

Styczeń 2020 r.

# PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA Kit — Instrukcja obsługi

Wersja 2



50 (nr katalogowy 762174)

R3 **MAT** 1120409PL

**REF** 762174



PreAnalytiX GmbH  
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon  
Wyprodukowano przez firmę QIAGEN GmbH dla firmy PreAnalytiX

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

Zestawy PAXgene Blood RNA Kit nie są dostępne we wszystkich krajach; prosimy o przesłanie zapytania.

#### Umowa ograniczonej licencji

Użytkowanie tego produktu oznacza wyrażenie zgody nabywcy lub użytkownika zestawu PAXgene Blood RNA Kit na następujące warunki:

1. Zestawu PAXgene Blood RNA Kit można używać wyłącznie zgodnie z dokumentem *PAXgene Blood RNA Kit — Instrukcja obsługi (PAXgene Blood RNA Kit Handbook)* i tylko razem ze składnikami zawartymi w zestawie. Firma PreAnalytiX nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania lub łączenia składników tego zestawu ze składnikami nienależącymi do tego zestawu, z wyjątkiem przypadków opisanych w dokumencie *PAXgene Blood RNA Kit — Instrukcja obsługi* oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).
2. Za wyjątkiem wyraźnie określonych licencji, firma PreAnalytiX nie udziela gwarancji, że ten zestaw i/lub jego użytkowanie nie narusza praw stron trzecich.
3. Zestaw oraz jego składniki są przeznaczone do jednorazowego użytku, nie można ich ponownie używać, regenerować ani odsprzedawać.
4. Firma PreAnalytiX nie udziela innych licencji, wyrażonych lub dorozumianych, poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik zestawu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej.
6. Firma PreAnalytiX może wyegzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu i ma prawo zażądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencji są dostępne na stronie [www.PreAnalytiX.com](http://www.PreAnalytiX.com).

#### Sprzedaż warunkowa

Obecny produkt jest objęty licencją na podstawie określonych zastrzeżeń o numerach US-7,270,953 i US-7,682,790, jak również EP-1820793 B1 oraz zagranicznych odpowiedników tych zastrzeżeń patentowych obejmujących stosowanie tego produktu w celu przetwarzania kompleksu kwasów nukleinowych utworzonego podczas pobierania próbki do próbówki PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-006 BD-8945 1120409 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, wszelkie prawa zastrzeżone.

PreAnalytiX Company

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Szwajcaria

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

#### Dystrybutorzy firmy PreAnalytiX

Produkty firmy PreAnalytiX są produkowane i dystrybuowane dla firmy PreAnalytiX przez firmę QIAGEN lub firmę BD. Produktów nie można zamówić w firmie PreAnalytiX GmbH.

Informacje kontaktowe do lokalnego dystrybutora firmy PreAnalytiX znajdują się na ostatniej stronie.

# Spis treści

Zawartość zestawu .....	5
Symbole .....	7
Warunki przechowywania .....	8
Przeznaczenie .....	9
Ograniczenia w zakresie stosowania produktu .....	9
Kontrola jakości .....	10
Pomoc techniczna .....	10
Informacje dotyczące bezpieczeństwa .....	10
Wstęp .....	14
Zasada działania i procedura .....	14
Pobieranie i stabilizacja próbek .....	15
Zatężanie i oczyszczanie RNA .....	20
Ręczne oczyszczanie RNA .....	20
Zautomatyzowane oczyszczanie RNA .....	30
Sprzęt i odczynniki zapewniane przez użytkownika .....	36
Ważne informacje .....	38
Obsługa aparatu QIAcube .....	38
Uruchamianie aparatu QIAcube .....	38
Instalowanie protokołów w aparacie QIAcube .....	38
Ładowanie aparatu QIAcube .....	40
Protokół: ręczne oczyszczanie całkowitego RNA z ludzkiej krwi pełnej pobranej do próbówek PAXgene Blood RNA Tube (BRT) .....	49

Protokół: zautomatyzowane oczyszczanie całkowitego RNA z ludzkiej krwi pełnej pobranej do probówek PAXgene Blood RNA Tube (BRT).....	57
Rozwiązywanie problemów .....	65
Załącznik A: Ogólne uwagi dotyczące postępowania z RNA.....	68
Załącznik B: Oznaczenie ilościowe i określenie jakości całkowitego RNA .....	69
Załącznik C: Postępowanie z probówkami PAXgene Blood RNA Tube (BRT).....	71
Informacje dotyczące zamawiania.....	73
Historia zmian w instrukcji .....	75


# Zawartość zestawu

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Nr katalogowy			762174
Liczba przygotowań			50
BR1	Resuspension Buffer (Bufor do przygotowywania zawiesiny)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Bufor do wiązania)*	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (Bufor płuczący 1)*	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) (Bufor płuczący 2 (koncentrat))†	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Bufor do elucji)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-free Water (bottle) (Woda wolna od RNaz (butelka))	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid) (Proteinaza K (zielone wieczko))	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (Kolumny wirówkowe PAXgene RNA (czerwone))	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (Probówki do przetwarzania) (2 ml)	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures (Dodatkowe zamknięcia Hemogard™ firmy BD)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (Probówki mikrowirówkowe) (1,5 ml)	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNaza I, wolna od RNaz (liofilizowana))	DNA REM	1500 jednostek Kunitza‡

\*Produkt nie jest zgodny z odczynnikami dezynfekującymi, które zawierają wybielacz. Zawiera sól guanidyny. Informacje dotyczące bezpieczeństwa znajdują się na stronie 10.

† Bufor płuczący 2 (BR4) jest dostarczany w postaci koncentratu. Przed pierwszym użyciem dodać 4 objętości etanolu (96–100-procentowego, stopień czystości cz.d.a.), zgodnie z instrukcją na butelce, aby uzyskać roztwór roboczy.

‡ Jednostki Kunitza to jednostki powszechnie stosowane do pomiaru DNazy I, definiowane jako ilość DNazy I, która powoduje wzrost wartości absorbancji  $A_{260}$  o 0,001 na minutę na mililitr w temperaturze 25°C, pH 5,0, przy stosowaniu wysoko spolimeryzowanego DNA jako substratu (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 i 363).

<b>PAXgene Blood RNA Kit</b>			<b>(50)</b>
<b>Nr katalogowy</b>			<b>762174</b>
<b>Liczba przygotowań</b>			<b>50</b>
RDD	DNA Digestion Buffer (Bufor do trawienia DNA) (białe wieczko)	<b>DNA</b> <b>DIG</b> <b>BUF</b>	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (Bufor do przygotowywania zawiesiny DNazy (probówka, liliowe wieczko))	<b>DNase</b> <b>RES</b> <b>BUF</b>	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (Kolumny wirówkowe PAXgene Shredder (liliowe))	<b>PAXgene</b> <b>SHRED</b> <b>COL</b>	5 × 10
Instrukcja obsługi	PAXgene Blood RNA Kit — Instrukcja obsługi (wersja 2)		1

# Symbole



Zawiera odczynniki wystarczające do wykonania <N> testów



Zapoznać się z instrukcją użycia



Data ważności



Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro



Numer katalogowy



Numer serii



Numer materiału



Składniki



Numer



Metoda sterylizacji — sterylizacja promieniowaniem



Jednostki Kunitza



Dodawanie



Zawiera














Zrekonstruowany



Deoksyrybonukleaza I



Etanol

	Izotiocyjanian guanidyny
	RNase-Free DNase Set
	Globalny numer jednostki handlowej
	Nie używać ponownie
	Zakres temperatury
	Górny limit temperatury
	Producent
	Ważna informacja
	Po dodaniu etanolu do butelki zapisać aktualną datę
	Po otrzymaniu
	Prowadzi do

## Warunki przechowywania

Kolumny wirówkowe PAXgene RNA (PRC), kolumny wirówkowe PAXgene Shredder (PSC), proteinazę K (PK) i bufor (BR1, BR2, BR3, BR4 i BR5) można przechowywać w suchym miejscu w temperaturze określonej na etykiecie zestawu.

