpildes laikā ierīce griešanas stobriņus pārvietoto no rotora adaptera pozīcijas 1 (vāciņa pozīcija L1) uz rotora adaptera pozīciju 3 (vāciņa pozīcija L2) (sk. 19. att., 43. lpp.).

12. Aizveriet vāciņus visiem rotora adapteros esošajiem 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņiem (MCT), kuros ir izdalītā RNS (pozīcija 3, vāciņa pozīcija L3, sk. 19. att., 43. lpp.). Pārvietojiet 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņus (MCT) uz QIAcube maisītāja adapteri (sk. 17. att., 41. lpp.).

13. Aizveriet ierīces QIAcube durvis (sk. 15. att., 38. lpp.).

14. Atlasiet protokolu "PAXgene Blood RNA Part B" (PAXgene Blood RNA B daļa) un palaidiet protokola izpildi.

Izpildiet ierīces QIAcube skārienekrānā parādītos norādījumus.



Šī programma inkubē paraugus 65 °C temperatūrā un denaturē RNS lejupvērstam lietojumam. Pat ja lejupvērstajā lietojumā ir paredzēta denaturācija karstuma ietekmē, neizlaidiet šo darbību. Pietiekama RNS denaturācija ir būtiski svarīga, lai nodrošinātu maksimālu efektivitāti lejupvērstajos lietojumos.

15. Kad programmas "PAXgene Blood RNA Part B" izpilde ir pabeigta, atveriet ierīces QIAcube durvis (sk. 15. att., 38. lpp.). Mikrocentrifūgas stobriņus (MCT) ar izdalīto RNS nekavējoties novietojiet uz ledus.



BRĪDINĀJUMS Karsta virsma. Maisītājs var sasilt līdz 70 °C temperatūrai. Nepieskarieties tam, kad tas ir sakarsis.



Neatstājiet izdalīto RNS ierīcē QIAcube. Paraugi netiek atdzesēti, tāpēc izdalītās RNS var noārdīties. Tāpēc nav ieteicams veikt paraugu sagatavošanas izpildes naktī bez uzraudzības.

16. Ja RNS paraugus nav paredzēts izmantot tūlīt, glabājiet –20 °C vai –70 °C temperatūrā.

Pēc atkārtotas sasaldēšanas un atkausēšanas RNS paliek denaturēta, tāpēc nav nepieciešams atkārtot protokolu inkubēšanai karstumā ("PAXgene Blood RNA Part B").

Ja RNS paraugus izmantojat diagnostikas testam, izpildiet ražotāja sniegtos norādījumus.

Precīzai RNS kvantifikācijai ar absorbcijas vērtību pie 260 nm mēs iesakām paraugus atšķaidīt ar 10 mM Tris-HCl ar pH 7,5. * Paraugu atšķaidot ar ūdeni, kas nesatur RNāzi, var tikt uzrādītas neatbilstoši zemas vērtības.

Nullējiet spektrofotometru, izmantojot tukšu paraugu, kurā ir tāda pati eluēšanas buferšķīduma (BR5) un Tris-HCl buferšķīduma proporcija kā mērāmajos paraugos. Eluēšanas buferšķīdumam (BR5) ir augsta absorbcijas vērtība pie 220 nm, kas var radīt augstu fona absorbcijas līmeni, ja spektrofotometrs nav atbilstoši nullēts.



Kvantifikācijai Tris-HCl buferšķīdumā izmantojiet šādu sakarību:

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Sk. B pielikumu, 65. lpp.

17. Izņemiet reaģentu pudeļu statīvu no QIAcube darba plates (sk. 17. att., 41. lpp.), un aizveriet visas pudeles ar atbilstoši marķētajiem vāciņiem. Buferšķīdumus pudelēs var glabāt istabas temperatūrā (15-25 °C) līdz pat 3 mēnešiem. Izņemiet un izmetiet reaģentus, kas atlikuši apstrādes stobriņos (PT) QIAcube mikrocentrifūgas stobriņu ligzdās (sk. 17. att., 41. lpp.). Izņemiet un izmetiet rotora adapterus no centrifūgas (sk. 17. att., 41. lpp.). Iztukšojiet ierīces QIAcube atkritumu atvilktni (sk. 15. att., 38. lpp.). Aizveriet ierīces QIAcube durvis un izslēdziet ierīci ar ieslēgšanas/izslēgšanas slēdzi (sk. 15. att., 38. lpp.).

* Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai saņemtu papildinformāciju, iepazīstieties ar attiecīgajām drošības datu lapām (DDL), kas ir pieejamas pie produkta piegādātāja.

Problēmu novēršanas ieteikumi

Šie problēmu novēršanas ieteikumi var būt noderīgi, risinot radušās problēmas. Vairāk informācijas skatiet arī bieži uzdotu jautājumu lapā mūsu Tehniskā atbalsta centrā: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN tehniskā atbalsta darbinieki vienmēr labprāt atbild uz visiem jūsu jautājumiem par šajā rokasgrāmatā sniegto informāciju un protokoliem vai par paraugu un testu tehnoloģijām (kontakta informāciju skatiet pēdējā lappusē vai vietnē www.qiagen.com).

Komentāri un ieteikumi

RNS ir noārdījusies

RNāzes kontaminācija



Rīkojieties uzmanīgi, lai reaģentos procedūras laikā vai pēc tās nenokļūtu RNāzes (sk. A pielikumu, 64. lpp.).

Mazs iegūtās RNS daudzums

a) PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT) ir savākts mazāk nekā 2,5 ml asiņu



Nodrošiniet, lai PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT; sk. *PAXgene Blood RNA Tube rokasgrāmatu*) tiktu savākti 2,5 ml asiņu.

b) RNS koncentrācija ir mērīta ūdenī



Precīzai kvantifikācijai RNS ir jāatšķaida ar 10 mM Tris-HCl ar pH 7,5* (sk. B pielikumu, 65. lpp.).



c) Manuālā protokola 9. un 10. darbībā PAXgene RNA griešanas stobriņā (PRC) ir pārvietotas šūnu atliekas





Manuālā protokola 7. darbībā, pipetējot supernatantu, nepārvietojiet lielas daļiņas (sīku atlieku pārvietošana procedūru neietekmē).

* Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai saņemtu papildinformāciju, iepazīstieties ar attiecīgajām drošības datu lapām (DDL), kas ir pieejamas pie produkta piegādātāja.

Komentāri un ieteikumi

- d) 3. darbībā nav pilnībā noņemts supernatants  Nodrošiniet, lai tiktu noņemts viss supernatants. Ja supernatants tiek noliets, noslaukiet pilienus no PAXgene Blood RNA Tube stobriņa (BRT) malas ar papīra dvieli. Veiciet atbilstošus piesardzības pasākumus, lai nepieļautu krustenisko kontamināciju.
- e) Pēc savākšanas PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT) asinis ir inkubētas mazāk nekā 2 stundas  Asinis pēc savākšanas PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT) inkubējiet vismaz 2 stundas.

Zema A_{260}/A_{280} vērtība

- a) A_{260}/A_{280} mērījuma veikšanai RNS atšķaidīšanai izmantots ūdens  Izmantojiet 10 mM Tris-HCl ar pH 7,5, lai atšķaidītu RNS pirms tīrības pakāpes mērīšanas* (sk. B pielikumu, 65. lpp.).
- b) Spektrofotometrs nav atbilstoši nullēts  Nullējiet spektrofotometru, izmantojot tukšu paraugu, kurā ir tāda pati eluēšanas buferšķīduma (BR5) un 10 mM Tris-HCl ar pH 7,5 buferšķīduma proporcija kā mērāmajos paraugos. Eluēšanas buferšķīdumam (BR5) ir augsta absorbcijas vērtība pie 220 nm, kas var radīt augstu fona absorbcijas līmeni, ja spektrofotometrs nav atbilstoši nullēts.

Ierīces nepareiza darbība

- Ierīce QIAcube nedarbojās pareizi Izlasiet *QIAcube lietotāja rokasgrāmatu*, īpašu uzmanību pievēršot sadaļai par problēmu novēršanu. Pārliecinieties, vai ierīce QIAcube ir pareizi apkopta, kā aprakstīts *QIAcube lietotāja rokasgrāmatā*.

