

Januari 2020

Handleiding bij de PAXgene[®] Blood RNA Kit

Versie 2



50 (catalogusnr. 762174)

R3 **MAT** 1120409NL

REF 762174



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Geproduceerd door QIAGEN GmbH voor PreAnalytiX



A QIAGEN / BD Company

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

PAXgene Blood RNA Kits zijn niet in alle landen verkrijgbaar. Vraag om informatie.

Beperkte licentieovereenkomst

Door het gebruik van de PAXgene Blood RNA Kit verklaart de koper of gebruiker zich akkoord met de volgende voorwaarden:

1. De PAXgene Blood RNA Kit mag uitsluitend worden gebruikt in overeenstemming met de *handleiding bij de PAXgene Blood RNA Kit* en in combinatie met de componenten in de kit. PreAnalytiX verleent geen licentie onder haar intellectuele eigendom om de bijgesloten componenten van deze kit te gebruiken of vermengen met componenten die niet met de kit zijn meegeleverd, behalve indien beschreven in de *handleiding bij de PAXgene Blood RNA Kit* en in aanvullende protocollen die beschikbaar zijn op www.preanalytix.com.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert PreAnalytiX niet dat deze kit en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Deze kit en de componenten ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. PreAnalytiX doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die worden genoemd of geïmpliceerd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van de kit gaan ermee akkoord dat zij geen stappen ondernemen of niemand anders toestaan stappen te ondernemen die tot bovenstaande verboden handelingen kunnen leiden of deze vergemakkelijken.
6. PreAnalytiX mag de verbodsbepalingen in deze beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten, inclusief advocaatkosten, verhalen bij elke rechtshandeling om deze beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht in verband met de kit en/of de componenten ervan af te dwingen.

Zie www.preanalytix.com voor de meest actuele licentievoorwaarden.

Voorwaardelijke verkoop

Het huidige product wordt geleverd met een licentie onder bepaalde claims van US-7,270,953 en US-7,682,790, evenals EP-1820793 B1 en buitenlandse gelijkwaardige octrooiclaims voor het gebruik van het product om de nucleïnezuur-complex te verwerken die wordt gevormd tijdens de monsterafname in een PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-006 BD-8945 1120409 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, alle rechten voorbehouden.

PreAnalytiX Company

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Zwitserland

www.preanalytix.com

PreAnalytiX-distributeurs

PreAnalytiX-producten worden vervaardigd voor PreAnalytiX door QIAGEN of BD en worden gedistribueerd voor PreAnalytiX door QIAGEN of BD. Producten kunnen niet worden besteld bij PreAnalytiX GmbH.


Raadpleeg de laatste pagina voor contactgegevens van uw lokale PreAnalytiX-distributeur.

Inhoud

Inhoud van de kit	5
Symbolen.....	6
Opslagomstandigheden	7
Beoogd gebruik.....	8
Beperkingen van het gebruik van het product.....	8
Kwaliteitscontrole.....	9
Technische ondersteuning	9
Veiligheidsinformatie.....	9
Inleiding	13
Principe en procedure	13
Monsterafname en stabilisatie	13
RNA-concentratie en zuivering	19
Handmatige RNA-zuivering	19
Geautomatiseerde RNA-zuivering.....	29
Apparatuur en reagentia die door de gebruiker moeten worden geleverd	35
Belangrijke opmerkingen	37
De QIAcube gebruiken	37
De QIAcube starten	37
Protocollen installeren op de QIAcube	37
De QIAcube laden.....	39
Protocol: Handmatige zuivering van totaal RNA uit menselijk volbloed afgenomen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	48

Protocol: Geautomatiseerde zuivering van totaal RNA uit menselijk volbloed afgenomen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	56
Probleemoplossingsgids.....	63
Bijlage A: Algemene opmerkingen over de verwerking van RNA	66
Bijlage B: Kwantificatie en bepaling van de kwaliteit van totaal RNA	67
Bijlage C: Verwerking van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	69
Bestelgegevens	70
Revisiegeschiedenis van handleiding.....	72

Inhoud van de kit

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Catalogusnr.			762174
Aantal preparaten			50
BR1	Resuspension Buffer (Resuspensiebuffer)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Bindbuffer) *	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 * (Wasbuffer 1)	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) (Wasbuffer 2 (concentraat)) [†]	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Elutiebuffer)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-free Water (bottle) (RNase-vrij water (fles))	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid) (Proteïnase K (groene deksel))	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (PAXgene RNA-draaikolommen (rood))	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (2 ml) (Verwerkingsbuisjes (2 ml))	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures (Secundaire BD Hemogard™-sluitingen)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (1.5 ml) (Microcentrifugebuisjes (1,5 ml))	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNase I, RNase-vrij (gelyofiliseerd))	DNA REM	1500 Kunitz-eenheden [‡]
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (DNA-digestiebuffer (witte deksel))	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (DNase-resuspensiebuffer (buisje, lila deksel))	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (PAXgene Shredder-draaikolommen (lila))	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Handleiding	Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Kit (versie 2)		1

*Niet geschikt voor gebruik met desinfectiereagentia die bleek bevatten. Bevat een guanidinezout. Zie pagina 9 voor Veiligheidsinformatie.

[†] Wasbuffer 2 (BR4) wordt geleverd als concentraat. Voeg 4 volumes ethanol (96–100%, zuiverheidsgraad p.a.) toe volgens de instructies op de fles om een werkoplossing te verkrijgen voordat u het concentraat voor de eerste keer gebruikt.

[‡] Kunitz-eenheden worden algemeen gebruikt als eenheden voor het meten van DNase I, gedefinieerd als de hoeveelheid DNase I die een toename veroorzaakt in A_{260} van 0,001 per minuut per milliliter bij 25 °C, pH 5,0, met sterk gepolymeriseerd DNA als het substraat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 en 363).

Symbolen



Bevat voldoende reagentia voor <N> tests



Raadpleeg de gebruiksaanwijzing



Uiterste gebruiksdatum



Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek



Catalogusnummer



Partijnummer



Materiaalnummer



Componenten



Nummer



Sterilisatiemethode met behulp van bestraling



Kunitz-eenheden



Toevoegen



Bevat



Gereconstitueerd



Deoxyribonuclease I



Ethanol



Guanidine-isothiocynaat

RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

GTIN

Global Trade Item Number



Niet opnieuw gebruiken



Temperatuurbepering



Maximale temperatuur



Fabrikant



Belangrijke opmerking



Schrijf de huidige datum op zodra ethanol aan de fles is toegevoegd



Bij aankomst



Resulteert in

Opslagomstandigheden

PAXgene RNA-draaikolommen (PRC), PAXgene Shredder-draaikolommen (PSC), proteïnase K (PK) en buffers (BR1, BR2, BR3, BR4 en BR5) kunnen droog worden opgeslagen bij de temperatuur die wordt vermeld op het etiket van de kit.

De RNase-Free DNase Set die DNase I (RNFD), DNA-digestiebuffer (RDD) en DNase-resuspensiebuffer (DRB) bevat, wordt bij omgevingstemperatuur verzonden. Sla alle componenten van de RNase-Free DNase Set onmiddellijk na ontvangst op bij een op het etiket aangegeven temperatuur. Wanneer de kit onder de juiste omstandigheden wordt bewaard, is hij stabiel tot de houdbaarheidsdatum die op de doos van de kit staat vermeld.

Beoogd gebruik

De PAXgene Blood RNA Kit is bedoeld voor de zuivering van intracellulair RNA uit volbloed dat is afgenomen in de PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Als de kit wordt gebruikt in combinatie met de PAXgene Blood RNA Tube (BRT), geeft het systeem gezuiverd intracellulair RNA uit volbloed voor RT-PCR dat wordt gebruikt bij moleculair diagnostisch testen. Raadpleeg de Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Tube (*PAXgene Blood RNA Tube Handbook*) voor informatie over het gebruik van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Prestatiekenmerken van het PAXgene Blood RNA System zijn alleen bepaald met transcripten van het FOS- en IL1B-gen. Als gebruiker bent u zelf verantwoordelijk voor het vaststellen van de juiste prestatiekenmerken van het PAXgene Blood RNA System voor andere beoogde transcripten.

Beperkingen van het gebruik van het product

De PAXgene Blood RNA Kit is bedoeld voor zuivering van intracellulair RNA uit menselijk volbloed ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocyten/ml) voor in-vitrodiagnostische toepassingen. Het is niet bedoeld voor de zuivering van genomisch DNA of virale nucleïnezuren uit menselijk volbloed. Door het beperkte aantal transcripten die gevalideerd zijn voor de stabilisatiespecificaties (transcripten van het FOS- en IL1B-gen) zijn de prestatiekenmerken niet bepaald voor alle transcripten. Laboratoriumpersoneel moet de gegevens van de fabrikant en hun eigen gegevens beoordelen om te bepalen of validatie voor andere transcripten noodzakelijk is.

Het product is bedoeld voor gebruik door professionele gebruikers, zoals technici en artsen die zijn opgeleid in in-vitrodiagnostische procedures.

Kwaliteitscontrole

Elke partij van de PAXgene Blood RNA Kit wordt, in overeenstemming met het ISO-gecertificeerde kwaliteitsbeheersysteem van QIAGEN, getest tegen vooraf vastgestelde specificaties om een consistente kwaliteit van het product te waarborgen.

Technische ondersteuning

Bij QIAGEN staan de kwaliteit en beschikbaarheid van onze technische ondersteuning hoog in het vaandel. Bij onze technische afdelingen werken ervaren wetenschappers met uitgebreide praktische en theoretische ervaring en deskundigheid in moleculaire biologie en het gebruik van PreAnalytiX-producten. Neemt u gerust contact met ons op als u vragen hebt over de PAXgene Blood RNA Kit.

Voor technische ondersteuning en meer informatie kunt u bellen met de afdeling Technische Services van QIAGEN.

Veiligheidsinformatie

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril.

Draag bij het werken met biologische en chemische materialen altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril om het risico op infecties (zoals van hiv- of hepatitis B-virussen) terug te dringen en letsel te voorkomen. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB). Deze zijn online beschikbaar in handig en compact pdf-formaat via www.preanalytix.com. Hier kunt u de VIB van deze kit vinden, bekijken en afdrukken.

LET OP

Voeg GEEN bleekmiddel of zuuroplossingen rechtstreeks toe aan het afval van monsterbereiding.

Bindbuffer (BR2) en wasbuffer 1 (BR3) bevatten guanidiniethiocynaat, dat sterk reactieve verbindingen kan vormen met bleekmiddelen. Als u bindbuffer (BR2) of wasbuffer 1 (BR3) hebt gemorst, moet deze worden opgeruimd met geschikt laboratoriumdetergens en water. Reinig de verontreinigde plek eerst met laboratoriumreinigingsmiddel en water en vervolgens met 1% (v/v) natriumhypochloriet als de gemorste vloeistof mogelijk infectueuze stoffen bevat.

Het mengsel van RNA-stabilisatieoplossing en bloed uit de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kan worden gedesinfecteerd met behulp van 1 volume commercieel bleekmiddel (5% natriumhypochloriet) per 9 volumes van het mengsel van RNA-stabilisatieoplossing en bloed.

Afval van monsterbereiding, zoals supernatant van centrifugatiestappen in de RNA-zuiveringsprocedure, is mogelijk besmettelijk. Het afval moet worden geautoclaveerd of verbrand om besmettelijk materiaal te vernietigen, voordat het afval wordt afgevoerd. Afval moet worden afgevoerd volgens officiële regelgeving.

De volgende gevarenaanduidingen en voorzorgsmaatregelen zijn van toepassing op de componenten van de PAXgene Blood RNA Kit. Raadpleeg de *Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Tube* voor veiligheidsinformatie over de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Buffer BR2



Bevat: guanidethiocynaat. Gevaar! Schadelijk bij opname door de mond. Kan schadelijk zijn bij contact met de huid of bij inademing. Veroorzaakt ernstige oogschade. Langdurig schadelijk voor in het water levende organismen. Door contact met zuren komt zeer giftig gas vrij. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming. BIJ CONTACT MET DE OGEN: Voorzichtig spoelen met water gedurende een aantal minuten. Contactlenzen verwijderen, indien mogelijk. Blijven spoelen. Raadpleeg onmiddellijk een GIFCENTRUM of arts.

Buffer BR3



Bevat: ethanol; guanidinethiocynaat. Gevaar! Ontbrandbare vloeistof en damp. Veroorzaakt ernstige oogschade. Door contact met zuren komt zeer giftig gas vrij. Uit de buurt houden van warmte/-vonken/open vuur/hete oppervlakken. Niet roken. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming. BIJ CONTACT MET DE OGEN: Voorzichtig spoelen met water gedurende een aantal minuten. Contactlenzen verwijderen, indien mogelijk. Blijven spoelen. Raadpleeg onmiddellijk een GIFCENTRUM of arts.

DNase I



Bevat: DNase. Gevaar! Kan een allergische huidreactie veroorzaken. Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken. Inademing van stof/rook/gas/nevel/damp/spuitnevel vermijden. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming. Adembescherming dragen. NA (mogelijke) blootstelling: een GIFCENTRUM of arts raadplegen. Het slachtoffer in de frisse lucht brengen en laten rusten in een houding die het ademen vergemakkelijkt.

Proteïnase K



Bevat: proteïnase K. Gevaarlijk! Licht irriterend voor de huid. Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken. Inademing van stof/rook/gas/nevel/damp/spuitnevel vermijden. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming. Adembescherming dragen. NA (mogelijke) blootstelling: een GIFCENTRUM of arts raadplegen. Het slachtoffer in de frisse lucht brengen en laten rusten in een houding die het ademen vergemakkelijkt.

Inleiding

Het afnemen van volbloed is de eerste stap bij vele moleculaire assays die worden gebruikt om cellulair RNA te onderzoeken. De instabiliteit van het cellulaire RNA-profiel in vitro is echter een groot probleem bij dit soort experimenten. Onderzoeken van PreAnalytiX hebben aangetoond dat het aantal kopieën van individuele soorten mRNA in volbloed meer dan 1000 maal kunnen veranderen tijdens opslag of transport bij kamertemperatuur. * Dit wordt veroorzaakt door snelle RNA-degradatie en geïnduceerde expressie van bepaalde genen nadat het bloed is afgenomen. Deze veranderingen in het RNA-expressieprofiel maken betrouwbare onderzoeken naar genexpressie onmogelijk. Een methode om het RNA-expressieprofiel tijdens en na flebotomie te behouden is daarom essentieel voor een nauwkeurige analyse van genexpressie in menselijk volbloed.

Principe en procedure

PreAnalytiX heeft een nieuw systeem ontworpen dat het verkrijgen, stabiliseren, opslaan en transporteren van monsters van menselijk volbloed mogelijk maakt, tezamen met een snel en efficiënt protocol voor de zuivering van intercellulair RNA. Het systeem vereist het gebruik van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; Amerikaans octrooi 6,602,718 en 6,617,170) voor bloedafname en RNA-stabilisatie, gevolgd door een handmatige of geautomatiseerde RNA-zuivering met behulp van de PAXgene Blood RNA Kit. De handmatige en geautomatiseerde protocollen bieden nagenoeg gelijkwaardige prestaties met betrekking tot RNA-kwaliteit en -opbrengst. Prestatiegegevens voor het handmatige protocol (pagina's 22–29) en het geautomatiseerde protocol (pagina's 32–34) zijn inbegrepen in deze handleiding.