Zestaw RNase-Free DNase Set, który zawiera DNazę I (RNFD), bufor do trawienia DNA (RDD) i bufor do przygotowania zawiesiny DNazy (DRB), jest transportowany w temperaturze otoczenia. Niezwłocznie po otrzymaniu zestawu DNazy wolnej od RNazy należy go umieścić w temperaturze określonej na etykiecie. Zestaw zachowuje stabilność



do daty ważności określonej na opakowaniu zestawu, jeśli jest przechowywany w odpowiednich warunkach.

## Przeznaczenie

Zestaw PAXgene Blood RNA Kit jest przeznaczony do oczyszczania RNA wewnątrzkomórkowego z krwi pełnej pobranej do probówki PAXgene Blood RNA Tube (BRT). W przypadku używania tego zestawu w połączeniu z probówkami PAXgene Blood RNA Tube (BRT) system umożliwia uzyskanie oczyszczonego RNA wewnątrzkomórkowego z krwi pełnej odpowiedniego do reakcji RT-PCR wykonywanej w molekularnych testach diagnostycznych. Informacje na temat użycia probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zawiera dokument PAXgene Blood RNA Tube — Instrukcja obsługi (*PAXgene Blood RNA Tube Handbook*).

**Parametry skuteczności dla systemu PAXgene Blood RNA System ustalono wyłącznie za pomocą transkryptów genów FOS i IL1B. Użytkownik jest odpowiedzialny za ustalenie odpowiednich parametrów skuteczności systemu PAXgene Blood RNA System dla innych transkryptów docelowych.**

## Ograniczenia w zakresie stosowania produktu

Zestaw PAXgene Blood RNA Kit jest przeznaczony do oczyszczania RNA wewnątrzkomórkowego z ludzkiej krwi pełnej ( $4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$  leukocytów/ml) do zastosowań diagnostyki in vitro. Nie jest on przeznaczony do oczyszczania DNA genomowego lub wirusowych kwasów nukleinowych z ludzkiej krwi pełnej. Ze względu na ograniczoną liczbę transkryptów zwalidowanych pod kątem specyfikacji stabilizacji (transkrypty genów FOS i IL1B) nie określono parametrów skuteczności dla wszystkich transkryptów. W celu określenia, czy konieczne jest przeprowadzenie walidacji dla innych transkryptów, personel laboratorium powinien dokonać przeglądu danych producenta oraz własnych danych.

Produkt jest przeznaczony do stosowania przez profesjonalnych użytkowników, takich jak technicy i lekarze przeszkoleni w zakresie procedur diagnostyki in vitro.

## Kontrola jakości

Zgodnie z poświadczonym certyfikatem ISO systemem zarządzania jakością firmy QIAGEN każda seria zestawu PAXgene Blood RNA Kit jest testowana pod kątem wstępnie ustalonych specyfikacji w celu zapewnienia spójnej jakości produktu.

## Pomoc techniczna

W firmie QIAGEN szczerzymy się jakością i dostępnością naszej pomocy technicznej. W naszych działach pomocy technicznej pracują doświadczeni naukowcy mający rozległą wiedzę praktyczną i teoretyczną w dziedzinie biologii molekularnej oraz stosowania produktów firmy PreAnalytiX. W razie jakichkolwiek pytań dotyczących zestawu PAXgene Blood RNA Kit prosimy o kontakt.

W celu uzyskania pomocy technicznej oraz dalszych informacji prosimy o kontakt telefoniczny z działem serwisu technicznego firmy QIAGEN.

## Informacje dotyczące bezpieczeństwa

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych.

Podczas pracy z materiałami chemicznymi należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, jednorazowe rękawiczki i okulary ochronne, aby uniknąć ryzyka zakażenia (np. wirusem HIV lub wirusem zapalenia wątroby typu B). W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (safety data sheet, SDS). Są one dostępne online w wygodnym, kompaktowym formacie PDF na stronie

**www.preanalytix.com**, na której można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla tego zestawu.

**PRZESTROG**



NIE dolewać wybielacza lub roztworów kwasowych bezpośrednio do odpadów powstałych po przygotowaniu próbek.

Bufor do wiązania (BR2) i bufor płuczący 1 (BR3) zawierają chlorowodorek guanidyny, który może tworzyć wysoce reaktywne związki w połączeniu z wybielaczem. W przypadku rozlania buforu do wiązania (BR2) lub buforu płuczącego 1 (BR3) należy usunąć go za pomocą odpowiedniego detergentu laboratoryjnego i wody. W przypadku rozlania płynu zawierającego czynniki potencjalnie zakaźne należy wyczyścić zalany obszar najpierw detergentem laboratoryjnym i wodą, a następnie 1-procentowym (stężenie objętościowe) podchlorynem sodu.

Mieszaninę roztworu do stabilizacji RNA i krwi z probówki PAXgene Blood RNA Tube (BRT) można zdezynfekować, używając 1 objętości dostępnego w handlu roztworu wybielacza (5-procentowy podchloryn sodu) na 9 objętości mieszaniny roztworu do stabilizacji RNA i krwi.

Odpady powstałe po przygotowaniu próbek, takie jak supernatanty z etapów wirowania wykonywanych w procedurze oczyszczania RNA, należy uznawać za materiały potencjalnie zakaźne. Przed utylizacją odpadów należy wysterylizować je w autoklawie lub spalić, aby zniszczyć wszelkie materiały zakaźne. Utylizację należy przeprowadzać zgodnie z obowiązującymi przepisami.

Do składników zestawu PAXgene Blood RNA Kit mają zastosowanie następujące zwroty wskazujące na zagrożenia i określające środki ostrożności. Informacje dotyczące bezpieczeństwa probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zawiera dokument *PAXgene Blood RNA Tube — Instrukcja obsługi*.

### Bufor BR2



Zawiera: tiocyjanian guanidyny. Niebezpieczeństwo! Działa szkodliwie po połyknięciu. Może działać szkodliwie w kontakcie ze skórą lub w przypadku wdychania. Powoduje poważne uszkodzenie oczu. Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub lekarzem.

### Bufor BR3



Zawiera: etanol; tiocyjanian guanidyny. Niebezpieczeństwo! Łatwopalna ciecz i opary. Powoduje poważne uszkodzenie oczu. W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy. Trzymać z dala od źródeł ciepła/iskier/otwartego ognia/gorących powierzchni. Nie palić papierosów. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub lekarzem.

### DNaza I



Zawiera: DNazę. Niebezpieczeństwo! Może powodować reakcję alergiczną skóry. Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania. Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgiełki/par/rozpylonej cieczy. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. Stosować indywidualne środki ochrony dróg oddechowych. W przypadku narażenia lub problemów: skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub z lekarzem. Wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić warunki do odpoczynku w pozycji umożliwiającej swobodne oddychanie.

### Proteinaza K



Zawiera: proteinazę K. Niebezpieczeństwo! Powoduje łagodne podrażnienie skóry. Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania. Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgiełki/par/rozpylonej cieczy. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. Stosować indywidualne środki ochrony dróg oddechowych. W przypadku narażenia lub problemów: skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub z lekarzem. Wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić warunki do odpoczynku w pozycji umożliwiającej swobodne oddychanie.