* 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 pielikums. Vispārīgas piezīmes par RNS apstrādi

RNS apstrāde



Ribonukleāzes (RNāzes) ir ļoti stabili un aktīvi enzīmi, kuru darbībai parasti nav nepieciešami kofaktori. RNāzes ir grūti inaktivējamas, un pat ar nelielu daudzumu pietiek, lai noārdītu RNS, tāpēc nedrīkst izmantot plastmasas vai stikla piederumus, pirms tam nenovēršot iespējamo kontamināciju ar RNāzi. Jārīkojas ļoti uzmanīgi, lai RNāzes nejauši nenokļūtu RNS paraugā izdalīšanas procedūras laikā vai pēc tās. Lai izveidotu un uzturētu vidi bez RNāzēm, strādājot ar RNS, priekšapstrādes laikā un lietojot vienreizlietojamus un vairākkārt lietojamus traukus un šķīdumus, jāveic piesardzības pasākumi.

Vispārēja apstrāde



Strādājot ar RNS, vienmēr jāizmanto atbilstoši mikrobioloģiski, aseptiski paņēmieni. Uz rokām un putekļu daļiņām ir baktērijas un pelējuma sēnītes, kas ir visbiežāk sastopamie kontaminācijas ar RNāzi avoti. Strādājot ar reaģentiem un RNS paraugiem, vienmēr valkājiet lateksa vai vinila cimdus, lai novērstu kontamināciju ar RNāzi no ādas virsmas vai putekļaina laboratorijas aprīkojuma. Bieži mainiet cimdus un, kad vien iespējams, turiet stobriņus noslēgtus. Kad alikvotās daļas tiek pipetētas lejupvērstajiem lietojumiem, turiet izdalīto RNS uz ledu.

Protokoli RNāzes kontaminācijas noņemšanai no stikla piederumiem un šķīdumiem ir sniegti vispārīgās molekulārās bioloģijas rokasgrāmatās, piemēram, Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

B pielikums. Summārās RNS kvantifikācija un kvalitātes noteikšana

RNS kvantifikācija

RNS koncentrācija ir jānosaka, mērot absorbciju spektrofotometrā pie 260 nm (A_{260}). Lai nodrošinātu nozīmīgumu, mērījumiem ir jābūt spektrofotometra lineārajā diapazonā. 1 vienības absorbcija pie 260 nm atbilst 44 µg RNS uz ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$). Šī sakarībā ir spēkā tikai mērījumiem 10 mM Tris-HCl šķīdumā* ar pH 7,5. Tāpēc RNS paraugs ir jāatšķaida ar 10 mM Tris-HCl. Kā aprakstīts tālāk (sk. sadaļu "RNS tīrība", 66. lpp.), attiecība starp absorbcijas vērtībām pie 260 un 280 nm ļauj noteikt RNS tīrību. Mērot RNS paraugus, nodrošiniet, lai kivetes nesaturētu RNāzi. Nullējiet spektrofotometru, izmantojot tukšu paraugu, kurā ir tāda pati eluēšanas buferšķīduma (BR5) un Tris-HCl buferšķīduma proporcija kā mērāmajos paraugos. Eluēšanas buferšķīdumam (BR5) ir augsta absorbcijas vērtība pie 220 nm, kas var radīt augstu fona absorbcijas līmeni, ja spektrofotometrs nav atbilstoši nullēts. Tālāk ir parādīts RNS kvantifikācijas aprēķina piemērs.

| | | |
|---|---|---|
| RNS paraug tilpums | = | 80 µl |
| Atšķaidījums (1/15) | = | 10 µl RNS parauga + 140 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 |
| Izmēriet atšķaidītā parauga absorbciju kivetē (bez RNāzes). | | |
| A_{260} | = | 0,3 |
| Parauga koncentrācija | = | 44 x A_{260} x atšķaidīšanas koeficients |
| | = | 44 x 0,3 x 15 |
| | = | 198 µg/ml |
| Kopējais iegūtais daudzums | = | koncentrācija x parauga tilpums mililitros |
| | = | 198 µg/ml x 0,08 ml |
| | = | 15,8 µg RNS |

* Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai saņemtu papildinformāciju, iepazīstieties ar attiecīgajām drošības datu lapām (DDL), kas ir pieejamas pie produkta piegādātāja.