Monsterafname en stabilisatie

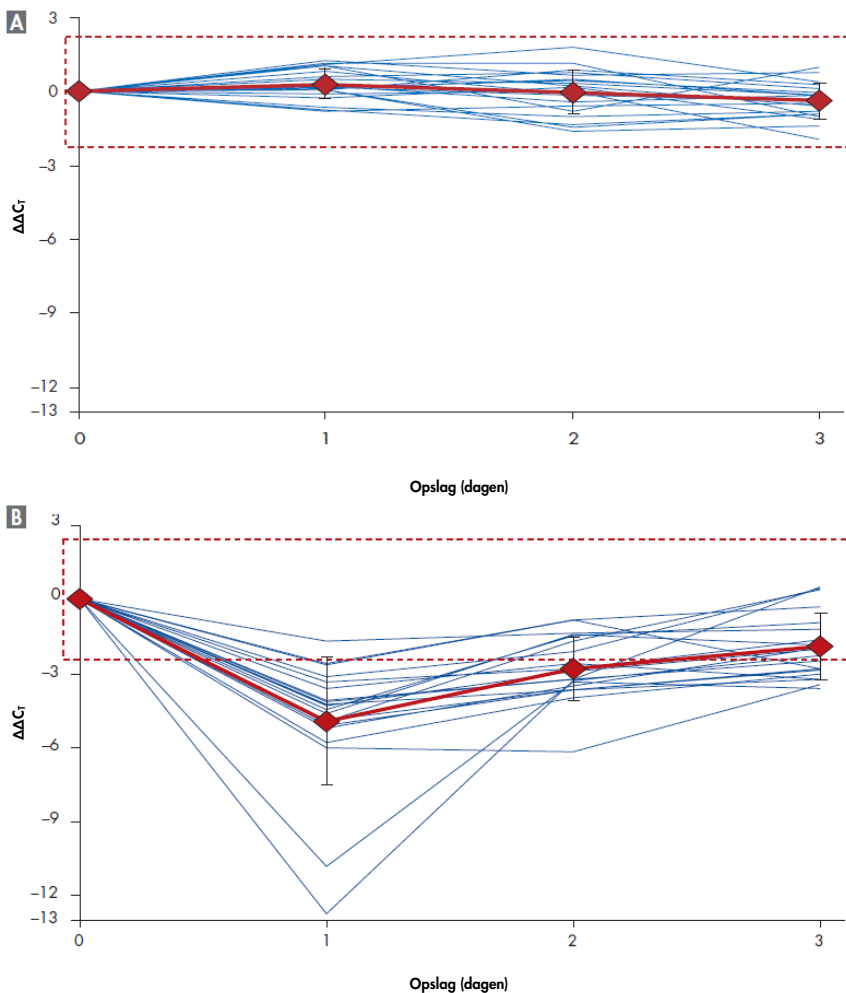
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) bevatten een gepatenteerde reagenssamenstelling op basis van een gepatenteerde RNA-stabilisatietechnologie. Deze reagenssamenstelling beschermt

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

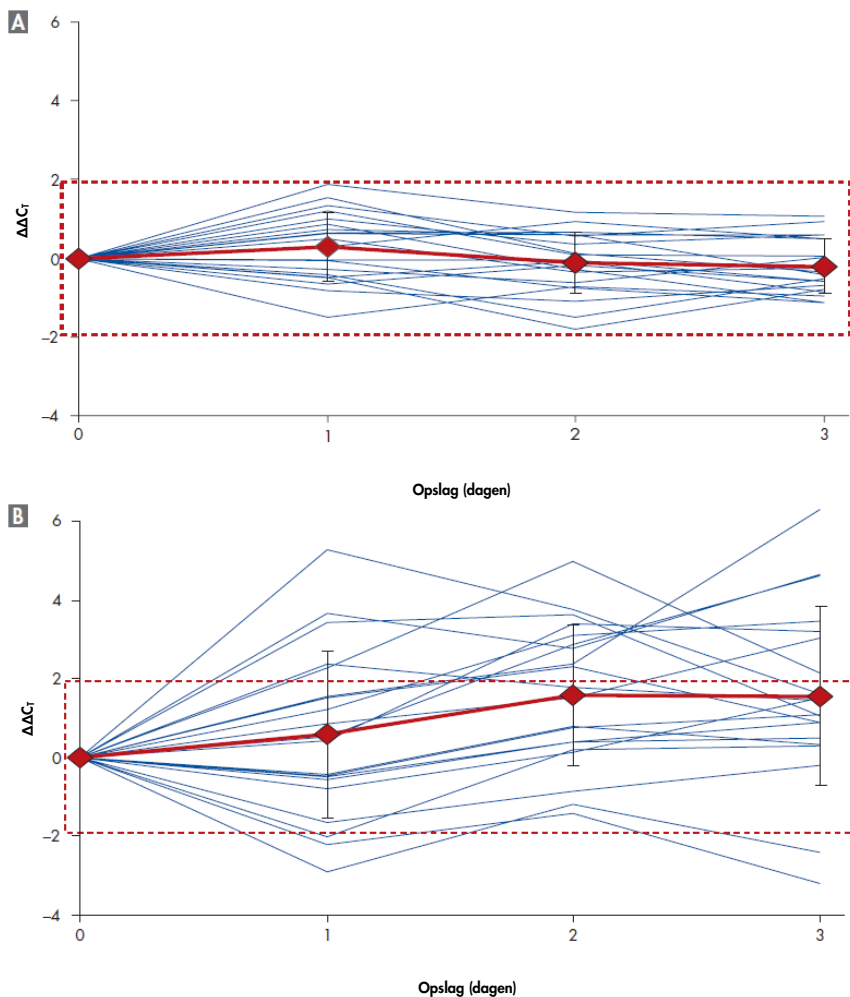
RNA-moleculen tegen degradatie door RNasen en minimaliseert veranderingen in genexpressie ex vivo. PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zijn bedoeld voor afname van menselijk volbloed en stabilisatie van cellulair RNA tot 3 dagen bij 18–25 °C (Afbeelding 1 en 2, pagina's 15 en 16) of tot 5 dagen bij 2–8 °C (Afbeelding 3 en 4, pagina's 17 en 18). De huidige beschikbare gegevens tonen minimaal 11 jaar stabilisatie van cellulair RNA bij –20 °C of –70 °C*. Voor meer informatie uit lopende onderzoeken waarbij stabiliteit voor langere periodes wordt geëvalueerd neemt u contact op met de afdeling Technische Services van QIAGEN.

De werkelijke tijd van RNA-stabilisatie is afhankelijk van het soort van cellulair RNA en de gebruikte vervolgtoeepassing. Door het beperkte aantal transcripten die gevalideerd zijn voor de stabilisatiespecificaties (transcripten van het FOS- en IL1B-gen) zijn de prestatiekenmerken niet bepaald voor alle transcripten. Laboratoriumpersoneel moet de gegevens van de fabrikant en hun eigen gegevens beoordelen om te bepalen of validatie voor andere transcripten noodzakelijk is.

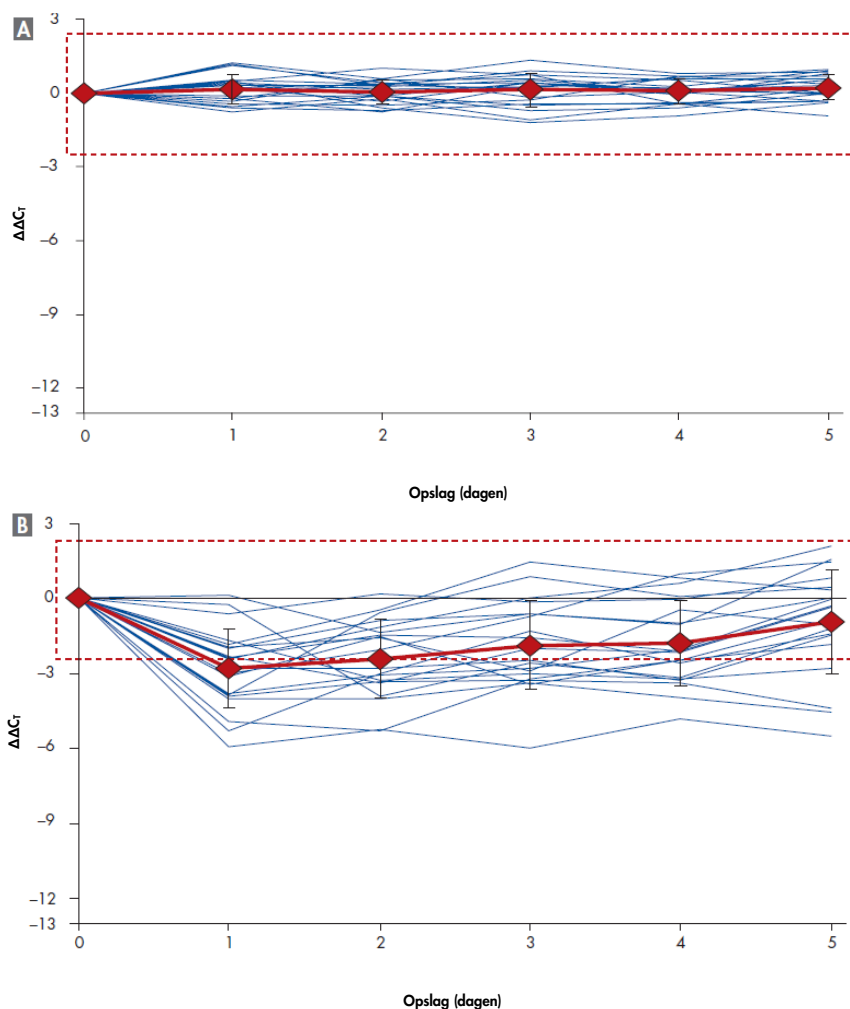
* Een langetermijnonderzoek naar opslag van bloed in PAXgene Blood RNA Tubes loopt nog.



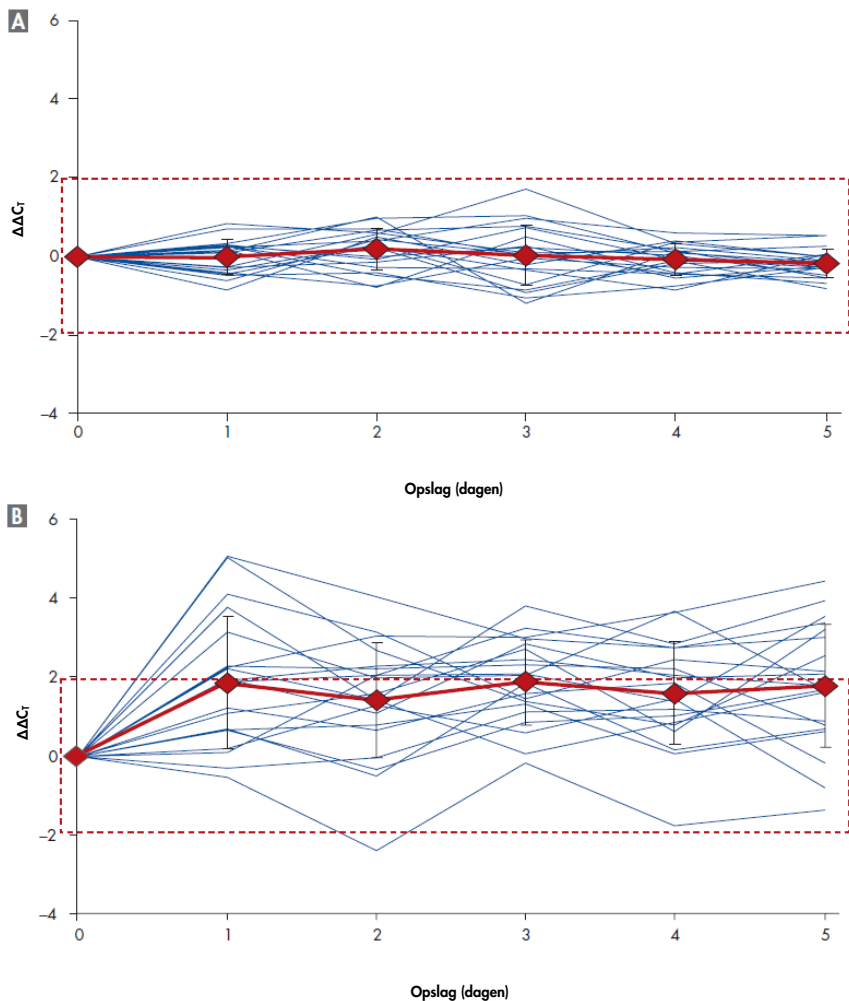
Afbeelding 1. RNA-stabiliteit in bloedmonsters bij 18–25 °C: FOS. Van 10 donoren werd bloed afgenomen, met tweevoudige monsters en opgeslagen bij 18–25 °C voor het aangegeven aantal dagen, gevolgd door totaal-RNA-zuivering. **[A]** Bloed werd afgenomen en opgeslagen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) en totaal RNA werd gezuiverd met behulp van de PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Bloed werd afgenomen en opgeslagen in standaard bloedafnamebuisjes met EDTA als antistollingsmiddel en totaal RNA werd gezuiverd met behulp van een standaard organische extractiemethode met op silicamembraan gebaseerde zuivering van RNA. Relatieve transcriptniveaus van FOS zijn bepaald door realtime, tweevoudige RT-PCR waarbij 18S rRNA is gebruikt als interne standaard. De waarden voor alle monsters zijn in kaart gebracht, waarbij van alle monsters de gemiddelden en deviaties worden getoond. De gestreepte lijnen tonen de $\pm 3x$ totale precisie van de assay (2,34 C_t).



Afbeelding 2. RNA-stabiliteit in bloedmonsters bij 18–25 °C: IL1B. Bloed werd afgenomen en totaal RNA werd gezuiverd, na opslag bij 18–25 °C, zoals weergegeven in Afbeelding 1. Relatieve transcriptniveaus van IL1B zijn bepaald door realtime, tweevoudige RT-PCR waarbij 18S rRNA is gebruikt als interne standaard. De waarden voor alle monsters zijn in kaart gebracht, waarbij van alle monsters de gemiddelden en deviaties worden getoond. De gestreepte lijnen tonen de $\pm 3 \times$ totale precisie van de assay (1,93 C_t).



Afbeelding 3. RNA-stabiliteit in bloedmonsters bij 2–8 °C: FOS. Van 10 donoren werd bloed afgenomen, met tweevoudige monsters, en opgeslagen bij 2–8 °C voor het aangegeven aantal dagen, gevolgd door totaal-RNA-zuivering. **[A]** Bloed werd afgenomen en opgeslagen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) en totaal RNA werd gezuiverd met behulp van de PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Bloed werd afgenomen en opgeslagen in standaard bloedafnamebuisjes met EDTA als antistollingsmiddel en totaal RNA werd gezuiverd met behulp van een standaard organische extractiemethode met op silicamembraan gebaseerde zuivering van RNA. Relatieve transcriptniveaus van FOS zijn bepaald door realtime, tweevoudige RT-PCR waarbij 18S rRNA is gebruikt als interne standaard. De waarden voor alle monsters zijn in kaart gebracht, waarbij van alle monsters de gemiddelden en deviaties worden getoond. De gestreepte lijnen tonen de $\pm 3x$ totale precisie van de assay (2,34 C_T).



Afbeelding 4. RNA-stabiliteit in bloedmonsters bij 2–8 °C: IL1B. Bloed werd afgenomen en totaal RNA werd gezuiverd, na opslag bij 2–8 °C, zoals weergegeven in Afbeelding 3. Relatieve transcriptniveaus van IL1B zijn bepaald door realtime, tweevoudige RT-PCR waarbij 18S rRNA is gebruikt als interne standaard. De waarden voor alle monsters zijn in kaart gebracht, waarbij van alle monsters de gemiddelden en deviaties worden getoond. De gestreepte lijnen tonen de $\pm 3 \times$ totale precisie van de assay (1,93 C_t).

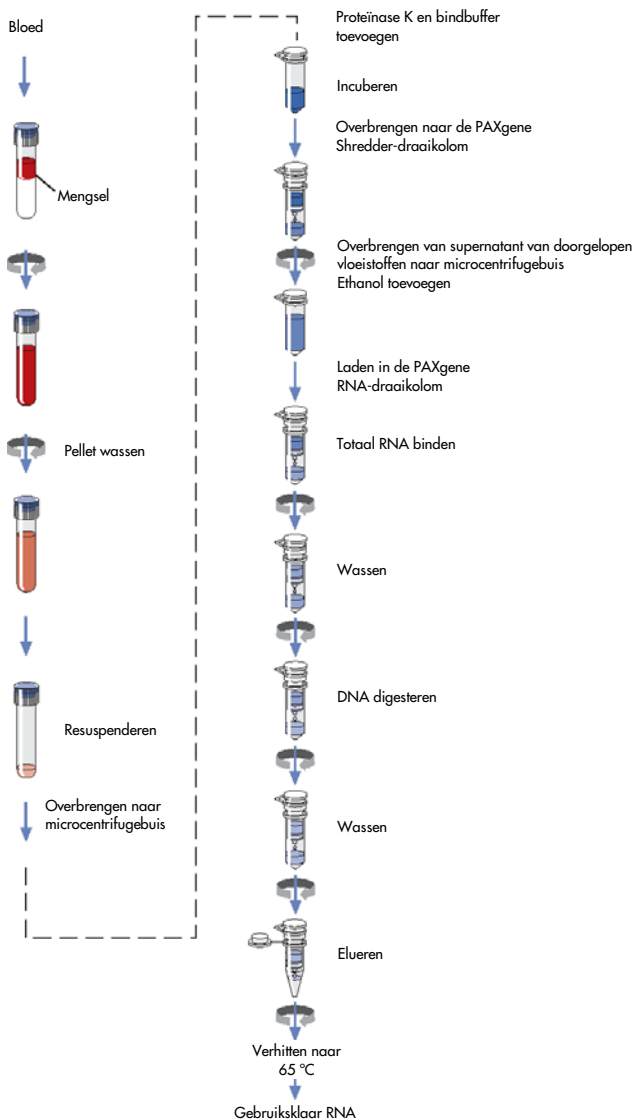
RNA-concentratie en zuivering

De PAXgene Blood RNA Kit is bedoeld voor de zuivering van totaal RNA uit 2,5 ml menselijk volbloed dat is afgenomen in een PAXgene Blood RNA Tube (BRT). De procedure is eenvoudig en kan met behulp van handmatige of geautomatiseerde procedures worden uitgevoerd (zie Afbeelding 5 en 10, pagina's 20 en 30). In beide protocollen begint de zuivering met een centrifugeringsstap om nucleïnezuren te pelletiseren in de PAXgene Blood RNA Tube (BRT). De pellet wordt gewassen en geresuspendeerd, daarna volgt handmatige of geautomatiseerde RNA-zuivering. In principe volgen beide protocollen dezelfde stappen met dezelfde componenten uit de kit.