# Wstęp

Pobranie krwi pełnej to pierwszy etap wielu oznaczeń molekularnych wykonywanych w celu badania RNA komórkowego. Jednakże poważnym problemem występującym w takich eksperymentach jest niestabilność profilu RNA komórkowego w warunkach *in vitro*. W badaniach przeprowadzonych w firmie PreAnalytiX wykazano, że liczba kopii poszczególnych rodzajów mRNA w krwi pełnej może zmienić się ponad 1000-krotnie podczas przechowywania lub transportowania próbki w temperaturze pokojowej.\* Jest to spowodowane szybkim rozkładem RNA oraz indukowaną ekspresją określonych genów po pobraniu krwi. Takie zmiany profilu ekspresji RNA uniemożliwiają prowadzenie wiarygodnych badań ekspresji genów. Z tego względu w celu dokładnej analizy ekspresji genów w ludzkiej krwi pełnej kluczowe jest zastosowanie metody, która umożliwia zachowanie profilu ekspresji RNA podczas i po pobraniu krwi.

## Zasada działania i procedura

Firma PreAnalytiX opracowała nowy system, który umożliwia pobranie, stabilizację, przechowywanie i transport próbek ludzkiej krwi pełnej, wraz z szybkim i wydajnym protokołem oczyszczania RNA wewnątrzkomórkowego. System wymaga użycia probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; patenty w Stanach Zjednoczonych o numerach 6,602,718 i 6,617,170) do pobierania krwi i stabilizacji RNA, a następnie ręcznego lub zautomatyzowanego oczyszczenia RNA za pomocą zestawu PAXgene Blood RNA Kit. Protokół ręczny i protokół zautomatyzowany zapewniają zasadniczo równoważną skuteczność pod względem jakości i uzysku RNA. W niniejszej instrukcji obsługi zawarto dane skuteczności dla protokołu ręcznego (strony 23–30) i protokołu zautomatyzowanego (strony 33–35).

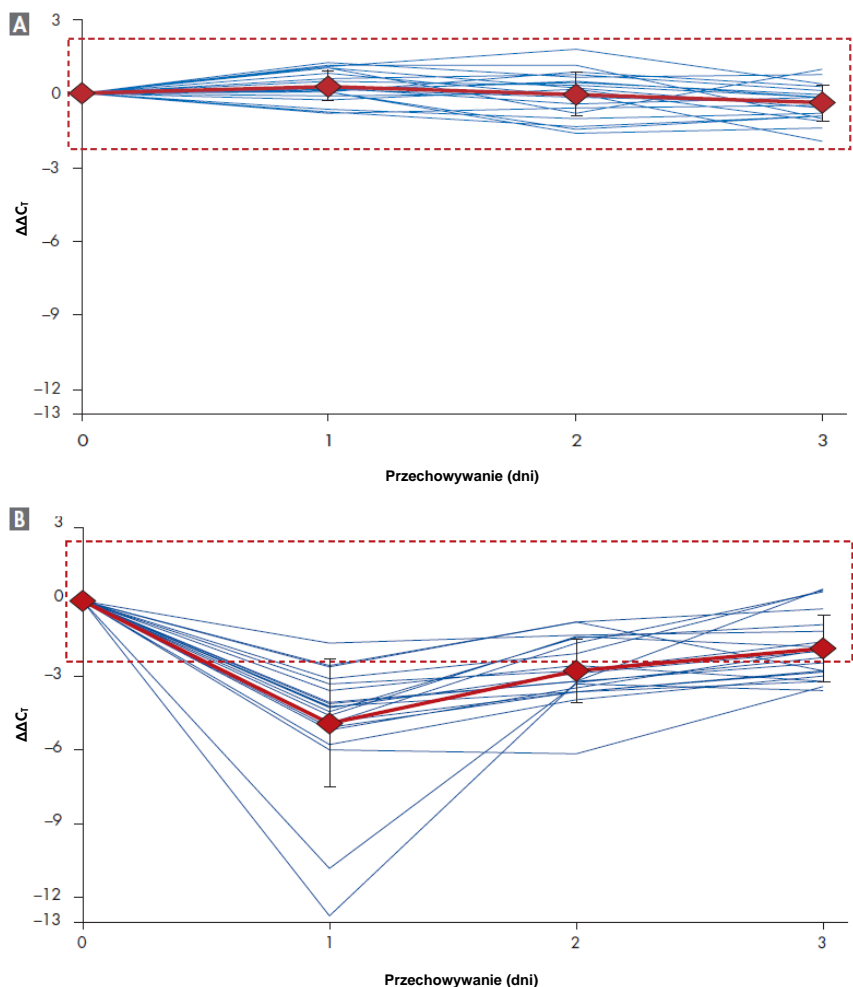
\* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

## Pobieranie i stabilizacja próbek

Probówki PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zawierają zastrzeżoną mieszaninę odczynników opracowaną na podstawie opatentowanej technologii stabilizacji RNA. Ta mieszanina odczynników chroni cząsteczki RNA przed rozkładem przez RNazy i minimalizuje zmiany w ekspresji genów zachodzące pozaustrojowo. Probówki PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) są przeznaczone do pobierania ludzkiej krwi pełnej i stabilizacji RNA komórkowego przez maksymalnie 3 dni w temperaturze 18–25°C (Ryc. 1 i 2, strony 16 i 17) lub przez maksymalnie 5 dni w temperaturze 2–8°C (Ryc. 3 i 4, strony 18 i 19). Aktualnie dostępne dane wskazują, że możliwa jest stabilizacja RNA przez co najmniej 11 lat w temperaturze –20°C lub –70°C\*. Aby uzyskać więcej danych z trwających badań dotyczących oceny stabilności próbek w dłuższej perspektywie czasowej, należy skontaktować się z działem serwisu technicznego firmy QIAGEN.

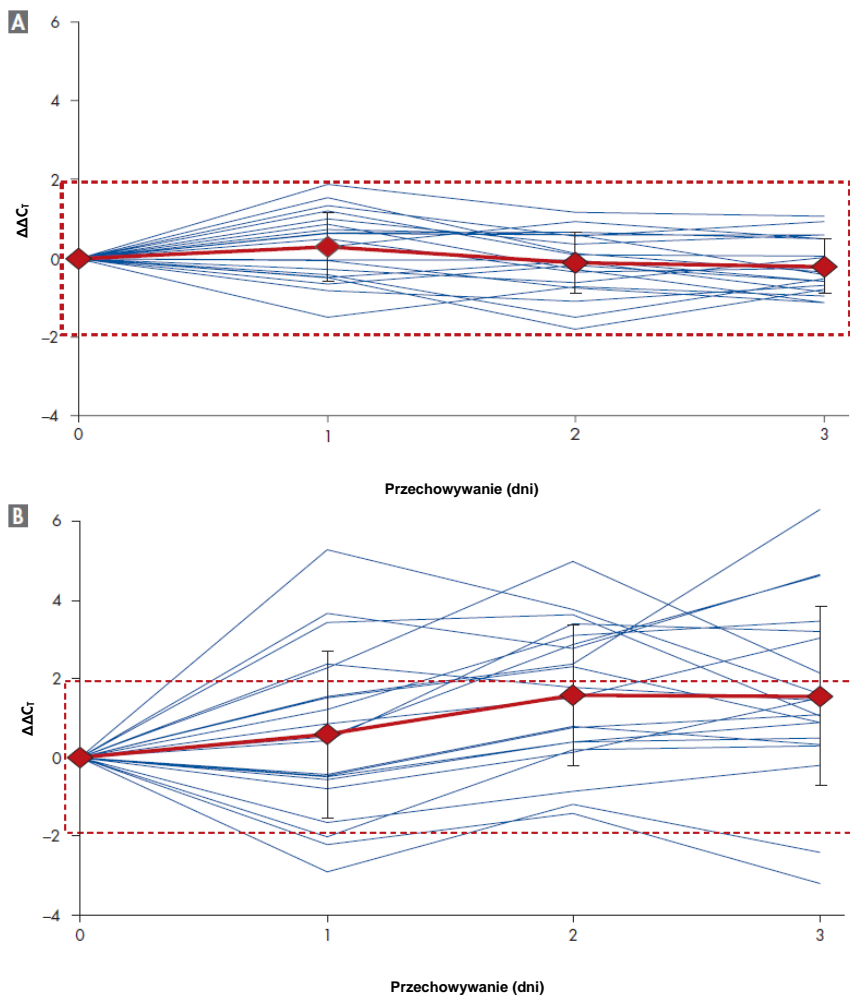
Rzeczywisty okres stabilizacji RNA może różnić się w zależności od rodzaju RNA komórkowego i jego dalszego zastosowania. Ze względu na ograniczoną liczbę transkryptów zwalidowanych pod kątem specyfikacji stabilizacji (transkrypty genów FOS i IL1B) nie określono parametrów skuteczności dla wszystkich transkryptów. W celu określenia, czy konieczne jest przeprowadzenie walidacji dla innych transkryptów, personel laboratorium powinien dokonać przeglądu danych producenta oraz własnych danych.