RNS tīrība

Mērījumu attiecība pie 260 nm un 280 nm (A_{260}/A_{280}) ļauj noteikt RNS tīrību attiecībā uz kontaminantiem, kuri tiek absorbēti UV ietekmē, piemēram, proteīniem. Tomēr A_{260}/A_{280} attiecību būtiski ietekmē pH līmenis. Pie zemāka pH līmeņa A_{260}/A_{280} attiecība ir mazāka un ir samazināts jutīgums pret proteīnu kontamināciju.* Lai iegūtu precīzas vērtības, ieteicams mērīt absorbciju 10 mM Tris-HCl ar pH 7,5. Tīrai RNS A_{260}/A_{280} attiecība 10 mM Tris-HCl šķīdumā ar pH 7,5 ir 1,8–2,2. Nullējiet spektrofotometru, izmantojot tukšu paraugu, kurā ir tāda pati eluēšanas buferšķīduma (BR5) un Tris-HCl buferšķīduma proporcija kā mērāmajos paraugos. Eluēšanas buferšķīdumam (BR5) ir augsta absorbcijas vērtība pie 220 nm, kas var radīt augstu fona absorbcijas līmeni, ja spektrofotometrs nav atbilstoši nullēts.

* 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.

C pielikums. Darbs ar PAXgene Blood RNA Tubes stobriņiem (BRT)



Tālāk sniegtie uzņēmuma BD ieteikumi var būt noderīgi, strādājot ar PAXgene Blood RNA Tubes stobriņiem (BRT). Plašāku informāciju par PAXgene Blood RNA Tubes stobriņiem (BRT) skatiet *PAXgene Blood RNA Tube rokasgrāmatā*.

Norādījumi par BD Hemogard aizdaru noņemšanu

1. Vienā rokā satveriet PAXgene Blood RNA Tube stobriņu (BRT), novietojot īkšķi zem BD Hemogard aizdares. (Papildu stabilitātei atbalstiet roku pret stingru virsmu.) Ar otru roku pagriežiet BD Hemogard aizdaru un vienlaikus bīdīet to uz augšu ar otras rokas īkšķi TIKAI TIK ILGI, LĪDZ STOBRIŅA AIZBĀZNIS IR ATBRĪVOTS.
2. Noņemiet īkšķi pirms aizdares pacelšanas. NENOĒDIET aizdaru no PAXgene Blood RNA Tube stobriņa (BRT) ar īkšķi. Uzmanību! Ja PAXgene Blood RNA Tube stobriņā (BRT) ir asinis, pastāv saskares risks. Lai, noņemot aizdaru, nesavainotos, ir svarīgi, lai īkšķis, ar kuru aizdare tiek stumta uz augšu, tiktu noņemts no saskares vietas ar PAXgene Blood RNA Tube stobriņu (BRT), tiklīdz BD Hemogard aizdare ir atbrīvota.
3. Noņemiet aizdaru no PAXgene Blood RNA Tube stobriņa (BRT). Maz ticamajā gadījumā, ja plastmasas aizsargs atdalās no gumijas aizbāžņa, NECENTĪETIES SALIKT AIZDARI ATPAKAĻ. Uzmanīgi izņemiet gumijas aizbāzni no PAXgene Blood RNA Tube stobriņa (BRT).

Norādījumi par sekundārās BD Hemogard aizdares ievietošanu

1. Nomainiet PAXgene Blood RNA Tube stobriņa (BRT) aizdaru.
2. Pagriežiet un stingri spiediet uz leju, līdz aizbāznis ir pilnībā ievietots atpakaļ. Aizbāznis ir pilnībā jāievieto atpakaļ, lai aizdare apstrādes laikā stingri turētos uz PAXgene Blood RNA Tube stobriņa (BRT).