Handmatige RNA-zuivering

De geresuspendeerde pellet wordt geïncubeerd in geoptimaliseerde buffers samen met proteïnase K (PK) om proteïne-afbraak te veroorzaken. Er wordt een extra centrifugatie door de PAXgene Shredder-draaikolom (PSC) uitgevoerd om het cellysaat te homogeniseren en overgebleven celresten te verwijderen. Ook wordt de supernatant van de doorgelopen fractie overgebracht naar een nieuwe microcentrifugebuis. Ethanol wordt toegevoegd om de bindingscondities aan te passen en het lysaat wordt aangebracht op een PAXgene RNA-draaikolom (PRC). Tijdens een korte centrifugatie wordt het RNA selectief gebonden aan het PAXgene-silicamembraan, terwijl verontreinigingen passeren. Achtergebleven verontreinigingen worden verwijderd met diverse efficiënte wasstappen. Tussen de eerste en de tweede wasstap wordt het membraan behandeld met DNase I (RNFD) om kleine hoeveelheden gebonden DNA te verwijderen. Na de wasstappen wordt RNA geëluëerd in elutiebuffer (BR5) en door verhitting gedenateerd.

Totaal RNA gezuiverd met behulp van het PAXgene Blood RNA System is puur. Met behulp van het handmatige protocol liggen de waarden van A_{260}/A_{280} tussen 1,8 en 2,2, en is $\leq 1\%$ (w/w) genomisch DNA aanwezig in $\geq 95\%$ van alle monsters, gemeten met behulp van kwantitatieve realtime PCR van een sequentie van het gen voor bèta-actine. Bij minstens 95% van de monsters werd geen remming van RT-PCR gedetecteerd, wanneer er tot 30% van het eluaat werd gebruikt.

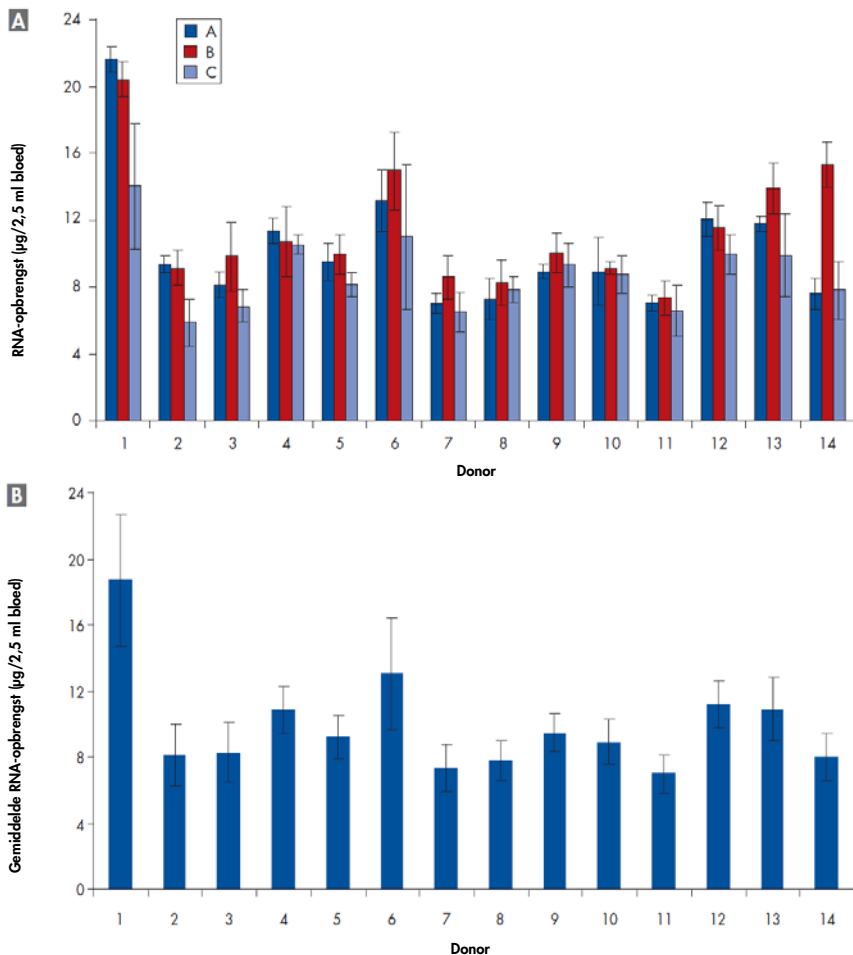


Afbeelding 5. De handmatige PAXgene Blood RNA-procedure.

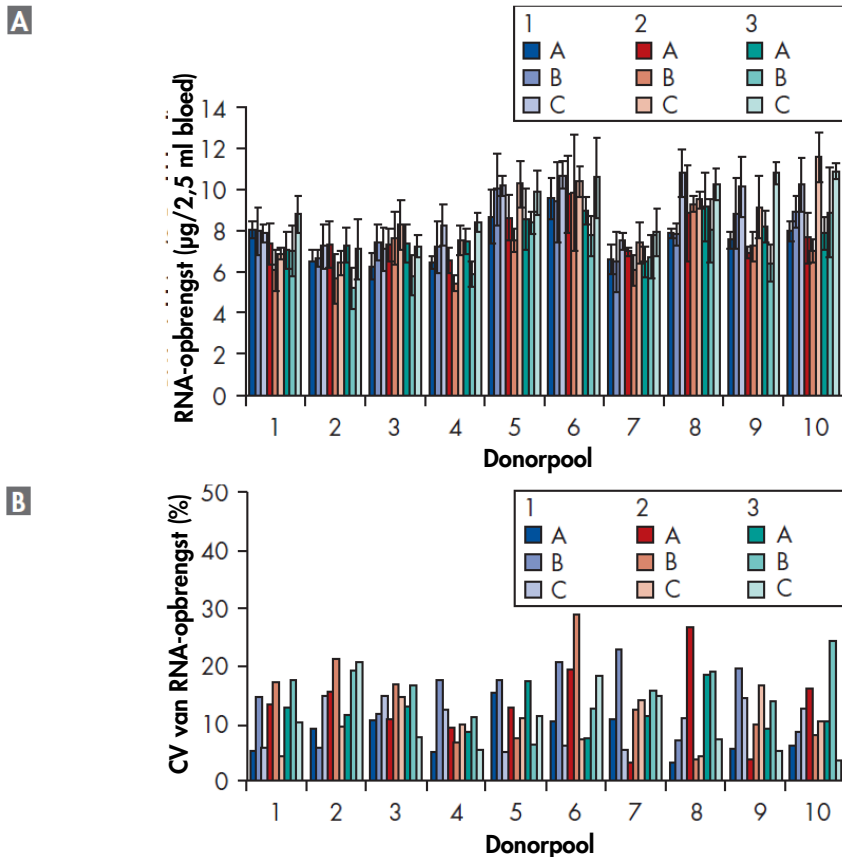
Met behulp van het handmatige protocol is de gemiddelde monsterbereidingstijd (op basis van gegevens uit 12 monsterbereidingsruns) ongeveer 90 minuten*, met slechts 40 minuten tijd voor handelingen van de gebruiker. RNA-opbrengst van 2,5 ml gezond menselijke volbloed is $\geq 3 \mu\text{g}$ bij $\geq 95\%$ van de verwerkte monsters. Aangezien opbrengsten sterk afhankelijk zijn van de donor, kunnen individuele opbrengsten variëren. Voor individuele donoren biedt het PAXgene Blood RNA System zeer reproduceerbare en herhaalbare opbrengsten (Afbeelding 6 en 7, pagina's 22 en 23) en reproduceerbaar en herhaalbaar RT-PCR (Afbeelding 8 en 9, pagina's 27 en 28), waardoor het zeer robuust is voor klinisch diagnostische tests.

Afbeelding 6 (pagina 22) toont de algehele herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van het PAXgene Blood RNA System. Aanvullende onderzoeken werden uitgevoerd om de invloed van verschillende partijen van de PAXgene Blood RNA Kit en verschillende operators op de reproduceerbaarheid van RNA-opbrengst en realtime RT-PCR-prestaties te tonen. Aangezien voor deze onderzoeken gepoolde bloedmonsters werden gebruikt in plaats van individuele PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), weerspiegelen de resultaten niet de herhaalbaarheid van het systeem, inclusief schommelingen tussen individuele bloedafnames, maar alleen de herhaalbaarheid van de monsterbereiding (zie Afbeelding 7, pagina 23)

* De totale looptijd van het protocol, inclusief de voorafgaande verwerking van PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugaties, pelletwassing en pelletresuspensie).



Afbeelding 6. Reproduceerbare en herhaalbare RNA-zuivering. Viervoudige bloedmonsters van 14 donoren werden handmatig verwerkt door elk van de 3 technieken (A, B, C). Er zijn drie sets van apparatuur gebruikt en alle monsters die door een enkele technicus werden voorbereid, werden verwerkt met behulp van dezelfde apparatuur. **[A]** Gemiddelden en standaarddeviaties van RNA-opbrengst per replicaatmonsters van dezelfde donoren en verschillende technieken worden getoond. **[B]** Twaalf replicaatbloedmonsters van alle 14 donoren werden verwerkt door de 3 verschillende technieken. Gemiddelden en standaarddeviaties van RNA-opbrengst per monster van dezelfde donoren en alle technieken worden getoond. Voor alle RNA-monsters varieerden de A_{260}/A_{280} -verhoudingen van 1,8 tot 2,2.



Afbeelding 7. Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van RNA-opbrengst voor verschillende operators en PAXgene Blood RNA Kit-partijen met behulp van gepoolde bloedmonsters. Bloedmonsters van 30 verschillende donoren werden afgenomen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 buisjes per donor, 360 buisjes in totaal). De inhoud van de buisjes van 3 donoren werden gepoold en vervolgens opnieuw verdeeld in 36 monsters. Deze 36 monsters per pool van 3 donoren werden handmatig verwerkt door 3 verschillende operators. Elke operator gebruikte 3 verschillende PAXgene Blood RNA Kit-partijen voor de extractie en verwerkte viervoudige monsters van elk van de 10 donorpools. **[A]** RNA-opbrengst en standaarddeviatie voor elke combinatie van operator en partij. Viervoudige bloedmonsters van 10 donorpools werden verwerkt door 3 verschillende operators (A, B, C) met elk 3 partijen kits (1, 2, 3). De gemiddelde opbrengst (kolommen) en standaarddeviatie (foutbalken) worden weergegeven per viervoudig monster van dezelfde donorpool voor een andere operator en een andere kit. **[B]** CV van de RNA-opbrengst per donorpool voor alle combinaties van operator en partij (A, B, C; 1, 2, 3) zoals berekend van de gemiddelde opbrengst en de standaarddeviatie van de opbrengst zoals getoond in Afbeelding 7A.

Tabel 1A. Reproduceerbaarheid binnen elke partij en binnen elke gebruiker voor de geselecteerde donorpoolen (1, 6, 9, 10)

Combineren van gegevens	Donorpool 1 5,1 x 10 ⁶ cellen/ml			Donorpool 6 6,5 x 10 ⁶ cellen/ml		
	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)
Partij 1, gebruiker A	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
Partij 1, gebruiker B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
Partij 1, gebruiker C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
Partij 2, gebruiker A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
Partij 2, gebruiker B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
Partij 2, gebruiker C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
Partij 3, gebruiker A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
Partij 3, gebruiker B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
Partij 3, gebruiker C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
Combineren van gegevens	Donorpool 9 8,4 x 10 ⁶ cellen/ml			Donorpool 10 10,2 x 10 ⁶ cellen/ml		
	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)
Partij 1, gebruiker A	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
Partij 1, gebruiker B	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Partij 1, gebruiker C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Partij 2, gebruiker A	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Partij 2, gebruiker B	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Partij 2, gebruiker C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Partij 3, gebruiker A	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Partij 3, gebruiker B	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Partij 3, gebruiker C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3

Tabel 1B. Reproduceerbaarheid binnen elke gebruiker en tussen alle partijen voor geselecteerde donorpoolen (1, 6, 9, 10)

Combineren van gegevens	Donorpool 1 5,1 x 10 ⁶ cellen/ml			Donorpool 6 6,5 x 10 ⁶ cellen/ml		
	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)
Gebruiker A, alle partijen	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Gebruiker B, alle partijen	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Gebruiker C, alle partijen	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Combineren van gegevens	Donorpool 9 8,4 x 10 ⁶ cellen/ml			Donorpool 10 10,2 x 10 ⁶ cellen/ml		
	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)
Gebruiker A, alle partijen	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Gebruiker B, alle partijen	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Gebruiker C, alle partijen	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

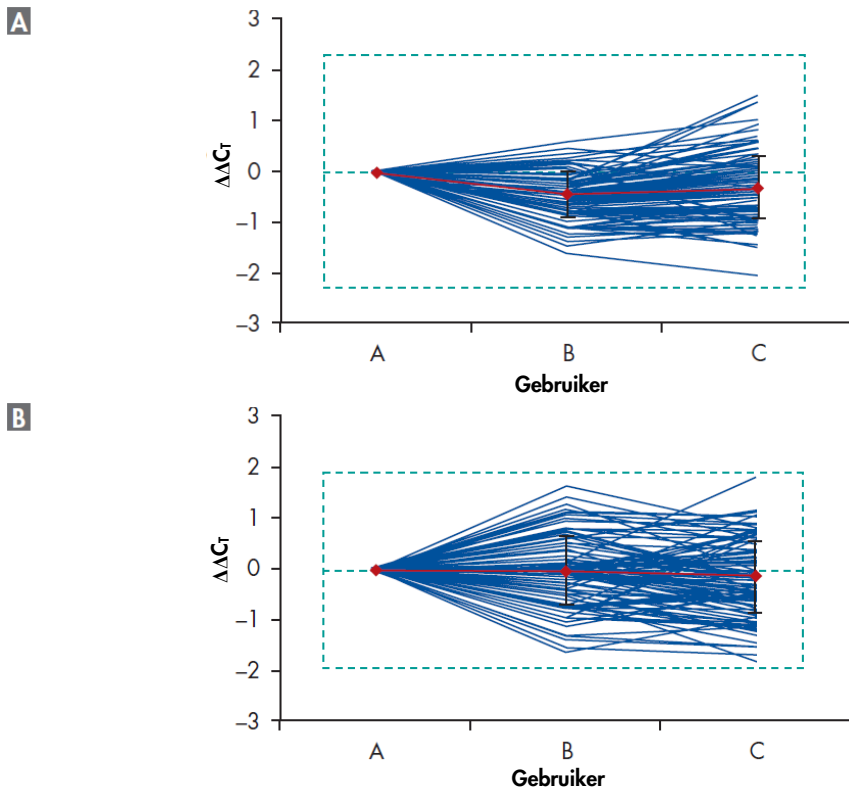
Tabel 1C. Reproduceerbaarheid binnen elke partij en tussen alle gebruikers voor de geselecteerde donorpoolen (1, 6, 9, 10).

Combineren van gegevens	Donorpool 1 5,1 x 10 ⁶ cellen/ml			Donorpool 6 6,5 x 10 ⁶ cellen/ml		
	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)
Partij 1, alle gebruikers	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Partij 2, alle gebruikers	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Partij 3, alle gebruikers	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Combineren van gegevens	Donorpool 9 8,4 x 10 ⁶ cellen/ml			Donorpool 10 10,2 x 10 ⁶ cellen/ml		
	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)
Partij 1, alle gebruikers	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Partij 2, alle gebruikers	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Partij 3, alle gebruikers	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

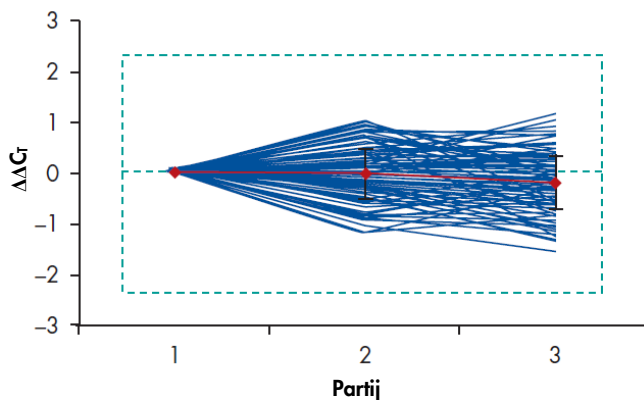
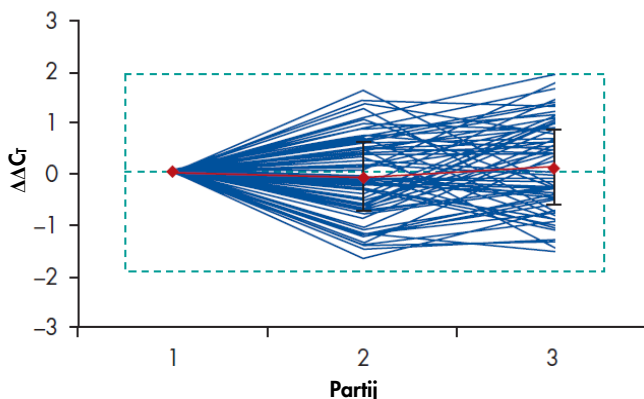
Tabel 1D. Reproduceerbaarheid tussen alle partijen en alle gebruikers voor de geselecteerde donorpoolen (1, 6, 9, 10).