\* Obecnie trwa długoterminowe badanie przechowywania krwi w probówkach PAXgene Blood RNA Tubes.

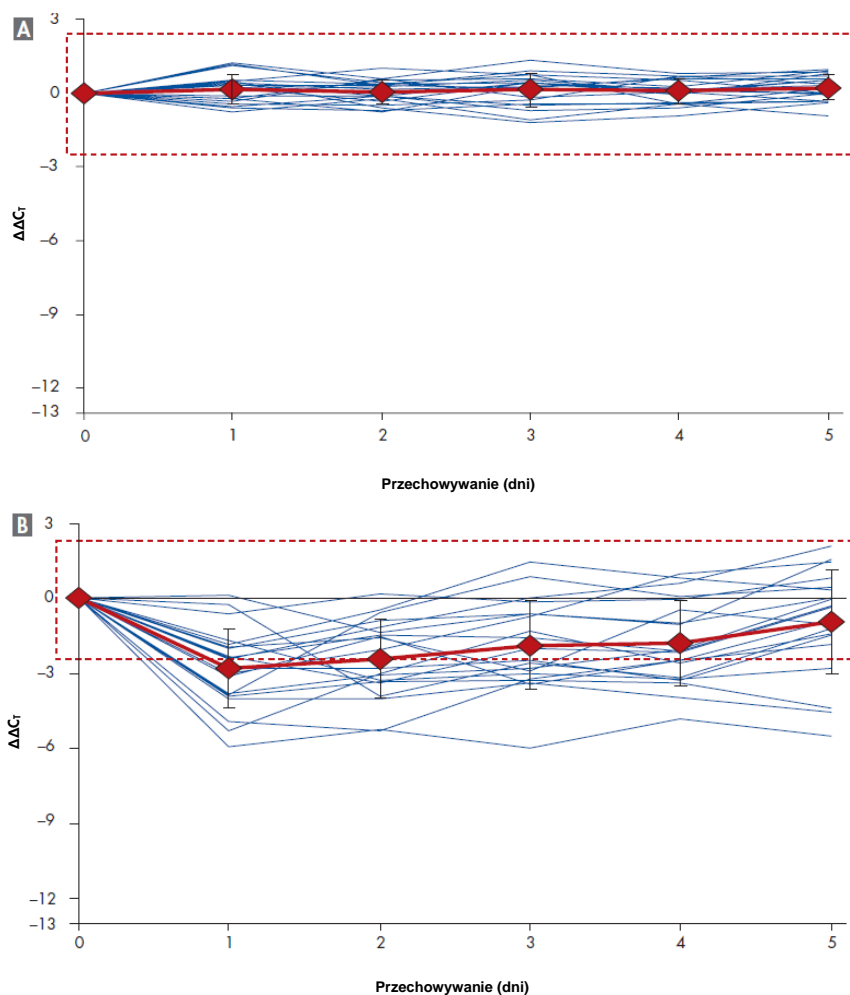


**Ryc. 1. Stalność RNA w próbkach krwi w temperaturze 18–25°C: FOS.** Pobrano krew od 10 dawców i otrzymane próbki przechowywano (w dwóch powtórzeniach) w temperaturze 18–25°C przez wskazaną liczbę dni, po której wykonywano oczyszczenie całkowitego RNA. **[A]** Krew pobrano i przechowywano w próbkach PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), a następnie oczyszczono całkowite RNA za pomocą zestawu PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Krew pobrano i przechowywano w standardowych próbkach do pobierania krwi z EDTA jako antykoagulantem, a następnie oczyszczono całkowite RNA, stosując standardową metodę ekstrakcji związków organicznych z oczyszczeniem RNA na membranie krzemionkowej. Względne poziomy transkryptów FOS określono, przeprowadzając reakcję dupleks RT-PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu 18S rRNA jako wzorca wewnętrznego. Wartości dla wszystkich próbek naniesiono na wykres wraz ze średnimi i odchyleniami standardowymi wszystkich próbek. Linie przerywane wskazują  $\pm 3x$  całkowitą precyzję oznaczenia (2,34  $C_t$ ).