Informācija pasūtīšanai

| Prece | Saturs | Kat. Nr. |
|--|---|----------|
| PAXgene Blood RNA Kit (50) | 50 PAXgene griešanas stobriņi, 50 Shredder griešanas stobriņi, apstrādes stobriņi, DNāze I bez RNāzes, reaģenti un buferšķīdumi bez RNāzes. Lietošanai kopā ar PAXgene Blood RNA Tubes stobriņiem | 762174 |
| PAXgene Blood RNA Tubes (100) | 100 asins savākšanas stobriņi | 762165 |
| Saistītās preces, ko var pasūtīt no uzņēmuma QIAGEN | | |
| Starter Pack, QIAcube | Komplektā iekļauti: reaģentu pudeļu statīvi (3); sloksnes statīvu marķēšanai (8); 200 µl filtru uzgaļi (1024); 1000 µl filtru uzgaļi (1024); 1000 µl liela diametra filtru uzgaļi (1024); 30 ml reaģentu pudeles (18); rotora adapteri (240); rotora adapteru turētājs | 990395 |
| Filter-Tips, 1000 µl (1024) | Sterili, vienreizlietojami filtru uzgaļi, statīvos | 990352 |
| Reagent Bottles, 30 ml (6) | Reaģentu pudeles (30 ml) ar vāciņiem; komplektā 6 gab.; lietošanai ar QIAcube reaģentu pudeļu statīvu | 990393 |
| Rotor Adapters (10 x 24) | 240 paraugu sagatavošanai: 240 vienreizlietojami rotora adapteri; lietošanai ar QIAcube | 990394 |
| Reagent Bottle Rack | Statīvs, kurā QIAcube darba platē var ievietot 6 x 30 ml reaģentu pudeles | 990390 |

| | | |
|---|---|--------|
| Rotor Adapter Holder | Turētājs 12 vienreizlietojamiem rotora adapteriem; lietošanai ar QIAcube | 990392 |
| Saistītās preces, ko var pasūtīt no uzņēmuma BD* | | |
| Blood Collection Set | BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 21G, 0,8 x 19 mm adata, 305 mm caurulīte ar Luer adapteri; 50 gab. kastītē, 200 gab. kārbā | 367286 |
| BD Vacutainer One-Use Holder | Ar diametru 13 mm un 16 mm pieejami tikai kārbā; 1000 gab. kārbā | 364815 |
| BD Vacutainer Plus Serum Tubes | 13 x 75 mm 4,0 ml stobriņi ar Red BD Hemogard aizdari un papīra etiķeti; 100 gab. kastītē, 1000 gab. kārbā | 368975 |

* Šie asins paraugu savākšanas piederumi ir tipiski produkti, ko var izmantot kopā ar PAXgene Blood RNA Tubes stobriņiem (BRT). Lai uzzinātu vairāk par šiem piederumiem, tostarp to pasūtīšanu, apmeklējiet vietni www.preanalytix.com.

Jaunāko informāciju par licencēšanu un preču juridiskās atrunas skatiet attiecīgā PreAnalytiX vai QIAGEN komplekta rokasgrāmatā vai lietotāja instrukcijā. PreAnalytiX un QIAGEN komplektu rokasgrāmatas un lietotāja rokasgrāmatas ir pieejamas vietnēs www.preanalytix.com un www.qiagen.com, vai arī tās var pieprasīt PreAnalytiX tehniskā atbalsta dienestam.

Rokasgrāmatas rediģēšanas vēsture

| Dokuments un pārskatījums | Izmaiņas | Datums |
|---------------------------|---|----------------------|
| HB-0101-004, R2 | Izmaiņas visā dokumentā, lai nodrošinātu atbilstību GHS noteikumiem | 2015. gada jūnijs |
| HB-0101-005, R3 | Jauna veidne; pārskatīts automatizētais protokols un veikspējas dati; drošības informācija atjaunināta, lai nodrošinātu atbilstību GHS noteikumiem; izmaiņas informācijā par ierīci un paziņojumā par produkta izmantošanas ierobežojumiem. | 2019. gada februāris |
| HB-0101-006, R3 | Komplekta nosaukuma labojums komplekta komponentu tabulā 5. lapā. | 2020. gada janvāris |

PreAnalytiX Worldwide

PreAnalytiX produktus izplata uzņēmumi QIAGEN un BD

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

www.qiagen.com

www.PreAnalytiX.com

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

www.bd.com

www.PreAnalytiX.com