	Donorpool 1 5,1 x 10 ⁶ cellen/ml			Donorpool 6 6,5 x 10 ⁶ cellen/ml		
	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)
Combineren van gegevens						
Partij 1, alle gebruikers	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
	Donorpool 9 8,4 x 10 ⁶ cellen/ml			Donorpool 10 10,2 x 10 ⁶ cellen/ml		
	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)	Gemiddelde opbrengst (µg)	SD (µg)	CV (%)
Combineren van gegevens						
Partij 1, alle gebruikers	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Gedetailleerde analyse van 4 representatieve donorpoolen. De donorpoolen zijn geselecteerd aan de hand van het aantal witte bloedcellen en weerspiegelen de bovenste, middelste en onderste waarden van het normale bereik van het aantal witte bloedcellen ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocyten/ml). Het aantal witte bloedcellen geeft de gemiddelde waarde van de aantallen witte bloedcellen van de 3 donoren per donorpool weer.



Afbeelding 8. Reproduceerbaarheid van RT-PCR — tussen gebruikers. RNA gezuiverd in het in Afbeelding 7 beschreven experiment is gebruikt voor realtime RT-PCR. Relatieve transcriptniveaus van **[A]** FOS en **[B]** IL1B zijn bepaald door realtime, tweevoudige RT-PCR waarbij 18S rRNA is gebruikt als internationale standaard. De waarden voor alle monsters zijn in kaart gebracht, in vergelijking met de waarden voor gebruiker 1 (10 donorpools x 3 kitpartijen x 4 replica's = 120 sets met gegevens voor elk gen), met gemiddelden (rode lijnen) en standaarddeviaties (zwarte balken) voor alle getoonde monsters. De gestreepte lijnen tonen de $\pm 3\times$ totale precisie van de assays (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

A**B**

Afbeelding 9. Reproduceerbaarheid van RT-PCR — tussen kitpartijen. RNA gezuiverd in het in Afbeelding 7 beschreven experiment is gebruikt voor realtime RT-PCR. Relatieve transcriptniveaus van **[A]** FOS en **[B]** IL1B zijn bepaald door realtime, tweevoudige RT-PCR waarbij 18S rRNA is gebruikt als internationale standaard. De waarden voor alle monsters zijn in kaart gebracht, in vergelijking met de waarden voor kitpartij 1 (10 donorpools x 3 gebruikers x 4 replica's = 120 sets met gegevens voor elk gen), met gemiddelden (rode lijnen) en standaarddeviaties (zwarte balken) voor alle getoonde monsters. De gestreepte lijnen tonen de $\pm 3x$ totale precisie van de assays (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

Tabel 2. Samenvatting van de RT-PCR-gegevens uit Afbeelding 8 en 9

Testsysteem	FOS/18S rRNA-assay		IL1B/18S rRNA-assay	
	Gemiddelde ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Gemiddelde ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Reproduceerbaarheid binnen elke gebruiker en tussen alle partijen				
Alle gebruikers, partij 1–partij 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Alle gebruikers, partij 1–partij 2	–0,03	0,48	–0,07	0,66
Alle gebruikers, partij 1–partij 3	–0,21	0,52	0,11	0,71
Reproduceerbaarheid binnen elke gebruiker en tussen alle partijen				
Alle partijen, gebruiker A–gebruiker A	0,00	0,00	0,00	0,00
Alle partijen, gebruiker A–gebruiker B	–0,46	0,44	–0,06	0,69
Alle partijen, gebruiker A–gebruiker C	–0,31	0,60	–0,15	0,71

Gebruiker: Technicus, heeft het onderzoek uitgevoerd.

Partij: Nummer van de in het onderzoek gebruikte kit.

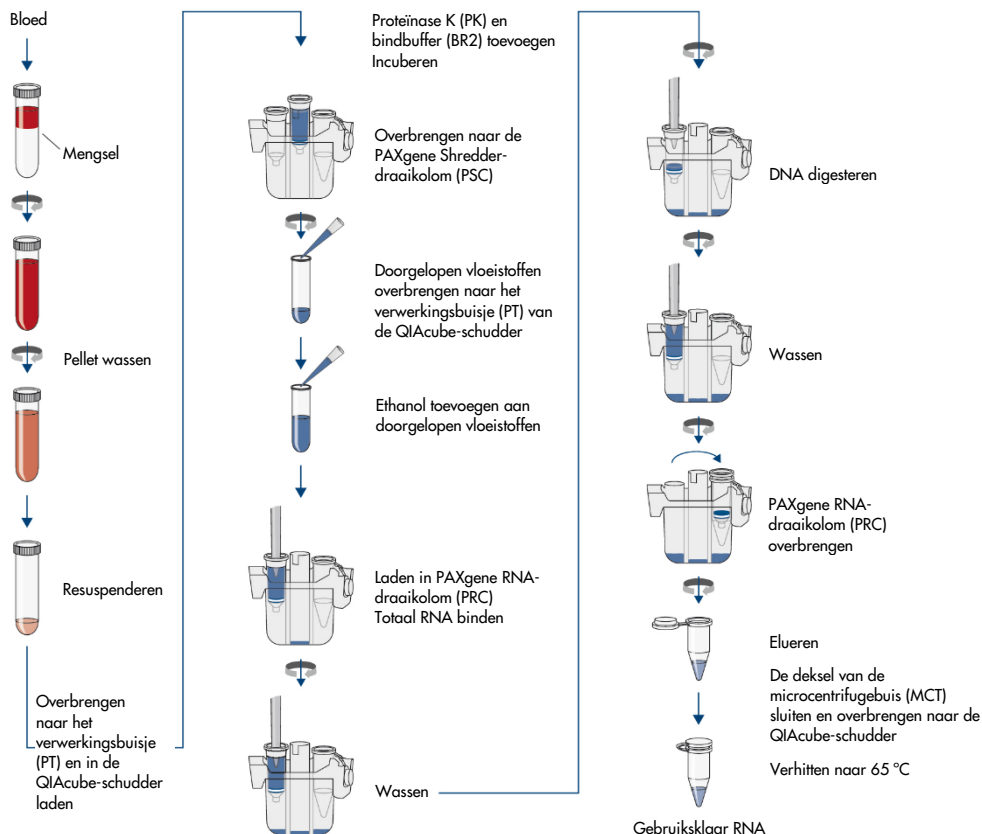
SD: Standaarddeviatie.

Gemiddelde $\Delta\Delta C_T$ -waarden (N = 120) en standaarddeviaties worden getoond voor de gegevens weergegeven in Afbeelding 8 en 9.

Geautomatiseerde RNA-zuivering

Monsterbereiding is geautomatiseerd met behulp van het standaard QIAcube®-instrument (cat.nr. 9001882 [110 V], cat.nr. 9001293 [230 V]; zonder QIAcube Connect) en volgt dezelfde stappen als bij de handmatige procedure, zodat u verder kunt gaan met het zuiveren van hoogwaardig RNA met de PAXgene Blood RNA Kit. Raadpleeg de Gebruikershandleiding bij de QIAcube (*QIAcube User Manual*) en www.qiagen.com/MyQIAcube voor meer informatie over de QIAcube.

Het geautomatiseerde RNA-zuiveringsprotocol bestaat uit 2 delen (of protocollen), 'PAXgene Blood RNA Part A' en 'PAXgene Blood RNA Part B', met een korte handmatige interventie tussen de 2 delen (zie Afbeelding 10, pagina 30).



Afbeelding 10. De geautomatiseerde PAXgene Blood RNA-procedure.

De gecentrifugeerde, gewassen en geresuspendeerde nucleïnezuurpellet (zie 'RNA-concentratie en purificatie', pagina 19) is overgebracht van de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) naar verwerkingsbuisjes (PT) die zijn geplaatst in de thermoschudeenheid op de QIAcube-werktafel. De operator selecteert en start het protocol 'PAXgene Blood RNA Part A' uit het menu. De QIAcube voert de stappen van het protocol uit tot de elutie van RNA in de elutiebuffer (BR5). De operator brengt de microcentrifugebuisjes (MCT) met het gezuiverde RNA over naar de thermoschudeenheid van de QIAcube. De operator selecteert en start het

protocol 'PAXgene Blood RNA Part B' uit het menu en denaturatie door verhitting wordt uitgevoerd door de QIAcube.

De gemiddelde monsterbereidingstijd (op basis van gegevens uit 12 monsterbereidingsruns) is ongeveer 151 minuten*. Er is aanzienlijk minder tijd nodig voor handelingen van de gebruiker in vergelijking met het handmatige protocol.

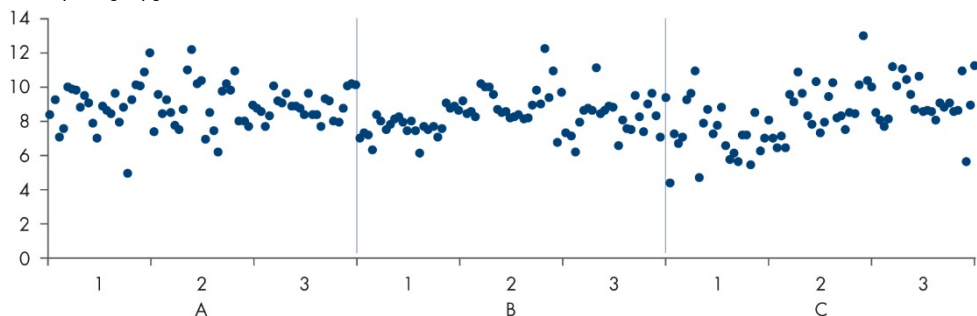
RNA-opbrengst van 2,5 ml gezond menselijk volbloed is $\geq 3 \mu\text{g}$ bij $\geq 95\%$ van de verwerkte monsters. Afbeelding 11 (pagina 32) toont de RNA-opbrengsten uit totaal 216 monsters die zijn geprepareerd met behulp van het geautomatiseerde protocol met 3 kitpartijen door 3 operators. Aangezien voor deze onderzoeken gepoolde bloedmonsters werden gebruikt in plaats van individuele PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), weerspiegelen de resultaten niet de RNA-opbrengst die wordt verwacht van enkele monsters van individuele bloedafnames. Aangezien opbrengsten sterk afhankelijk zijn van de donor kunnen individuele opbrengsten variëren (Afbeelding 11, pagina 32).

Bij minstens 95% van de monsters werd geen remming van RT-PCR gedetecteerd, wanneer er tot 30% van het eluaat werd gebruikt. Met behulp van het geautomatiseerde protocol is kruiscontaminatie tussen monsters niet detecteerbaar, zoals gemeten door kwantitatieve, realtime RT-PCR van sequenties van de ABL1- en FOS-transcripten in RNA-negatieve monsters (water) gecombineerd met RNA-positieve monsters (menselijk volbloed) in dezelfde run.

RNA gezuiverd met het PAXgene Blood RNA System en het geautomatiseerde protocol is puur, zoals wordt aangetoond door het gebrek aan remming van RT-PCR (zie Afbeelding 11, pagina 32) en de waarden van A_{260}/A_{280} tussen 1,8 and 2,2. Genomisch DNA van $\leq 1\%$ (w/w) is aanwezig in $\geq 95\%$ van alle monsters, gemeten met behulp van kwantitatieve realtime PCR van een sequentie van het gen voor bèta-actine. Afbeelding 12 en 13 (pagina's 32 en 33) tonen de A_{260}/A_{280} -waarden en relatief genomisch DNA uit totaal 216 monsters die zijn geprepareerd met behulp van het geautomatiseerde protocol met 3 kitpartijen door 3 operators.

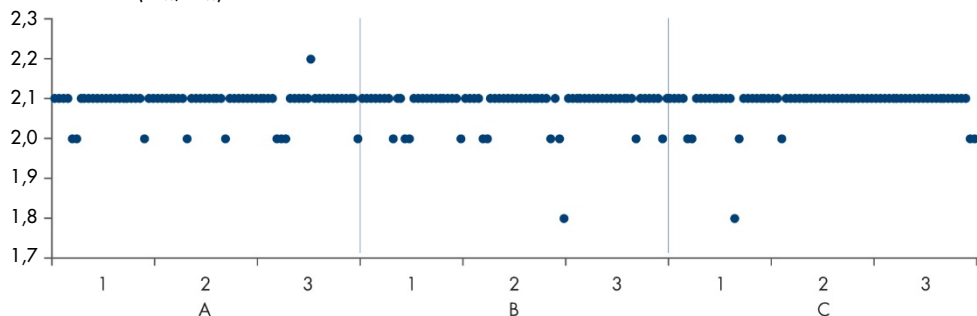
* De totale looptijd van het protocol, inclusief de voorafgaande verwerking van PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugaties, pelletwassing en pelletresuspensie).

RNA-opbrengst ($\mu\text{g}/2,5 \text{ ml}$ bloed)

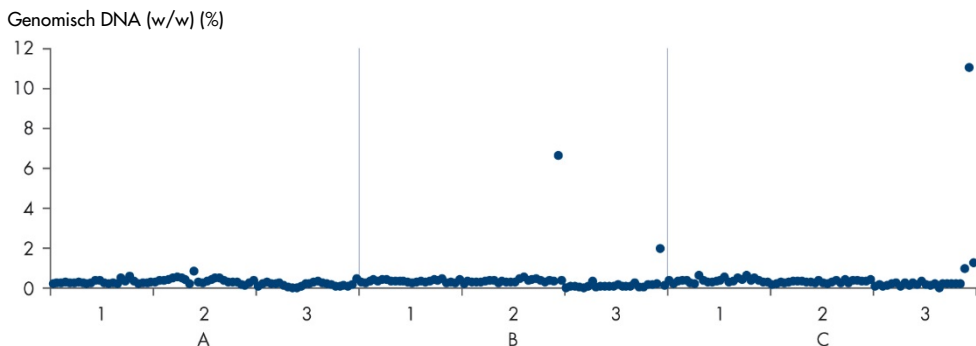


Afbeelding 11. RNA-opbrengst — geautomatiseerde verwerking. Bloedmonsters van 36 verschillende donoren werden afgenomen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 6 buisjes per donor, 216 buisjes in totaal). De inhoud van de buisjes van 6 donoren werden gepoold en vervolgens opnieuw verdeeld in 36 monsters. Deze 36 monsters per pool van 6 donoren werden verwerkt door 3 verschillende operators (A, B, C). Elke operator gebruikte 3 verschillende partijen (1, 2, 3) van de PAXgene Blood RNA Kit voor de geautomatiseerde extractie en verwerkte viervoudige monsters van elk van de 6 donorpoolen. RNA-opbrengsten van alle individuele monsters worden getoond voor elke combinatie van operator en partij.

RNA-zuiverheid (A_{260}/A_{280})

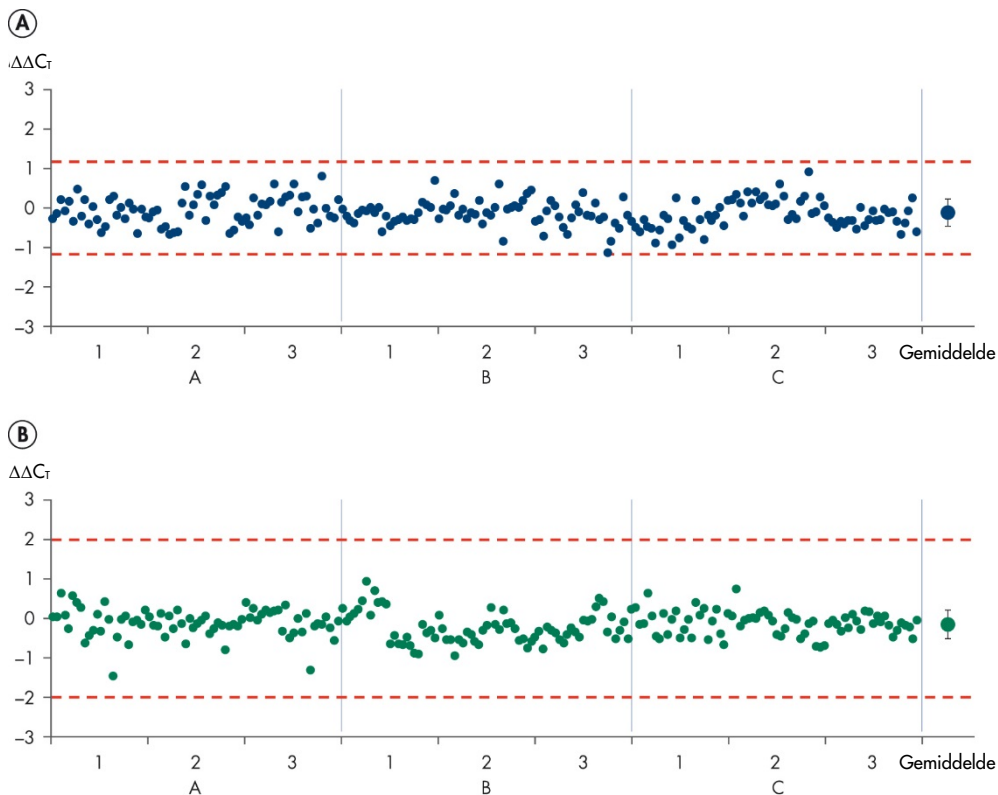


Afbeelding 12. RNA-zuiverheid (A_{260}/A_{280} -waarden) — geautomatiseerde verwerking. RNA is gezuiverd door 3 verschillende operators (A, B, C) met behulp van 3 verschillende partijen (1, 2, 3) van de PAXgene Blood RNA Kit in het experiment dat wordt beschreven in Afbeelding 11. A_{260}/A_{280} -waarden van alle individuele monsters worden getoond voor elke combinatie van operator en partij.