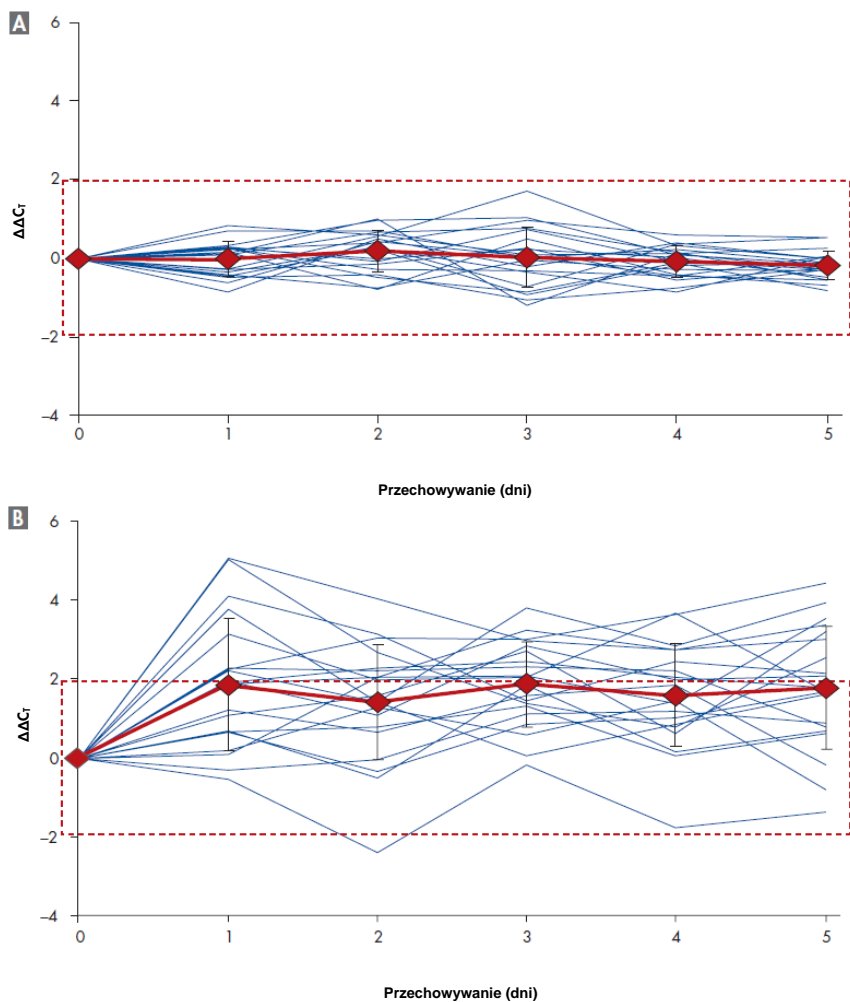




**Ryc. 2. Stabilność RNA w próbkach krwi w temperaturze 18–25°C: IL1B.** Pobrano krew i oczyszczono całkowite RNA po przechowywaniu próbek w temperaturze 18–25°C, co opisano na Ryc. 1. Względne poziomy transkryptów IL1B określono, przeprowadzając reakcję dupleks RT-PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu 18S rRNA jako wzorca wewnętrznego. Wartości dla wszystkich próbek naniesiono na wykres wraz ze średnimi i odchyleniami standardowymi wszystkich próbek. Linie przerywane wskazują  $\pm 3x$  całkowitą precyzję oznaczenia ( $1,93 C_T$ ).



**Ryc. 3. Stabilność RNA w próbkach krwi w temperaturze 2–8°C: FOS.** Pobrano krew od 10 dawców i otrzymane próbki przechowywano (w dwóch powtórzeniach) w temperaturze 2–8°C przez wskazaną liczbę dni, po której wykonywano oczyszczenie całkowitego RNA. **[A]** Krew pobrano i przechowywano w probówkach PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), a następnie oczyszczono całkowite RNA za pomocą zestawu PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Krew pobrano i przechowywano w standardowych probówkach do pobierania krwi z EDTA jako antykoagulantem, a następnie oczyszczono całkowite RNA, stosując standardową metodę ekstrakcji związków organicznych z oczyszczeniem RNA na membranie krzemionkowej. Względne poziomy transkryptów FOS określono, przeprowadzając reakcję dupleks RT-PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu 18S rRNA jako wzorca wewnętrznego. Wartości dla wszystkich próbek naniesiono na wykres wraz ze średnimi i odchyleniami standardowymi wszystkich próbek. Linie przerywane wskazują  $\pm 3x$  całkowitą precyzję oznaczenia (2,34  $C_t$ ).



**Ryc. 4. Stabilność RNA w próbkach krwi w temperaturze 2–8°C: IL1B.** Pobrano krew i oczyszczono całkowite RNA po przechowywaniu próbek w temperaturze 2–8°C, co opisano na Ryc. 3. Względne poziomy transkryptów IL1B określono, przeprowadzając reakcję dupleks RT-PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu 18S rRNA jako wzorca wewnętrznego. Wartości dla wszystkich próbek naniesiono na wykres wraz ze średnimi i odchyleniami standardowymi wszystkich próbek. Linie przerywane wskazują  $\pm 3x$  całkowitą precyzję oznaczenia ( $1,93 C_T$ ).

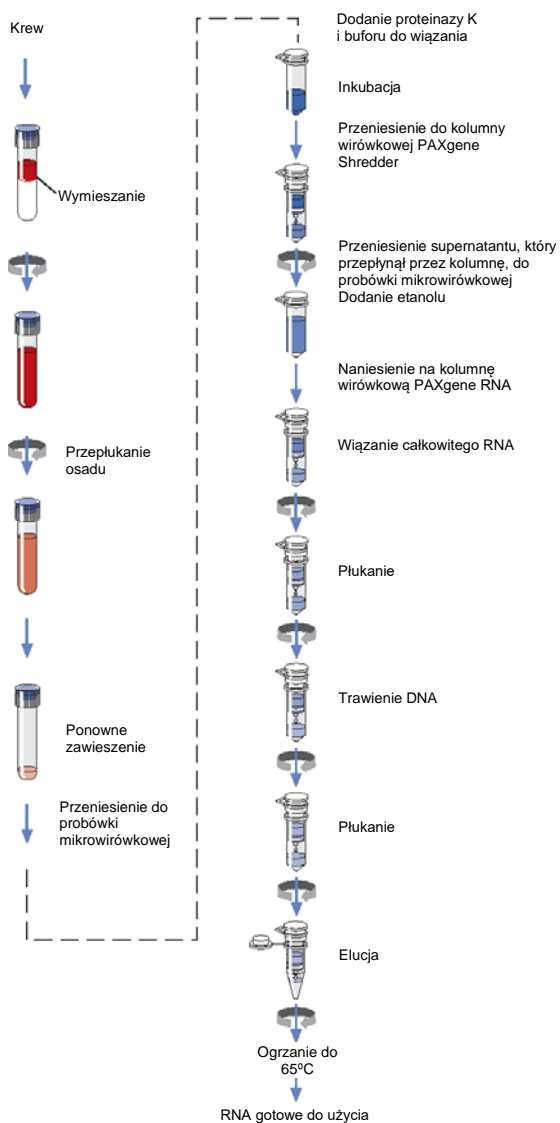
## Zatężanie i oczyszczanie RNA

Zestaw PAXgene Blood RNA Kit jest przeznaczony do oczyszczania całkowitego RNA z 2,5 ml ludzkiej krwi pełnej pobranej do probówek PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Procedura ta jest prosta i może być wykonywana w sposób ręczny lub zautomatyzowany (patrz Ryc. 5 i 10, strony 21 i 31). W obu protokołach oczyszczanie rozpoczyna się od etapu wirowania wykonywanego w celu osadzenia kwasów nukleinowych w probówce PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Osad jest przepłukiwany i zawieszany ponownie, a następnie wykonywane jest ręczne lub zautomatyzowane oczyszczenie RNA. Co do zasady, oba protokoły obejmują te same etapy protokołu, w których stosowane są te same składniki zestawu.

### Ręczne oczyszczanie RNA

W ujęciu szczegółowym, zawieszony osad jest inkubowany w zoptymalizowanych buforach z proteinazą K (PK) w celu wytrawienia białek. W celu zhomogenizowania lizatu komórkowego i usunięcia pozostałości komórek wykonywany jest dodatkowy etap wirowania przez kolumnę wirówkową PAXgene Shredder (PSC), a supernatant frakcji, która przepłynie przez kolumnę, jest przenoszony do świeżej probówki mikrowirówkowej. W celu dostosowania warunków wiązania dodawany jest etanol, a lizat jest nanoszony na kolumnę wirówkową PAXgene RNA (PRC). Podczas krótkiego wirowania RNA selektywnie wiąże się do membrany krzemionkowej PAXgene, a zanieczyszczenia przepływają przez kolumnę. Pozostałe zanieczyszczenia są usuwane w kilku wydajnych etapach płukania. Między pierwszym a drugim etapem płukania membrana jest poddawana działaniu DNazy I (RNFD) w celu usunięcia śladowych ilości związanego DNA. Po etapach płukania RNA jest eluowane za pomocą buforu do elucji (BR5) i poddawane denaturacji cieplnej.

Całkowite RNA oczyszczone za pomocą systemu PAXgene Blood RNA System jest czyste. W przypadku stosowania protokołu ręcznego wartości  $A_{260}/A_{280}$  mieszczą się w zakresie od 1,8 do 2,2, a DNA genomowe jest obecne w stężeniu  $\leq 1\%$  (stężenie procentowe wagowe) w  $\geq 95\%$  spośród wszystkich próbek, co zmierzono, wykonując ilościową reakcję PCR w czasie rzeczywistym dla sekwencji genu beta-aktyny. W co najmniej 95% spośród próbek nie zaobserwowano inhibicji reakcji RT-PCR w przypadku stosowania do 30% eluatu.