Afbeelding 13. RNA-zuiverheid (% genomisch DNA contaminatie) — geautomatiseerde verwerking. RNA is gezuiverd door 3 verschillende operators (A, B, C) met behulp van 3 verschillende partijen (1, 2, 3) van de PAXgene Blood RNA Kit in het experiment dat wordt beschreven in Afbeelding 11. Hoeveelheden genomisch DNA (w/w) in alle individuele monsters worden getoond voor elke combinatie van operator en partij.

Het geautomatiseerde protocol van RNA-zuivering met behulp van het PAXgene Blood RNA System biedt zeer reproduceerbare en herhaalbare RT-PCR-resultaten, zoals getoond in Afbeelding 14 (pagina 34), waardoor het zeer robuust is voor klinisch diagnostische tests.



Afbeelding 14. Reproduceerbaarheid van RT-PCR — tussen geautomatiseerde en handmatige protocollen. RNA is gezuiverd door 3 verschillende operators (A, B, C) met behulp van 3 verschillende partijen (1, 2, 3) van de PAXgene Blood RNA Kit met behulp van het geautomatiseerde protocol in het experiment dat wordt beschreven in Afbeelding 11. Parallel werd RNA gezuiverd van de overeenkomstige buizen met replica's met behulp van het handmatige protocol. Relatieve transcriptniveaus van **[A]** FOS en **[B]** IL1B zijn bepaald door realtime, tweevoudige RT-PCR waarbij 18S rRNA is gebruikt als internationale standaard. Mogelijke verschillen in transcriptniveaus tussen RNA bereid uit gepoolde bloedmonsters met behulp van beide extractieprotocollen (geautomatiseerd en handmatig protocol) werden berekend met behulp van de $\Delta\Delta C_T$ -methode. Individuele $\Delta\Delta C_T$ -waarden voor alle monsterparen (4 replica's x 6 donorpools x 3 kitpartijen x 3 operators = 216 paar voor elk gen) zijn in kaart gebracht als enkele stippen met gemiddelden (grotere stippen) en standaarddeviaties (zwarte balken) voor alle getoonde monsters. De gestreepte lijnen tonen de $\pm 3x$ totale precisie van de assays (FOS: 1,16 C_T ; IL1B: 1,98 C_T ; verschillende assayprecisies in vergelijking met Afbeelding 1–4, 8 en 9 vanwege verschillende assayversies).

Apparatuur en reagentia die door de gebruiker moeten worden geleverd

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Voor alle protocollen

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; cat.nr. 762165)
- Ethanol (96–100%, zuiverheidsgraad p.a.)
- Pipetten* (10 µl – 4 ml)
- Steriel, aerosolfilter, RNase-vrije pipettips†
- Maatcilinder‡
- Centrifuge* in staat om 3000-5000 x g te bereiken en uitgerust met een uitzwaairotor en emmers om de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) te houden
- Vortexmixer*
- Ijsschaafsel
- Permanente pen voor etikettering

Voor het handmatige protocol

- Microcentrifuge met variabele snelheid* in staat om een bereik van minimaal 1000–8000 x g te bereiken, hoewel lagere en hogere g-krachten van toepassing zijn (zie de

* Controleer of de instrumenten regelmatig zijn gecontroleerd, onderhouden en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

† Zorg dat u bekend bent met de richtlijnen voor de verwerking van RNA (bijlage A, pagina 64).

‡ Voor de toevoeging van ethanol aan buffer BR4-concentraat.

protocolstappen voor informatie), en uitgerust met een rotor voor 2ml-microcentrifugebuisjes

- Schudincubator* in staat om bij 55 °C en 65 °C te incuberen en schudden met ≥ 400 tpm, maximaal 1400 tpm (zoals de Eppendorf® Thermomixer Compact, of gelijkwaardig)

Voor het geautomatiseerde protocol

- QIAcube* (QIAGEN, cat.nr. 9001882 [110 V], cat.nr. 9001293 [230 V])
- Schaar

QIAcube-verbruiksartikelen

- Filter-Tips, 1000 μ l (1024) (QIAGEN, cat.nr. 990352)†
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, cat.nr. 990393)†
- Rotor Adapters (10 x 24) (QIAGEN, cat.nr. 990394)†

QIAcube-accessoires

- Reagent Bottle Rack (QIAGEN, cat.nr. 990390)†
- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, cat.nr. 990392)†

* Controleer of de instrumenten regelmatig zijn gecontroleerd, onderhouden en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

† Ook inbegrepen in het Starterpakket, QIAcube (QIAGEN, cat.nr. 990395)

Belangrijke opmerkingen

De QIAcube gebruiken

Zorg dat u bekend bent met het bedienen van de QIAcube. Lees de *Gebruikershandleiding bij de QIAcube* en de aanvullende informatie die bij de QIAcube wordt meegeleverd, schenk hierbij met name aandacht aan de veiligheidsinformatie, voordat de geautomatiseerde PAXgene Blood RNA-protocollen worden gestart.

De QIAcube starten

Sluit de deur van de QIAcube en schakel de QIAcube in met de aan-uitschakelaar (zie Afbeelding 15, pagina 38).

Er klinkt een piep en het startscherm verschijnt. Het instrument voert automatisch de initialisatietests uit.

Protocollen installeren op de QIAcube

Een initiële installatie van protocollen wordt vereist voordat de eerste RNA-bereidingsrun op de QIAcube kan worden uitgevoerd. Installeer de protocollen van zowel 'PAXgene Blood RNA Part A' als 'PAXgene Blood RNA Part B'.

Protocollen zijn beschikbaar via **www.qiagen.com/MyQIAcube** en moeten worden gedownload naar de bij USB-stick die bij de QIAcube is meegeleverd en via de USB-poort naar de QIAcube worden overgebracht.

De USB-poort bevindt zich achter het beschermpaneel (zie Afbeelding 15, pagina 38), hier kan een USB-stick (meegeleverd met de QIAcube) worden aangesloten op de QIAcube.

Gegevensbestanden, zoals logbestanden of rapporten, kunnen ook via de USB-poort van de QIAcube naar de USB-stick worden overgezet.



Gebruik de USB-poort alleen voor de USB-stick die door QIAGEN wordt geleverd. Sluit geen andere apparatuur aan op deze poort.



Verwijder de USB-stick niet tijdens het downloaden van protocollen of tijdens het overzetten van gegevensbestanden of tijdens het uitvoeren van een protocol.



Afbeelding 15. Vooraanzicht van de QIAcube.

1

Aanraakscherm

2

Deur

3

RS232-seriële poort achter beschermpaneel
(alleen voor gebruik door QIAGEN-
instrumentonderhoudspecialisten)

4

USB-poort achter beschermpaneel

5

Aan-uitschakelaar

6

Afvallade

De QIAcube laden

Om tijd te besparen kan het laden worden uitgevoerd tijdens een of beide van de 10-minuten centrifugatiestappen (stap 3 en 5) in 'Protocol: Geautomatiseerde zuivering van totaal-RNA uit menselijk volbloed afgenomen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)', pagina 56.

Reagensflessen

Vul voor elke run op de QIAcube de 4 reagensflessen voorzichtig met de reagentia uit tabel 3. Vul ze tot het maximale indicatieniveau of, wanneer dit niet mogelijk is, tot het niveau dat is toegestaan door de buffervolumes die worden geleverd met de PAXgene Blood RNA Kit. Voorzie de flessen en deksels duidelijk van een etiket met de buffernamen en plaats de gevulde reagensflessen op de juiste posities in het reagensflessenrek. Laad het rek in de QIAcube-werktafel zoals getoond (Afbeelding 16 en 17, pagina's 40 en 41).



Het geleverde volume van buffer BR2 vult de reagensfles niet tot het indicatieniveau. Buffers BR3 en BR4 vullen de fles mogelijk niet tot het indicatieniveau na het verwerken van meerdere monsters in eerdere runs.



Verwijder de deksels van de flessen voordat u deze in de werktafel plaatst.

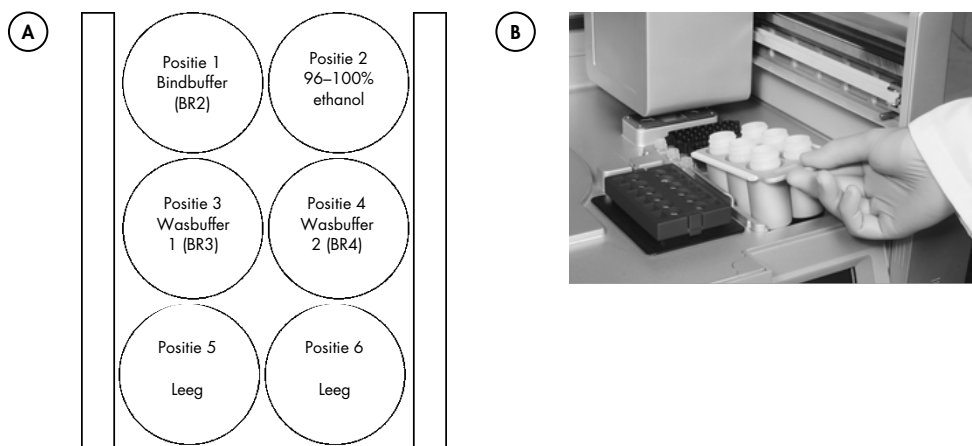


Buffervolumes die zijn geleverd in de PAXgene Blood RNA Kit (50) zijn voldoende voor maximaal 7 RNA-bereidingsruns met de QIAcube, met monsteraantallen van 2 tot 12 per run. In het algemeen dienen runs met lage monsteraantallen te worden vermeden om in totaal 50 monsters per kit te verwerken, met maximaal 7 RNA-bereidingsruns. Meer dan 7 RNA-bereidingsruns kan zorgen voor onvoldoende buffervolumes voor het verwerken van de laatste monsters.

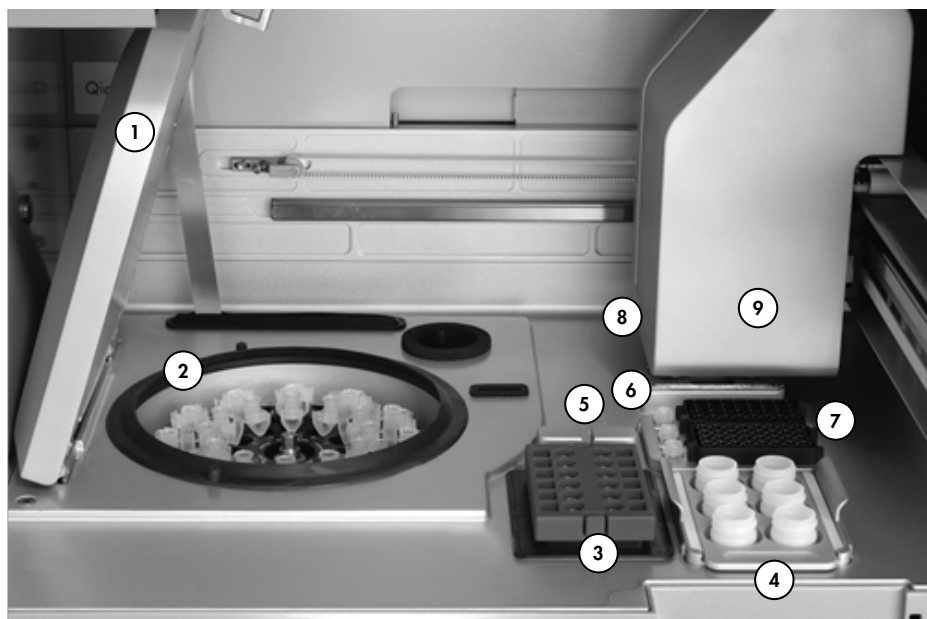
Tabel 3. Posities in het reagensflessenrek

Positie	Reagens
1	Bindbuffer (BR2)
2	96–100% ethanol
3	Wasbuffer 1 (BR3)
4	Wasbuffer 2 (BR4)*
5	– (leeg laten)
6	– (leeg laten)

* Wasbuffer 2 (BR4) wordt geleverd als concentraat. Voeg 4 volumes ethanol (96–100%, zuiverheidsgraad p.a.) toe volgens de instructies op de fles om een werkoplossing te verkrijgen voordat u het concentraat voor de eerste keer gebruikt.



Afbeelding 16. Het reagensflessenrek laden. [A] Schematische weergave van de posities en inhoud van de flessen in het reagensflessenrek. [B] Het rek in de QIAcube laden.



Afbeelding 17. Binnenkant van de QIAcube.

- | | | | |
|---|-------------------|---|-----------------------------------|
| ① | Centrifugedeksel | ⑥ | Slots voor microcentrifugebuisjes |
| ② | Centrifuge | ⑦ | Tiprekken |
| ③ | Schudder | ⑧ | Afvoerslots voor tips en kolommen |
| ④ | Reagensflessenrek | ⑨ | Robotarm |
| ⑤ | Tipsensor | | |

Draaikolommen (PRC, PSC), microcentrifugebuisjes (MCT) en kunststof artikelen van QIAcube

Plaats 2 tiprekken gevuld met 1000µl-filtertips op de QIAcube (zie Afbeelding 17, pagina 41). Vul de rekken zo nodig bij met tips.



Gebruik alleen 1000µl-filtertips die zijn ontworpen voor gebruik met de QIAcube.

Voorzie voor elk monster de rotoradapters en microcentrifugebuisjes (MCT) van etikettering met een permanente pen. Open de te gebruiken PAXgene Shredder-draaikolommen (PSC) en knip de deksels volledig af met behulp van een schaar (zie Afbeelding 18, pagina 43).



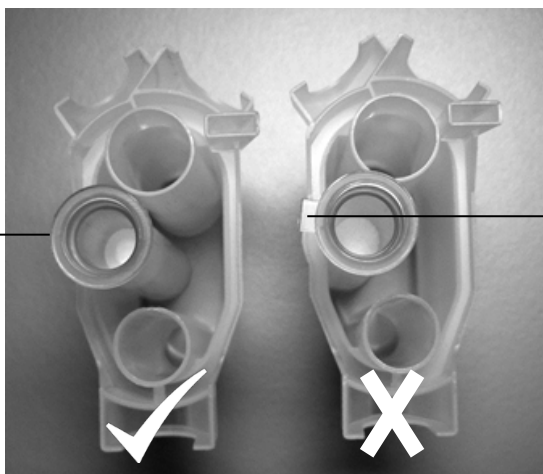
Voor de juiste bediening van de QIAcube-robotgrijper, verwijder de deksels volledig (knip deze af) en verwijder ook alle plastic onderdelen waarmee de deksels vastzitten aan de PAXgene Shredder-draaikolommen (PSC; zie Afbeelding 16). Anders kan de robotgrijper de draaikolommen niet correct vastgrijpen (PSC, PRC).

Laad de PAXgene RNA-draaikolom (PRC), de PAXgene Shredder-draaikolom (PSC, zonder deksel) en de microcentrifugebuis met etiket (MCT) in de juiste posities in elke gelabelde rotoradapter zoals getoond in tabel 4 en Afbeelding 19 (pagina 43).



Controleer of de deksels van de draaikolom (PRC) en de microcentrifugebuis (MCT) volledig naar beneden in de slots gedrukt zijn aan de rand van de rotoradapter, anders breken de deksels af tijdens de centrifugatie.

Kolomdeksel
volledig
verwijderd



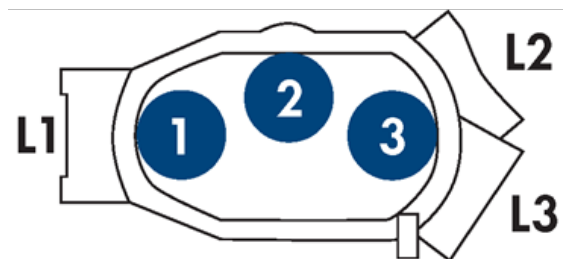
Kolomdeksel
niet volledig
verwijderd;
een deel van
de deksel is
nog bevestigd

Afbeelding 18. De PAXgene Shredder-draaikolommen (PSC) laden. De PAXgene Shredder-draaikolom (PSC) wordt in de middelste positie van de rotoradapter geladen. Knip de deksel af voor het laden van de kolom (PSC).

Tabel 4. Laboratoriummateriaal in de rotoradapter

Positie	Reagens	Positie van de deksel
1	PAXgene RNA-draaikolom (rood, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder-draaikolom (lila, PSC) (knip de deksel af voor het plaatsen in de rotoradapter)	–
3	Microcentrifugebuis (MCT)*	L3

* Gebruik de microcentrifugebuisjes (1,5 ml) die met de PAXgene Blood RNA Kit worden meegeleverd.



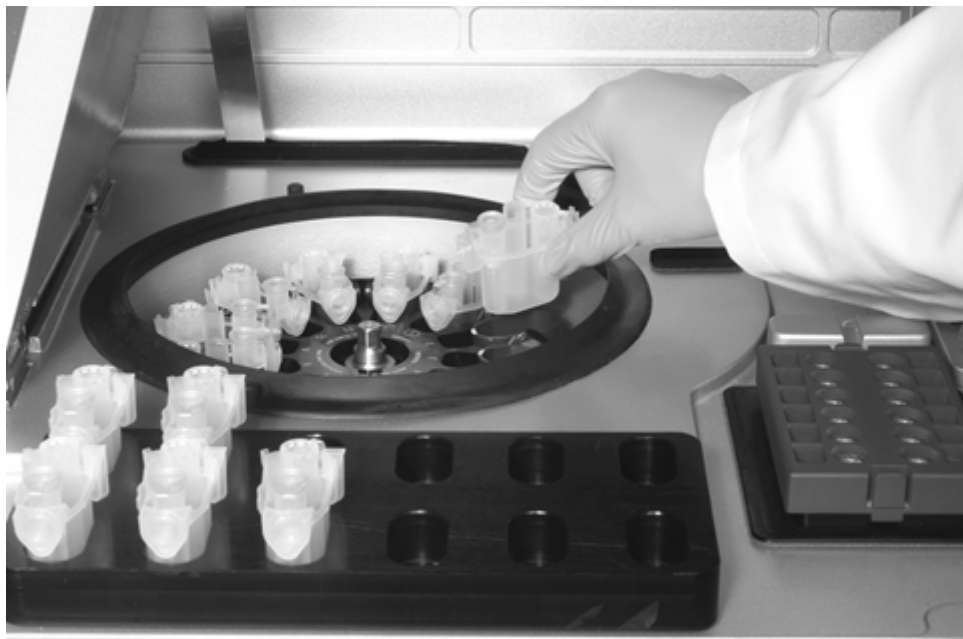
Afbeelding 19. Posities in de rotoradapter. De rotoradapter heeft drie posities voor buisjes (1–3) en drie posities voor de deksel (L1–L3).

De centrifuge laden

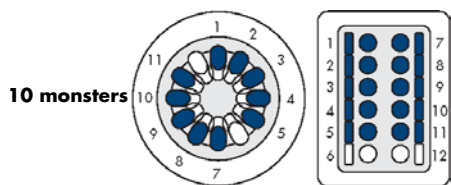
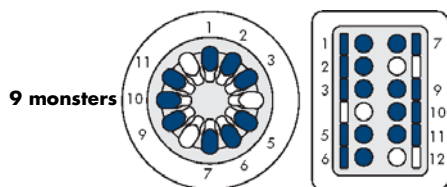
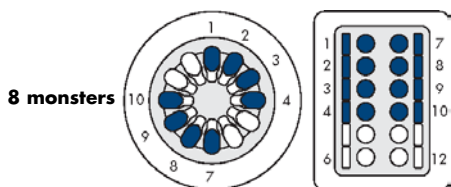
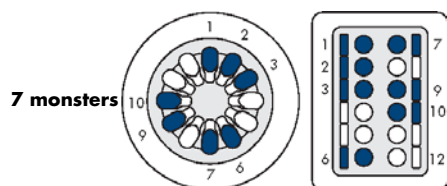
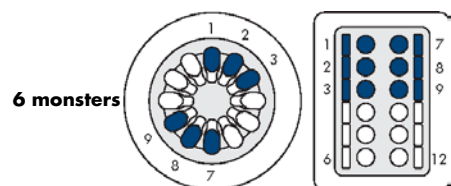
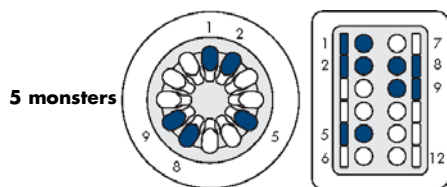
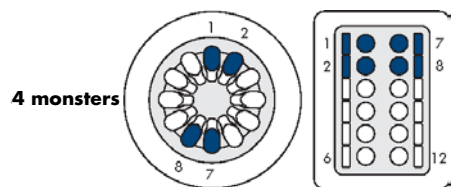
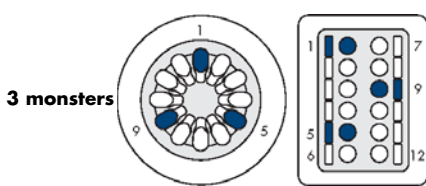
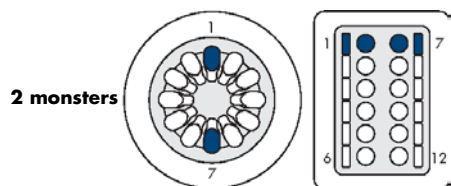
Laad de samengestelde rotoradapters in de centrifuge-emmers zoals hieronder getoond in Afbeelding 20.



Zorg er bij het laden voor dat de centrifuge-rotor radiaal wordt gebalanceerd wanneer er minder dan 12 monsters worden verwerkt (zie Afbeelding 21, pagina 45). Alle centrifuge-emmers moeten worden bevestigd voordat een protocolrun wordt gestart, ook al worden er minder dan 12 monsters verwerkt. Eén monster of 11 monsters kunnen niet worden verwerkt.



Afbeelding 20. De centrifuge laden. Laad de samengestelde rotoradapters in de centrifuge-emmers.



Afbeelding 21. De centrifuge en de schudder laden. De posities van de centrifuge en de schudder worden getoond van twee (2 monsters) tot tien (10 monsters) monsters. Eén of 11 monsters kunnen niet worden verwerkt.

Verwerkingsbuisjes (PT)

Verwijder de verwerkingsbuisjes (PT) van de eerdere runs aan de linkerzijde in de slots voor de microcentrifugebuisjes (zie Afbeelding 17, pagina 41). Vul 3 verwerkingsbuisjes (PT) met de hoeveelheid reagentia zoals aangegeven in tabel 5, overeenkomstig met het aantal monsters in de run.

Pipetteer het aangegeven volume DNA-digestiebuffer (RDD) in een verwerkingsbuisje (PT) voor het DNase I-incubatiemengsel en voeg het aangegeven volume van voorraad DNase I (RNFD)-oplossing toe. Pipetteer het volledige mengsel 3 maal voorzichtig op en neer met behulp van een 1000µl-pipettip om te mengen.

Gebruik de 2ml-verwerkingsbuisjes (PT) die met de PAXgene Blood RNA Kit worden geleverd. Voorzie de busjes (PT) duidelijk van etikettering met reagensnamen en plaats ze in de juiste positie in de slots voor microcentrifugebuisjes, zoals weergegeven in tabel 6 (pagina 47).



DNase I (RNFD) is met name gevoelig voor fysieke denaturatie. Meng alleen door te pipetteren en gebruik pipettips met een wijde opening om afbraak te voorkomen. Niet vortexen.



Pipetteer alleen het vereiste volume zoals weergegeven in tabel 5.

Tabel 5. Volume van reagentia vereist voor de verwerkingsbuisjes voor in de slots voor microcentrifugebuisjes

Aantal monsters	Reagensvolume voor het aangegeven aantal monsters (µl)		
	Proteïnase K (PK)	DNase I-incubatiemengsel	Elutiebuffer (BR5)
2	126	187 (23 DNase I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNase I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNase I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNase I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNase I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNase I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNase I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNase I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNase I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNase I + 806 Buffer RDD)	1177

Tabel 6. Slots voor microcentrifugebuisjes

	Positie		
	A	B	C
Inhoud	Proteïnase K (PK)	DNase I-incubatiemengsel	Elutiebuffer (BR5)
Vat	Verwerkingsbuisje (PT)*	Verwerkingsbuisje (PT)*	Verwerkingsbuisje (PT)*

* Gebruik de 2ml-verwerkingsbuisjes (PT) die met de PAXgene Blood RNA Kit worden geleverd.

Protocol: Handmatige zuivering van totaal RNA uit menselijk volbloed afgenomen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Wat u moet weten voor u begint

- Controleer of de doos intact en onbeschadigd is en dat de buffers niet hebben gelekt. Gebruik geen kit die beschadigd is.
- Zorg er bij gebruik van een pipet voor dat het juiste volume is ingesteld en dat vloeistof zorgvuldig en volledig wordt afgezogen en afgegeven.
- Om te voorkomen dat monsters naar de verkeerde buis of draaikolom worden overgebracht, moet u ervoor zorgen dat alle buisjes en spinkolommen op de juiste manier zijn voorzien van een etiket met een permanente pen. Voorzie de deksel en elke fysieke buis (PT, MCT) van een etiket. Voorzie de draaikolommen voorzie u het fysieke verwerkingsbuisje (PT) van een etiket. Sluit elke buis of draaikolom nadat er vloeistoffen naartoe zijn overgebracht.
- Het morsen van monsters en buffers tijdens de procedure kan de opbrengst en de zuiverheid van RNA beïnvloeden.
- Tenzij anders aangegeven, moeten alle centrifugatiestappen worden gedaan bij kamertemperatuur (15–25 °C).

Technieken waarin gebruik wordt gemaakt van nucleïnezuuramplificatie zijn erg gevoelig; de volgende voorzorgsmaatregelen zijn daarom noodzakelijk om kruiscontaminatie tussen monsterbereidingen te voorkomen:

- Pipetteer het monster voorzichtig in de draaikolom (PRC, PSC) zonder de rand van de kolom te bevochtigen.

- Gebruik iedere keer na het overbrengen van vloeistof een nieuwe pipettip. Gebruik pipettips met een aerosolfilter.
- Raak het membraan van de draaikolom (PRC, PSC) niet aan met de pipettip.
- Centrifugeer het monster kort om eventuele druppeltjes aan de onderkant van de deksel te verwijderen, na het vortexen of verhitten van een microcentrifugebuisje (MCT).
- Draag handschoenen tijdens de gehele procedure. Als de handschoenen in aanraking komen met het monster moeten de handschoenen onmiddellijk worden vervangen.
- Sluit de draaikolom (PRC, PSC) voordat u deze in de microcentrifuge plaatst. Centrifugeer zoals beschreven in de procedure.
- Open niet meer dan één draaikolom (PRC, PSC) tegelijk en zorg dat er geen aerosolen kunnen worden gevormd.
- Om meerdere monsters tegelijkertijd efficiënt te kunnen verwerken, vult u een rek met de benodigde verwerkingsbuisjes (PT) zodat draaikolommen (PRC, PSC) na centrifugatie naar de buisjes kunnen worden overgebracht. Gooi de gebruikte verwerkingsbuisjes (PT) die doorgelopen vloeistoffen bevatten weg en plaats nieuwe verwerkingsbuisjes (PT) die draaikolommen (PRC, PSC) bevatten direct in de microcentrifuge.



Wat u moet doen voor u begint



- Bloed moet worden verzameld in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) volgens de instructies in de *Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Tube*. Zie indien nodig bijlage C (pagina 69) voor aanbevelingen over de verwerking van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Zorg ervoor dat de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) minimaal 2 uur geïncubeerd zijn op kamertemperatuur na de bloedafname om volledige lyse van bloedcellen te garanderen. Incubatie van de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) gedurende de gehele nacht kan de opbrengst vergroten. Als de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) is opgeslagen bij 2–8 °C, –20 °C of –70 °C na de bloedafname, laat deze dan eerst op kamertemperatuur komen en sla deze daarna 2 uur op bij kamertemperatuur voordat u de procedure start.

- Lees de veiligheidsinformatie op pagina 9.
- Lees de richtlijnen voor de verwerking van RNA (bijlage A, pagina 66).
- Zorg ervoor dat instrumenten, zoals pipetten en de schudincubator, regelmatig worden gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.
- Een schudincubator is vereist bij stap 5 en stap 20. Stel de temperatuur van de schudincubator in op 55 °C.
- Er kan in bindbuffer (BR2) tijdens opslag een precipitaat ontstaan. Verwarm, indien nodig, tot 37 °C om deze op te lossen.
- Wasbuffer 2 (BR4) wordt geleverd als concentraat. Voeg 4 volumes ethanol (96–100%, zuiverheidsgraad p.a.) toe volgens de instructies op de fles om een werkoplossing te verkrijgen voordat u het concentraat voor de eerste keer gebruikt.
- Bereid voorraad DNase I-oplossing wanneer u de RNase-Free DNase Set voor het eerst gebruikt. Los de vaste DNase I (RNFD; 1500 Kunitz-eenheden)* op in 550 µl DNase-resuspensiebuffer (DRB) die wordt meegeleverd met de set. Let op dat er geen DNase I (RNFD) verloren gaat bij het openen van de flacon. Vortex de gereconstitueerde DNase I (RNFD) niet. DNase I is met name gevoelig voor fysieke denaturatie. Meng alleen door het buisje voorzichtig om te keren.
- Huidige gegevens tonen aan dat gereconstitueerd DNase I (RNFD) maximaal 6 weken kan worden opgeslagen bij 2–8 °C. Verwijder voor langetermijnopslag van DNase I (RNFD) de voorraadoplossing uit de glazen flacon, verdeel het in aliquots voor eenmalig gebruik (gebruik de 1,5ml-microcentrifugebuisjes [MCT] die met de kit worden geleverd; er zijn genoeg voor 5 aliquots) en sla ze tot 9 maanden op bij –20 °C. Ontdooide aliquots kunnen tot 6 weken worden opgeslagen bij 2–8 °C. Vries de aliquots niet opnieuw in na het ontdooien.
- Zorg er bij het reconstitueren van DNase I (RNFD) en het invullen van aliquots voor dat u de richtlijnen voor de verwerking van RNA volgt (bijlage A, pagina 66).

* Kunitz-eenheden worden algemeen gebruikt als eenheden voor het meten van DNase I, gedefinieerd als de hoeveelheid DNase I die een toename veroorzaakt in A_{260} van 0,001 per minuut per milliliter bij 25 °C, pH 5,0, met sterk gepolymeriseerd DNA als het substraat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 en 363).

Procedure

1. Centrifugeer de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 10 minuten met 3000–5000 x g met behulp van een uitzwaairotor.
 -  Zorg ervoor dat het bloedmonster minimaal 2 uur op kamertemperatuur (15–25 °C) is geïncubeerd in de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) om volledige lyse van bloedcellen te bereiken.
 -  De rotor moet de buisadapters voor buisjes met een ronde onderkant bevatten. Als er andere buisjes worden gebruikt, kunnen deze breken tijdens het centrifugeren.
2. Verwijder supernatant door te decanteren of pipetteren. Voeg 4 ml RNase-vrij water (RNFW) toe aan de pellet en sluit het buisje met behulp van een nieuwe secundaire BD Hemogard-sluiting (meegeleverd met de kit).

Zorg er na het decanteren van supernatant voor dat de pellet niet verstoord wordt en droog de rand van het buisje met een schone papieren doek.
3. Vortex tot de pellet zichtbaar is opgelost en centrifugeer 10 minuten met 3000–5000 x g met behulp van een uitzwaairotor. Verwijder het volledige supernatant en gooi het weg. Kleine celresten die in het supernatant achterblijven na het vortexen maar voor de centrifugatie hebben geen invloed op de procedure.
 -  Als het supernatant niet volledig is verwijderd, belemmert dit de lyse en verdunt dit het lysaat. Dit heeft invloed op de bindingscondities van het RNA op het PAXgene-membraan.
4. Voeg 350 µl resuspensiebuffer (BR1) toe en vortex tot de pellet zichtbaar is opgelost.
5. Pipetteer het monster in een 1,5ml-microcentrifugebuisje (MCT). Voeg 300 µl bindbuffer (BR2) en 40 µl proteïnase K (PK) toe. Vortex gedurende 5 seconden om te mengen en incubeer gedurende 10 minuten bij 55 °C met behulp van een schudincubator met 400–1400 tpm. Stel na de incubatie de temperatuur van de schudincubator in op 65 °C (voor stap 20).
 -  Meng bindbuffer (BR2) en proteïnase K (PK) niet samen alvorens deze aan het monster toe te voegen.