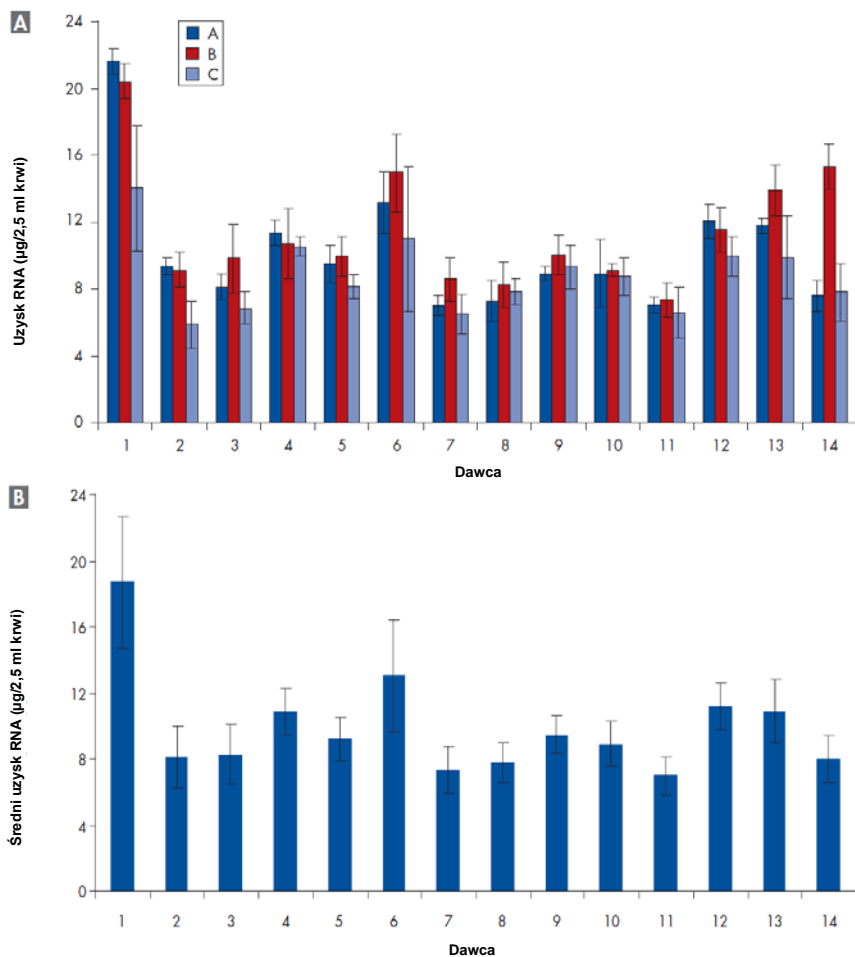


**Ryc. 5. Ręczna procedura PAXgene Blood RNA.**

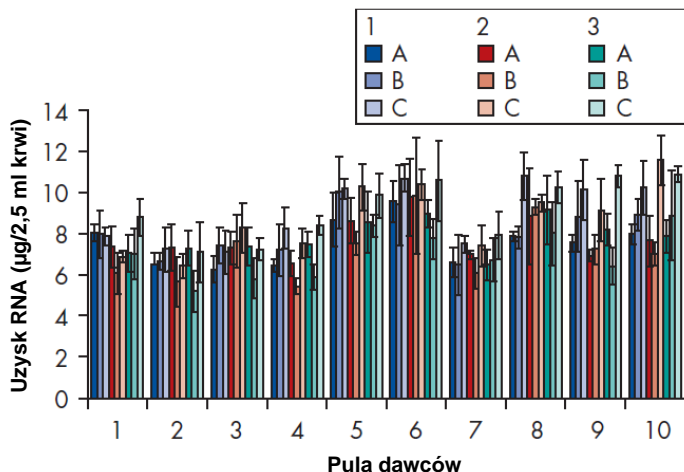
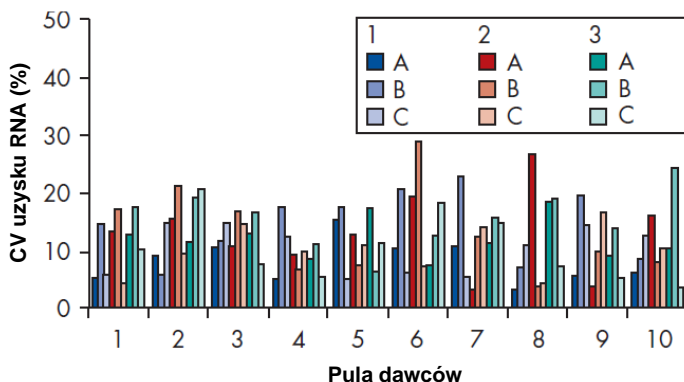
W przypadku stosowania protokołu ręcznego średni czas przygotowania próbki (na podstawie danych uzyskanych z 12 cykli przygotowań próbek) wynosi około 90 minut\*, przy czym czas pracy ręcznej wynosi jedynie 40 minut. Uzyski RNA z 2,5 ml ludzkiej krwi pełnej są  $\geq 3$   $\mu\text{g}$  dla  $\geq 95\%$  spośród przetworzonych próbek. Ze względu na to, że uzyski zależą w znacznym stopniu od dawcy, poszczególne uzyski mogą się różnić między sobą. System PAXgene Blood RNA zapewnia wysoką odtwarzalność i powtarzalność uzysków (Ryc. 6 i 7, strony 23 i 24) oraz odtwarzalność i powtarzalność reakcji RT-PCR (Ryc. 8 i 9, strony 28 i 29) dla poszczególnych dawców, co sprawia, że jest wysoce skuteczny dla klinicznych testów diagnostycznych.

Ryc. 6 (strona 23) wskazuje całkowitą powtarzalność i odtwarzalność systemu PAXgene Blood RNA System. Wykonano dodatkowe badania w celu wykazania wpływu różnych partii zestawu PAXgene Blood RNA Kit oraz różnych operatorów na odtwarzalność uzysku RNA i wydajność reakcji RT-PCR. Ze względu na to, że do badań tych używano zbiorczych próbek krwi, a nie pojedynczych próbek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), wyniki nie odzwierciedlają powtarzalności systemu, w tym zmienności między poszczególnymi pobraniami krwi, ale jedynie powtarzalność przygotowania próbek (patrz Ryc. 7, strona 24).

\* Całkowity czas trwania protokołu, w tym początkowe etapy postępowania z próbkami PAXgene Blood RNA Tubes (wirowania, przepłukiwanie osadu i ponowne zawieszenie osadu).



**Ryc. 6. Odtwarzalne i powtarzalne oczyszczanie RNA.** Każdy z 3 techników (A, B, C) przetworzył ręcznie po cztery próbki krwi od każdego z 14 dawców. Używano trzech zestawów wyposażenia, a wszystkie próbki przygotowane przez danego technika były przetwarzane za pomocą tego samego wyposażenia. **[A]** Przedstawiono średnie i odchylenia standardowe uzysku RNA dla powtórzeń próbek pobranych od danych dawców, przetwarzanych przez różnych techników. **[B]** 3 różnych techników przetworzyło po dwanaście powtórzeń próbek krwi od każdego z 14 dawców. Przedstawiono średnie i odchylenia standardowe uzysku RNA dla próbek pobranych od danych dawców, przetwarzanych przez wszystkich techników. Dla wszystkich próbek RNA wartości stosunku  $A_{260}/A_{280}$  mieściły się w zakresie od 1,8 do 2,2.

**A****B**

**Ryc. 7. Powtarzalność i odtwarzalność uzysku RNA dla różnych operatorów i serii zestawu PAXgene Blood RNA Kit przy użyciu zbiorczych próbek krwi.** Próbkę krwi pobrane od 30 różnych dawców zebrano do próbek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 próbek na dawcę, łącznie 360 próbek). Zawartość próbek zawierających próbki od 3 dawców połączono w jedną próbkę, a następnie ponownie rozdzielono na 36 próbek. 3 różnych operatorów przetworzyło ręcznie te 36 próbek otrzymanych z puli 3 dawców. Każdy operator używał 3 różnych serii zestawu PAXgene Blood RNA Kit do ekstrakcji i przetwarzania czterech powtórzeń próbek z każdej z 10 pul dawców. **[A]** Uzysk RNA i odchylenie standardowe dla każdej kombinacji operator-seria. 3 różnych operatorów (A, B, C) przetworzyło po cztery powtórzenia próbek krwi z 10 pul dawców, używając każdej z 3 serii zestawu (1, 2, 3). Przedstawiono średnie uzyski (kolumny) i odchylenia standardowe (słupki błędów) otrzymane na podstawie czterech powtórzeń próbki z tej samej puli dawców dla różnych operatorów i różnych serii zestawu. **[B]** Wartość CV uzysku RNA na pulę dawców dla wszystkich kombinacji operator-seria (A, B, C; 1, 2, 3) obliczona na podstawie wartości średniego uzysku i odchylenia standardowego uzysku przedstawionych na Ryc. 7A.



**Tabela 1A. Odtwarzalność w obrębie każdej serii i w obrębie każdego użytkownika dla wybranych pul dawców (1, 6, 9, 10)**

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

Tabela 1B. Odtwarzalność w obrębie każdego użytkownika i między wszystkimi seriami dla wybranych pul dawców (1, 6, 9, 10)

Kombinacja danych	Pula dawców 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> komórek/ml			Pula dawców 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> komórek/ml		
	Średni uzysk (µg)	SD (µg)	CV (%)	Średni uzysk (µg)	SD (µg)	CV (%)
Użytkownik A, wszystkie serie	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Użytkownik B, wszystkie serie	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Użytkownik C, wszystkie serie	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Kombinacja danych	Pula dawców 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> komórek/ml			Pula dawców 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> komórek/ml		
	Średni uzysk (µg)	SD (µg)	CV (%)	Średni uzysk (µg)	SD (µg)	CV (%)
Użytkownik A, wszystkie serie	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Użytkownik B, wszystkie serie	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Użytkownik C, wszystkie serie	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

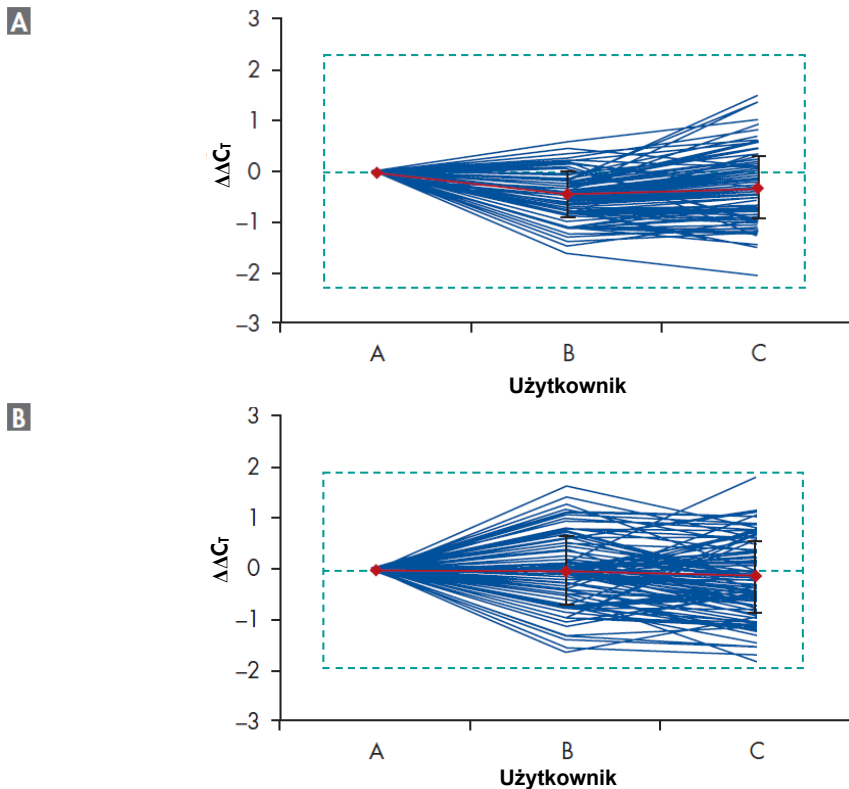
Tabela 1C. Odtwarzalność w obrębie każdej serii i między wszystkimi użytkownikami dla wybranych pul dawców (1, 6, 9, 10)

Kombinacja danych	Pula dawców 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> komórek/ml			Pula dawców 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> komórek/ml		
	Średni uzysk (µg)	SD (µg)	CV (%)	Średni uzysk (µg)	SD (µg)	CV (%)
Seria 1, wszyscy użytkownicy	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Seria 2, wszyscy użytkownicy	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Seria 3, wszyscy użytkownicy	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Kombinacja danych	Pula dawców 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> komórek/ml			Pula dawców 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> komórek/ml		
	Średni uzysk (µg)	SD (µg)	CV (%)	Średni uzysk (µg)	SD (µg)	CV (%)
Seria 1, wszyscy użytkownicy	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Seria 2, wszyscy użytkownicy	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Seria 3, wszyscy użytkownicy	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

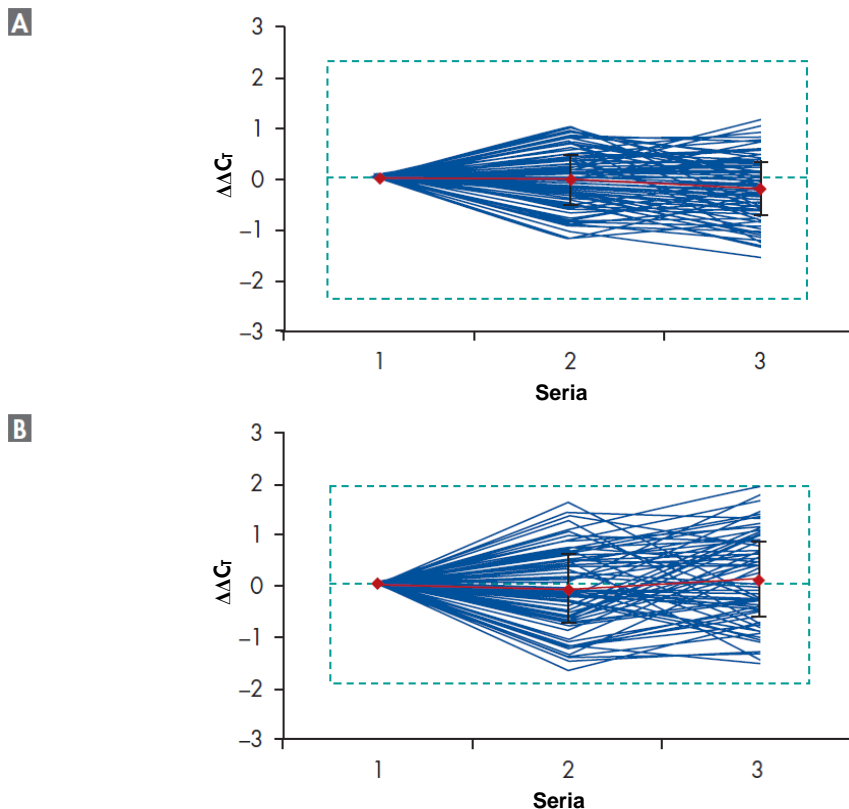
**Tabela 1D. Odtwarzalność między wszystkimi seriami i wszystkimi użytkownikami dla wybranych pul dawców (1, 6, 9, 10)**