6. Pipetteer het lysaat direct in een PAXgene Shredder-draaikolom (PSC; lila) die is geplaatst in een 2ml-verwerkingsbuisje (PT) en centrifugeer 3 minuten op maximale snelheid (niet hoger dan 20.000 x g).



Pipetteer het lysaat voorzichtig in de draaikolom (PSC) en controleer visueel of het lysaat volledig is overgebracht naar de draaikolom (PSC).

Om schade aan kolommen (PSC) en buisjes (PT) te voorkomen, mag de snelheid niet hoger dan 20.000 x g zijn.



Sommige monsters kunnen door de PAXgene Shredder-draaikolom (PSC) stromen zonder centrifugatie. Dit komt door de lage viscositeit van sommige monsters en mag niet worden opgevat als een indicatie voor het falen van het product.

7. Breng de volledige supernatant van de doorgelopen fractie voorzichtig over naar een nieuwe 1,5ml-microcentrifugebuis (MCT) zonder de pellet in het verwerkingsbuisje te verstoren.
8. Voeg 350 µl ethanol (96–100%, zuiverheidsgraad p.a.) toe. Meng door kort te vortexen en centrifugeren (1–2 seconden met 500–1000 x g) om druppels van de binnenkant van de deksel van het buisje te verwijderen.



De centrifugatieduur mag niet meer dan 1–2 seconden zijn, omdat dit kan zorgen voor een pellet van nucleïnezuren en verminderde opbrengsten van totaal RNA.

9. Pipetteer 700 µl monster in de PAXgene RNA-draaikolom (PRC; rood) die is geplaatst in een 2ml-verwerkingsbuisje (PT) en centrifugeer 1 minuut met 8000–20.000 x g. Plaats de draaikolom (PRC) in een nieuw 2ml-verwerkingsbuisje (PT) en gooi het oude verwerkingsbuisje (PT) met doorgelopen vloeistoffen weg.
10. Pipetteer overgebleven monster in de PAXgene RNA-draaikolom (PRC) en centrifugeer 1 minuut met 8000–20.000 x g. Plaats de draaikolom (PRC) in een nieuw 2ml-verwerkingsbuisje (PT) en gooi het oude verwerkingsbuisje (PT) met doorgelopen vloeistoffen weg.



Pipetteer het monster voorzichtig in de draaikolom (PRC) en controleer visueel of het monster volledig is overgebracht naar de draaikolom (PRC).

11. Pipetteer 350 µl wasbuffer 1 (BR3) in de PAXgene RNA-draaikolom (PRC). Centrifugeer 1 minuut met 8000–20.000 x g. Plaats de draaikolom (PRC) in een nieuw 2ml-verwerkingsbuisje (PT) en gooi het oude verwerkingsbuisje (PT) met doorgelopen vloeistoffen weg.
12. Voeg 10 µl DNase I (RNFD)-voorraadoplossing toe aan 70 µl DNA-digestiebuffer (RDD) in een 1,5ml-microcentrifugebuisje (MCT). Meng door voorzichtig tegen het busje te tikken en centrifugeer kort om achtergebleven vloeistoffen van de zijanten van het busje te verwijderen. Als er, bijvoorbeeld, 10 monsters worden verwerkt, voegt u 100 µl DNase I (RNFD)-voorraadoplossing toe aan 700 µl DNA-digestiebuffer (RDD). Gebruik de 1,5ml-microcentrifugebuisjes (MCT) die met de kit worden geleverd.



DNase I is met name gevoelig voor fysieke denaturatie. Meng alleen door voorzichtig tegen het busje te tikken. Niet vortexen.

13. Pipetteer het DNase I (RNFD)-incubatiemengsel (80 µl) direct op het PAXgene RNA-draaikolom (PRC)-membraan en plaats deze 15 minuten op de tafel (20–30 °C).



Zorg ervoor dat het DNase I (RNFD)-incubatiemengsel direct op het membraan is geplaatst. Incomplete digestie van DNase wordt veroorzaakt als het mengsel aan de wanden of de O-ring van de draaikolom (PRC) is aangebracht en het daar blijft zitten.

14. Pipetteer 350 µl wasbuffer 1 (BR3) in de PAXgene RNA-draaikolom (PRC) en centrifugeer 1 minuut met 8000–20.000 x g. Plaats de draaikolom (PRC) in een nieuw 2ml-verwerkingsbuisje (PT) en gooi het oude verwerkingsbuisje (PT) met doorgelopen vloeistoffen weg.
15. Pipetteer 500 µl wasbuffer 2 (BR4) in de PAXgene RNA-draaikolom (PRC) en centrifugeer 1 minuut met 8000–20.000 x g. Plaats de draaikolom (PRC) in een nieuw 2ml-verwerkingsbuisje (PT) en gooi het oude verwerkingsbuisje (PT) met doorgelopen vloeistoffen weg.



Wasbuffer 2 (BR4) wordt geleverd als concentraat. Zorg ervoor dat ethanol voor gebruik is toegevoegd aan wasbuffer 2 (BR4) (zie 'Wat u moet doen voor u begint', pagina 49).

16. Voeg nogmaals 500 µl wasbuffer 2 (BR4) aan de PAXgene RNA-draaikolom (PRC).
Centrifugeer 3 minuten met 8000–20.000 x g.
17. Gooi het verwerkingsbuisje (PT) met doorgelopen vloeistoffen weg en plaats de PAXgene RNA-draaikolom (PRC) in een nieuw 2ml-verwerkingsbuisje (PT). Centrifugeer 1 minuut met 8000–20.000 x g.
18. Gooi het verwerkingsbuisje (PT) met de doorgelopen vloeistoffen weg. Plaats de PAXgene RNA-draaikolom (PRC) in een 1,5ml-microcentrifugebuisje (MCT) en pipetteer 40 µl elutiebuffer (BR5) direct op de PAXgene RNA-draaikolom (PRC)-membraan. Centrifugeer 1 minuut met 8000–20.000 x g om het RNA te elueren.
- Het is belangrijk om het hele membraan te bevochtigen met elutiebuffer (BR5) om een maximale elutie-efficiëntie te bereiken.
19. Herhaal de elutiestap (stap 18) zoals die wordt beschreven, met behulp van 40 µl elutiebuffer (BR5) en hetzelfde microcentrifugebuisje (MCT).
20. Incubeer het eluaat 5 minuten bij 65 °C in de schudincubator (uit stap 5) zonder te schudden. Koel onmiddellijk met ijs na incubatie.
- Deze incubatie bij 65 °C denatureert het RNA voor vervolgtoeepassingen. Overschrijdt de incubatietijd of -temperatuur niet.
21. Als de RNA-monsters niet onmiddellijk worden gebruikt, slaat u ze op bij –20 °C of –70 °C.
- Omdat het RNA na herhaaldelijk invriezen en ontdooien gedeneureerd blijft, is het niet nodig om de incubatie bij 65 °C te herhalen. Als u de RNA-monsters in een diagnostisch assay gebruikt, volg dan de instructies van de fabrikant.
- Voor de nauwkeurige kwantificatie van RNA door absorptie bij 260 nm, raden wij aan om monsters te verdunnen met 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. * Het verdunnen van het monster in RNase-vrij water kan leiden tot onnauwkeurig lage waarden.

* Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Zet de spectrofotometer op nul met een blanco die bestaat uit dezelfde verhouding met elutiebuffer (BR5) en Tris-HCl-buffer als in de te meten monsters. De elutiebuffer (BR5) heeft een hoge absorptiewaarde bij 220 nm, wat kan leiden tot hoge niveaus van achtergrondabsorptie als de spectrofotometer niet goed is genuld.

Opmerking: Voor kwantificatie in de Tris-HCl-buffer gebruikt u het verband

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Zie bijlage B, pagina 67.

Protocol: Geautomatiseerde zuivering van totaal RNA uit menselijk volbloed afgenomen in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Wat u moet weten voor u begint

- Controleer of de doos intact en onbeschadigd is en dat de buffers niet hebben gelekt. Gebruik geen kit die beschadigd is.
- Zorg er bij gebruik van een pipet voor dat het juiste volume is ingesteld en dat vloeistof zorgvuldig en volledig wordt afgezogen en afgegeven.
- Om te voorkomen dat monsters naar de verkeerde buisjes of kunststof artikelen worden overgebracht, moet u ervoor zorgen dat alle verwerkingsbuisjes (PT), microcentrifugebuisjes (MCT) en rotoradapters op de juiste manier zijn voorzien van een etiket met een permanente pen. Voorzie de deksel en elke fysieke microcentrifugebuis (MCT), elk fysieke verwerkingsbuisje (PT) en de buitenzijde van elke rotoradapter van een etiket.
- Het morsen van monsters en buffers tijdens de procedure kan de opbrengst en de zuiverheid van RNA beïnvloeden.
- Tenzij anders aangegeven, moeten alle centrifugatiestappen worden gedaan bij kamertemperatuur (15–25 °C).

Technieken waarin gebruik wordt gemaakt van nucleïnezuuramplificatie zijn erg gevoelig; de volgende voorzorgsmaatregelen zijn daarom noodzakelijk om kruiscontaminatie tussen monsterbereidingen te voorkomen:

- Pipetteer het monster voorzichtig onderin in het verwerkingsbuisje (PT) zonder de rand van het buisje te bevochtigen.

- Gebruik iedere keer na het overbrengen van vloeistof een nieuwe pipettip. Gebruik pipettips met een aerosolfilter.
- Raak het membraan van de draaikolom (PRC, PSC) niet aan met de pipettip.
- Centrifugeer het monster kort om eventuele druppeltjes aan de onderkant van de deksel te verwijderen, na het vortexen of verhitten van een microcentrifugebuisje (MCT).
- Draag handschoenen tijdens de gehele procedure. Als de handschoenen in aanraking komen met het monster moeten de handschoenen onmiddellijk worden vervangen.

Wat u moet doen voor u begint

- Bloed moet worden verzameld in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) volgens de instructies in de *Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Tube*. Zie indien nodig bijlage C (pagina 69) voor aanbevelingen over de verwerking van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Zorg ervoor dat de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) minimaal 2 uur geïncubeerd zijn op kamertemperatuur na de bloedafname om volledige lyse van bloedcellen te garanderen. Incubatie van de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) gedurende de gehele nacht kan de opbrengst vergroten. Als de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) is opgeslagen bij 2–8 °C, –20 °C of –70 °C na de bloedafname, laat deze dan eerst op kamertemperatuur komen en sla deze daarna 2 uur op bij kamertemperatuur voordat u de procedure start.
- Lees de veiligheidsinformatie op pagina 9.
- Lees 'Belangrijke opmerkingen', pagina 37.
- Lees de richtlijnen voor de verwerking van RNA (bijlage A, pagina 66).
- Lees de *Gebruikershandleiding bij de QIAcube* en aanvullende informatie die bij de QIAcube wordt meegeleverd, schenk hierbij met name aandacht aan de veiligheidsinformatie.
- Zorg ervoor dat instrumenten, zoals pipetten en de QIAcube, regelmatig worden gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

- Er kan in bindbuffer (BR2) tijdens opslag een precipitaat ontstaan. Verwarm, indien nodig, tot 37 °C om deze op te lossen.
- Wasbuffer 2 (BR4) wordt geleverd als concentraat. Voeg 4 volumes ethanol (96–100%, zuiverheidsgraad p.a.) toe volgens de instructies op de fles om een werkoplossing te verkrijgen voordat u het concentraat voor de eerste keer gebruikt.
- Bereid voorraad DNase I-oplossing wanneer u de RNase-Free DNase Set voor het eerst gebruikt. Los de vaste DNase I (RNFD; 1 500 Kunitz-eenheden)* op in 550 µl DNase-resuspensiebuffer (DRB) die wordt meegeleverd met de set. Let op dat er geen DNase I (RNFD) verloren gaat bij het openen van de flacon. Vortex de gereconstitueerde DNase I (RNFD) niet. DNase I is met name gevoelig voor fysieke denaturatie. Meng alleen door het buisje voorzichtig om te keren.
- Huidige gegevens tonen aan dat gereconstitueerd DNase I (RNFD) maximaal 6 weken kan worden opgeslagen bij 2–8 °C. Verwijder voor langetermijnopslag van DNase I (RNFD) de voorraadoplossing uit de glazen flacon, verdeel het in aliquots voor eenmalig gebruik (gebruik de 1,5ml-microcentrifugebuisjes [MCT] die met de kit worden geleverd; er zijn genoeg voor 5 aliquots) en sla ze tot 9 maanden op bij –20 °C. Ontdooide aliquots kunnen tot 6 weken worden opgeslagen bij 2–8 °C. Vries de aliquots niet opnieuw in na het ontdooien.
- Zorg er bij het reconstitueren van DNase I (RNFD) en het uitvullen van aliquots voor dat u de richtlijnen voor de verwerking van RNA volgt (bijlage A, pagina 66).
- Installeer de juiste schudadapter (met de QIAcube meegeleverd; gebruik de adapter voor -Safe-Lock-buis van 2 ml, gemarkeerd met een '2') en plaats het schudrek bovenop de adapter.
- Controleer de afvallade en gooi deze zo nodig leeg.

Installeer de protocollen als dit nog niet is uitgevoerd voor eerdere runs. Installeer de protocollen van zowel 'PAXgene Blood RNA Part A' als 'PAXgene Blood RNA Part B'. Zie 'Protocollen installeren op de QIAcube', pagina 37.

* Kunitz-eenheden worden algemeen gebruikt als eenheden voor het meten van DNase I, gedefinieerd als de hoeveelheid DNase I die een toename veroorzaakt in A_{260} van 0,001 per minuut per milliliter bij 25 °C, pH 5,0, met sterk gepolymeriseerd DNA als het substraat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 en 363).

Procedure

1. Sluit de deur van de QIAcube en schakel de QIAcube in met de aan-uitschakelaar (zie Afbeelding 15, pagina 38).

Er klinkt een piep en het startscherm verschijnt. Het instrument voert automatisch de initialisatietests uit.

2. Open de deur van de QIAcube en laad de benodigde reagentia en kunststof artikelen in de QIAcube. Zie 'De QIAcube laden', pagina 39.

Om tijd te besparen kan het laden worden uitgevoerd tijdens een of beide van de volgende centrifugatiestappen van 10 minuten (stap 3 en 5).

3. Centrifugeer de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 10 minuten met 3000–5000 x g met behulp van een uitzwaairotor.



Zorg ervoor dat het bloedmonster minimaal 2 uur op kamertemperatuur (15–25 °C) is geïncubeerd in de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) om volledige lyse van bloedcellen te bereiken.



De rotor moet de buisadapters voor buisjes met een ronde onderkant bevatten. Als er andere buisjes worden gebruikt, kunnen deze breken tijdens het centrifugeren.

4. Verwijder supernatant door te decanteren of pipetteren. Voeg 4 ml RNase-vrij water (RNFV) toe aan de pellet en sluit het buisje met behulp van een nieuwe secundaire BD Hemogard-sluiting (meegeleverd met de kit).

Zorg er na het decanteren van supernatant voor dat de pellet niet verstoord wordt en droog de rand van het buisje met een schone papieren doek.

5. Vortex tot de pellet zichtbaar is opgelost en centrifugeer 10 minuten met 3000–5000 x g met behulp van een uitzwaairotor. Verwijder het volledige supernatant en gooi het weg.

Kleine celresten die in het supernatant achterblijven na het vortexen maar voor de centrifugatie hebben geen invloed op de procedure.



Als het supernatant niet volledig is verwijderd, belemmert dit de lyse en verdunt dit het lysaat. Dit heeft invloed op de bindingscondities van het RNA op het PAXgene-membraan.

6. Voeg 350 µl resuspensiebuffer (BR1) toe en vortex tot de pellet zichtbaar is opgelost.

7. Pipetteer het monster in een 2ml-verwerkingsbuisje (PT).



Gebruik de 2ml-verwerkingsbuisjes (PT) die met de PAXgene Blood RNA Kit worden geleverd.

8. Laad de open verwerkingsbuisjes (PT) met monster in de QIAcube-schudder (zie Afbeelding 17, pagina 41). De monsterposities zijn genummerd om het laden te vergemakkelijken. Plaats de schudrekplugs (meegeleverd met de QIAcube) in de slots aan de rand van het schudrek naast elke verwerkingsbuis. Dit maakt de detectie van monsters tijdens de ladingscontrole mogelijk.



Zorg ervoor dat de juiste schudadapter (schudadapter, 2 ml, Safe-Lock-buis, gemarkeerd met een '2', meegeleverd met de QIAcube) is geïnstalleerd.



Zorg er bij het laden voor dat het schudrek wordt geladen zoals getoond in Afbeelding 21, pagina 45 wanneer er minder dan 12 monsters worden verwerkt. Eén of 11 monsters kunnen niet worden verwerkt.

9. Sluit de deur van het QIAcube-instrument (zie Afbeelding 15, pagina 38).

10. Selecteer het protocol 'PAXgene Blood RNA Part A' en start het protocol.

Volg de instructies die worden gegeven op het aanraakscherm van de QIAcube.



Zorg ervoor dat beide programmaonderdelen (deel A en deel B) zijn geïnstalleerd op de QIAcube (zie 'Protocollen installeren op de QIAcube', pagina 37).



De QIAcube voert ladingscontroles uit voor monsters, tips, rotoradapters en reagensflessen.

11. Open de deur van het QIAcube-instrument (zie Afbeelding 15, pagina 38) nadat het protocol 'PAXgene Blood RNA Part A' is afgelopen. Verwijder de PAXgene RNA-draaikolommen (PRC) uit de rotoradapters en de lege verwerkingsbuisjes (PT) uit de schudder en gooi ze weg.



Tijdens de run worden draaikolommen overgebracht vanuit rotoradapter positie 1 (dekselpositie L1) naar rotoradapter positie 3 (dekselpositie L2) door het instrument (zie Afbeelding 19, pagina 43).

12. Sluit alle deksels van de 1,5ml-microcentrifugebuisjes (MCT) met het gezuiverde RNA in de rotoradapters (positie 3, dekselpositie L3, zie Afbeelding 19, pagina 43). Breng de 1,5ml-microcentrifugebuisjes (MCT) over naar de QIAcube-schudadapter (zie Afbeelding 17, pagina 41).
13. Sluit de deur van het QIAcube-instrument (zie Afbeelding 15, pagina 38).
14. Selecteer het protocol 'PAXgene Blood RNA Part B' en start het protocol.

Volg de instructies die worden gegeven op het aanraakscherm van de QIAcube.



Dit programma incubeert de monsters bij 65 °C en denatureert het RNA voor vervolgtoeepassingen. Zelfs als de vervolgtoeepassing een denaturatiestap met hitte bevat mag u deze stap niet overslaan. Voldoende RNA-denaturatie is noodzakelijk voor de maximale efficiëntie voor vervolgtoeepassingen.

15. Open de deur van het QIAcube-instrument (zie Afbeelding 15, pagina 38) nadat het programma 'PAXgene Blood RNA Part B' is afgelopen. Plaats de microcentrifugebuisjes (MCT) met gezuiverd RNA onmiddellijk op ijs.



WAARSCHUWING: Heet oppervlak. De schudder kan temperaturen tot 70 °C (158 °F). Raak het apparaat niet aan als het heet is.



Laat geen gezuiverd RNA achter in de QIAcube. Omdat de monsters niet gekoeld worden, kan het gezuiverde RNA worden afgebroken. Daarom worden onbeheerde monsterbereidingsruns gedurende de nacht niet aanbevolen.

16. Als de RNA-monsters niet onmiddellijk worden gebruikt, slaat u ze op bij –20 °C of –70 °C. Omdat het RNA na herhaaldelijk invriezen en ontdooien gedeneatureerd blijft, is het niet nodig om de incubatieprotocol met behulp van hitte ('PAXgene Blood RNA Part B') te herhalen. Als u de RNA-monsters in een diagnostisch assay gebruikt, volg dan de instructies van de fabrikant.

Voor de nauwkeurige kwantificatie van RNA door absorptie bij 260 nm, raden wij aan om monsters te verdunnen met 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. * Het verdunnen van het monster in RNase-vrij water kan leiden tot onnauwkeurig lage waarden.

Zet de spectrofotometer op nul met een blanco die bestaat uit dezelfde verhouding met elutiebuffer (BR5) en Tris-HCl-buffer als in de te meten monsters. De elutiebuffer (BR5) heeft een hoge absorptiewaarde bij 220 nm, wat kan leiden tot hoge niveaus van achtergrondabsorptie als de spectrofotometer niet goed is genuld.



Voor kwantificatie in de Tris-HCl-buffer gebruikt u het verband

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Zie bijlage B, pagina 67.

17. Verwijder het reagentflessenrek van de QIAcube-werktafel (zie Afbeelding 17, pagina 41) en sluit alle flessen met de juiste gelabelde deksels. Buffer in flessen kan minstens 3 maanden bij kamertemperatuur (15–25 °C) worden bewaard. Verwijder de overgebleven reagentia in de verwerkingsbuisjes (PT) in de slots voor de microcentrifugebuisjes van de QIAcube (zie Afbeelding 17, pagina 41) en gooi dit weg. Verwijder de rotoradapters uit de centrifuge en gooi ze weg (zie Afbeelding 17, pagina 41). Leeg de afvallade van de QIAcube (zie Afbeelding 15, pagina 38). Sluit de deur van de QIAcube-instrument en schakel het instrument uit met de aan-uitschakelaar (zie Afbeelding 15, pagina 38).

* Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Probleemoplossingsgids

Deze gids voor probleemoplossing kan helpen bij het oplossen van eventuele problemen. Raadpleeg ook de pagina 'Veelgestelde vragen' in ons centrum voor technische ondersteuning voor meer informatie: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. De wetenschappers bij de technische diensten van QIAGEN beantwoorden altijd graag uw vragen over de informatie en de protocollen in deze handleiding of over monster- en assaytechnologieën (zie de laatste pagina van deze handleiding voor contactgegevens of ga naar www.qiagen.com).

Opmerkingen en suggesties

RNA afgebroken

RNase-contaminatie



Zorg ervoor dat er geen RNasen aan de reagentia wordt toegevoegd tijdens de procedure of latere handelingen (zie bijlage A, pagina 66).

Lage RNA-opbrengst

a) Er is minder dan 2,5 ml bloed afgenomen in PAXgene Blood RNA Tube (BRT).



Zorg ervoor dat er 2,5 ml bloed is afgenomen in de PAXgene Blood RNA Tube (BRT; zie de *Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Tube*).




b) Er is RNA-concentratie gemeten in water.




RNA moet worden verdund met 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* voor de juiste kwantificatie (zie bijlage B, pagina 67).

* Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Opmerkingen en suggesties

- c) Er zijn celresten overgebracht naar de PAXgene RNA-draaikolom (PRC) in stap 9 en 10 van het handmatige protocol.
- d) Het supernatant is niet volledig verwijderd in stap 3.
- e) Na de afname in de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) is het bloed minder dan 2 uur geïncubeerd.
-  Vermijd het overbrengen van grote deeltjes bij het pipetteren van het supernatant in stap 7 van het handmatige protocol (het overbrengen van kleine celresten heeft geen invloed op de procedure).
-  Zorg ervoor dat al het supernatant is verwijderd. Als het supernatant is gedecanteerd, verwijdert u druppels van de rand van de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) door te deppen met een papieren doek. Neem de juiste voorzorgsmaatregelen om kruiscontaminatie te voorkomen.
-  Incubeer het bloed in de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) minimaal 2 uur na afname.

Lage A_{260}/A_{280} -waarde

- a) Er is water gebruikt om RNA te verdunnen voor de A_{260}/A_{280} -meting.
-  Gebruik 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 om RNA te verdunnen voor de zuiverheidsmeting* (zie bijlage B, pagina 67).

* 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.

Opmerkingen en suggesties

- b) De spectrofotometer is niet goed genuld.



Zet de spectrofotometer op nul met een blanco die bestaat uit dezelfde verhouding met elutiebuffer (BR5) en 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, als in de te meten monsters. De elutiebuffer (BR5) heeft een hoge absorptiewaarde bij 220 nm, wat kan leiden tot hoge niveaus van achtergrondabsorptie als de spectrofotometer niet goed is genuld.

Instrumentstoring

De QIAcube wordt niet juist bediend.

Lees de *Gebruikershandleiding bij de QIAcube*, schenk hierbij met name aandacht aan de het hoofdstuk voor probleemoplossing. Zorg ervoor dat de QIAcube juist is onderhouden, zoals wordt beschreven in de *Gebruikershandleiding bij de QIAcube*.

Bijlage A: Algemene opmerkingen over de verwerking van RNA

Verwerking van RNA



Ribonucleasen (RNasen) zijn zeer stabiele en actieve enzymen die doorgaans geen cofactoren nodig hebben om te functioneren. Gebruik geen kunststof of glazen instrumenten zonder verontreiniging met RNasen uit te sluiten. RNasen kunnen namelijk moeilijk worden geïnactiveerd en zelfs een zeer kleine hoeveelheid is voldoende om RNA af te breken. Let er goed op dat er tijdens of na de zuiveringsprocedure geen RNasen onopzettelijk in het RNA-monster terecht komen. Neem voorzorgsmaatregelen tijdens de voorbehandeling en het gebruik van wegwerpbare en niet-wegwerpbare houders en oplossingen wanneer u met RNA werkt, zodat de omgeving RNase-vrij is en blijft.

Algemene maatregelen



Gebruik altijd de juiste microbiologische aseptische techniek wanneer u met RNA werkt. Op de handen en op stofdeeltjes kunnen bacteriën en schimmels aanwezig zijn; dit zijn de meest voorkomende bronnen van contaminatie met RNasen. Draag altijd latex of vinyl handschoenen bij het verwerken van reagentia en RNA-monsters, om contaminatie met RNasen via de huid of stof van laboratoriumapparatuur te voorkomen. Trek regelmatig schone handschoenen aan en houd alle buisjes zo veel mogelijk gesloten. Bewaar gezuiverd RNA op ijs als aliquots gepipetteerd zijn voor vervolgtoeepassingen.

Protocollen om contaminatie met RNase te verwijderen van glazen instrumenten en oplossingen kunnen worden gevonden in algemene richtlijnen voor moleculaire biologie, zoals Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Bijlage B: Kwantificatie en bepaling van de kwaliteit van totaal RNA

Kwantificatie van RNA

De RNA-concentratie moet worden bepaald door de absorptie bij 260 nm te meten (A_{260}) in een spectrofotometer. Om de significantie te waarborgen, moeten de waarden in het lineaire bereik van de spectrofotometer liggen. Een absorptie van 1 eenheid bij 260 nm komt overeen met 44 µg RNA per ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$). Dit verband is alleen geldig voor metingen in 10 mM Tris-HCl, * pH 7,5. Daarom is het noodzakelijk om het RNA-monster te verdunnen; dit moet worden gedaan met 10 mM Tris-HCl. Zoals hieronder wordt besproken (zie 'Zuiverheid van RNA', pagina 68), geeft de verhouding tussen de absorptiewaarden bij 260 en 280 nm een schatting van de RNA-zuiverheid. Zorg ervoor dat cuvettes RNase-vrij zijn bij het meten van RNA-monsters. Zet de spectrofotometer op nul met een blanco die bestaat uit dezelfde verhouding met elutiebuffer (BR5) en Tris-HCl-buffer als in de te meten monsters. De elutiebuffer (BR5) heeft een hoge absorptiewaarde bij 220 nm, wat kan leiden tot hoge niveaus van achtergrondabsorptie als de spectrofotometer niet goed is genuld. Een voorbeeld van een berekening van RNA-kwantificatie wordt hieronder getoond.

Volume van RNA-monster	=	80 µl
Verdunning (1/15)	=	10 µl RNA-monster + 140 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Meet de absorptie van het verdunde monster in een cuvette (RNase-vrij).		
A_{260}	=	0,3
Concentratie van het monster	=	$44 \times A_{260} \times \text{verdunningsfactor}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 µg/ml
Totale opbrengst	=	concentratie x volume van het monster in milliliters
	=	$198 \text{ µg/ml} \times 0,08 \text{ ml}$
	=	15,8 µg RNA

* Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Zuiverheid van RNA

De verhouding van de waarden bij 260 nm en 280 nm (A_{260}/A_{280}) geeft een schatting van de zuiverheid van RNA met betrekking tot verontreinigingen die in het UV absorberen, zoals proteïne. De verhouding A_{260}/A_{280} wordt echter aanzienlijk beïnvloed door pH. Een lagere pH-waarde resulteert in een lagere A_{260}/A_{280} -verhouding en verminderde gevoeligheid voor proteïnecontaminatie.* Voor nauwkeurige waarden raden wij aan om de absorptie te meten in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Zuiver RNA heeft een A_{260}/A_{280} -verhouding van 1,8–2,2 in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Zet de spectrofotometer op nul met een blanco die bestaat uit dezelfde verhouding met elutiebuffer (BR5) en Tris-HCl-buffer als in de te meten monsters. De elutiebuffer (BR5) heeft een hoge absorptiewaarde bij 220 nm, wat kan leiden tot hoge niveaus van achtergrondabsorptie als de spectrofotometer niet goed is genuld.

* 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.

Bijlage C: Verwerking van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



De volgende aanbevelingen van BD kunnen helpen bij de verwerking van PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Raadpleeg de *Handleiding bij de PAXgene Blood RNA Tube* voor meer informatie over de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Instructies voor het verwijderen van de BD Hemogard-sluiting

1. Pak de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) met één hand vast en plaats uw duim onder de BD Hemogard-sluiting. (Plaats uw arm op een stevige ondergrond voor meer stabiliteit.) Draai met uw andere hand de BD Hemogard-sluiting terwijl u tegelijkertijd met uw duim van de andere hand omhoog drukt, ENKEL TOTDAT DE BUISSTOP LOS IS.
2. Haal uw duim weg voordat u de sluiting optilt. Gebruik uw duim NIET om de sluiting van de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) af te drukken. Let op: er bestaat een gevaar voor blootstelling als de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) bloed bevat. Om letsel bij het verwijderen van de sluiting te helpen voorkomen, is het belangrijk dat de duim die wordt gebruikt om de dop naar boven te duwen, geen contact meer maakt met de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) zodra de BD Hemogard-sluiting los is gemaakt.
3. Til de sluiting van de PAXgene Blood RNA Tube (BRT). In het onwaarschijnlijke geval dat de plastic afscherming zich scheidt van de rubberen stop, DE SLUITING NIET OPNIEUW IN ELKAAR ZETTEN. Verwijder de rubberen stop voorzichtig van de PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Instructies voor het plaatsen van de secundaire BD Hemogard-sluiting

1. Plaats de sluiting op de PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Draai en duw de stop stevig naar beneden totdat deze volledig is bevestigd. Het opnieuw plaatsen van de stop is noodzakelijk om ervoor te zorgen dat de sluiting stevig op de PAXgene Blood RNA Tube (BRT) blijft zitten tijdens de verwerking.

Bestelgegevens

Product	Inhoud	Cat.nr.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene-draaikolommen, 50 Shredder-draaikolommen, verwerkingsbuisjes, RNase-vrij DNase I, RNase-vrije reagentia en buffers. Voor gebruik in combinatie met de PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 bloedafnamebuizen	762165
Verwante producten die kunnen worden besteld bij QIAGEN		
Starter Pack, QIAcube	Verpakking bevat: reagensflessenrekken (3); strips met reketiketten (8); 200µl-filtertips (1024); 1000µl-filtertips (1024); 1000µl- filtertips, wijde opening (1024); 30ml- reagensflessen (18); rotoradapters (240); rotoradapterhouder	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Steriele, wegwerpfiltertips, in een rek	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Reagensflessen (30 ml) met deksels; 6 in verpakking; voor gebruik met het QIAcube-reagensflessenrek	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	Voor 240 bereidingen: 240 wegwerprotoradapters; voor gebruik met de QIAcube	990394

Reagent Bottle Rack	Rek geschikt voor 6 x 30ml-reagensflessen op de QIAcube-werktafel	990390
Rotor Adapter Holder	Houder voor 12 wegwerprotoradapters; voor gebruik met de QIAcube	990392
Verwante producten die kunnen worden besteld bij BD		
Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 21G, 0,75 inch (0.8 x 19 mm) naald, 12 inch (305 mm) slang met luer-adapter; 50 per box, 200 per kist	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Kist alleen voor een diameter van 13 mm en 16 mm; 1000/kist	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm 4,0 ml afname met rood BD Hemogard-sluiting en papieren etiket; 100/doos, 1000/kist	368975

* Deze accessoires voor bloedafname zijn typische producten die kunnen worden gebruikt met de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Om meer te weten over deze accessoires en over hoe u ze kunt bestellen, gaat u naar www.preanalytix.com.

Zie de (gebruikers)handleiding van de betreffende PreAnalytiX- en QIAGEN-kit voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules. De (gebruikers)handleidingen van PreAnalytiX- en QIAGEN Kits zijn verkrijgbaar via www.preanalytix.com en www.qiagen.com of kunnen bij de afdeling Technische Services van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur worden aangevraagd.

Revisiegeschiedenis van handleiding

Document en herziening	Wijzigingen	Datum
HB-0101-004, R2	Wijzigingen in het hele document om te voldoen aan de GHS-voorschriften	Juni 2015
HB-0101-005, R3	Nieuw sjabloon; herzieningen van geautomatiseerde protocol- en prestatiegegevens; update van veiligheidsinformatie om te voldoen aan de GHS-voorschriften; wijzigingen in instrumentdetails en in de verklaring over de beperkingen van het gebruik van het product.	Februari 2019
HB-0101-006, R3	Correctie in naam van de kit in de tabel Inhoud van de kit op pag. 5.	Januari 2020

PreAnalytiX Worldwide

Producten van PreAnalytiX worden gedistribueerd door bedrijven van QIAGEN en 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