Kombinacja danych	Pula dawców 1 5,1 x 10 <sup>6</sup> komórek/ml			Pula dawców 6 6,5 x 10 <sup>6</sup> komórek/ml		
	Średni uzysk (μg)	SD (μg)	CV (%)	Średni uzysk (μg)	SD (μg)	CV (%)
Seria 1, wszyscy użytkownicy	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
Kombinacja danych	Pula dawców 9 8,4 x 10 <sup>6</sup> komórek/ml			Pula dawców 10 10,2 x 10 <sup>6</sup> komórek/ml		
	Średni uzysk (μg)	SD (μg)	CV (%)	Średni uzysk (μg)	SD (μg)	CV (%)
Seria 1, wszyscy użytkownicy	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Szczegółowa analiza 4 reprezentatywnych pul dawców. Pule te wybrano na podstawie liczby białych krwinek w taki sposób, aby odzwierciedlały górną, średnią i dolną wartość zakresu prawidłowego liczby białych krwinek ( $4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$  leukocytów/ml). Liczba białych krwinek reprezentuje średnią wartość obliczoną na podstawie 3 wyników liczby białych krwinek otrzymanych dla próbek 3 różnych dawców na pulę dawców.



**Ryc. 8. Odtwarzalność reakcji RT-PCR — między użytkownikami.** Do reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym wykorzystano RNA oczyszczone w eksperymencie opisanym na Ryc. 7. Względne poziomy transkryptów **[A]** FOS i **[B]** IL1B określono, przeprowadzając reakcję dupleks RT-PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu 18S rRNA jako wzorca wewnętrznego. Wartości dla wszystkich próbek naniesiono na wykres w odniesieniu do wartości dla użytkownika 1 (10 pul dawców x 3 serie zestawu x 4 powtórzenia = 120 zestawów danych dla każdego genu), ze średnimi (czerwone linie) i odchyleniami standardowymi (czarne słupki) dla wszystkich widocznych próbek. Linie przerywane wskazują  $\pm 3 \times$  całkowitą precyzję oznaczeń (FOS: 2,34  $C_T$ ; IL1B: 1,93  $C_T$ ).



**Ryc. 9. Odtwarzalność reakcji RT-PCR — między seriami zestawu.** Do reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym wykorzystano RNA oczyszczone w eksperymencie opisanym na Ryc. 7. Względne poziomy transkryptów [A] FOS i [B] IL1B określono, przeprowadzając reakcję dupleks RT-PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu 18S rRNA jako wzorca wewnętrznego. Wartości dla wszystkich próbek naniesiono na wykres w odniesieniu do wartości dla 1 serii zestawu (10 pul dawców x 3 użytkowników x 4 powtórzenia = 120 zestawów danych dla każdego genu), ze średnimi (czerwone linie) i odchyleniami standardowymi (czarne słupki) dla wszystkich widocznych próbek. Linie przerywane wskazują  $\pm 3x$  całkowitą precyzję oznaczeń (FOS: 2,34  $C_T$ ; IL1B: 1,93  $C_T$ ).

**Tabela 2. Podsumowanie danych dla reakcji RT-PCR z Ryc. 8 i 9**

System testowy	Oznaczenie FOS/18S rRNA		Oznaczenie IL1B/18S rRNA	
	Średnia ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SD ( $\Delta\Delta C_T$ )	Średnia ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SD ( $\Delta\Delta C_T$ )
<b>Odtwarzalność w obrębie każdego użytkownika i między wszystkimi seriami</b>				
Wszyscy użytkownicy, seria 1–seria 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Wszyscy użytkownicy, seria 1–seria 2	–0,03	0,48	–0,07	0,66
Wszyscy użytkownicy, seria 1–seria 3	–0,21	0,52	0,11	0,71
<b>Odtwarzalność w obrębie każdego użytkownika i między wszystkimi seriami</b>				
Wszystkie serie, użytkownik A–użytkownik A	0,00	0,00	0,00	0,00
Wszystkie serie, użytkownik A–użytkownik B	–0,46	0,44	–0,06	0,69
Wszystkie serie, użytkownik A–użytkownik C	–0,31	0,60	–0,15	0,71

Użytkownik: technik, osoba przeprowadzająca badanie.

Seria: numer serii zestawu używanego podczas badania.

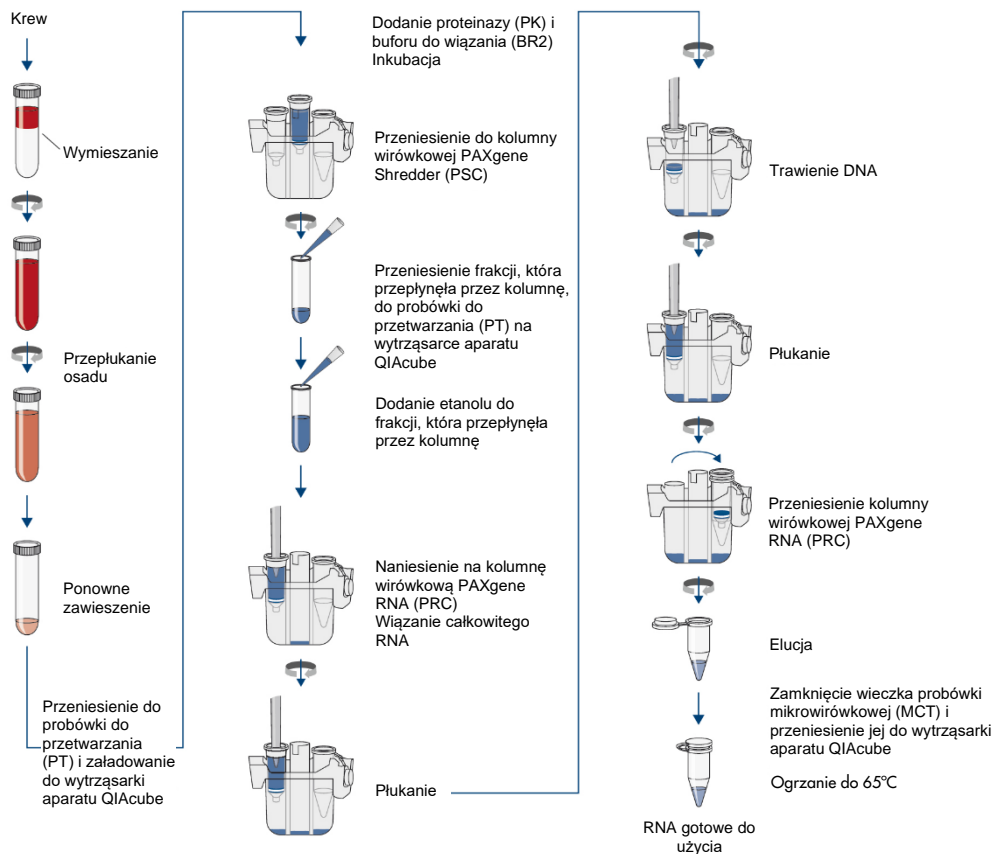
SD: odchylenie standardowe.

Przedstawiono średnie wartości  $\Delta\Delta C_T$  (N = 120) i odchylenia standardowe dla danych przedstawionych na Ryc. 8 i 9.

## Zautomatyzowane oczyszczanie RNA

Przygotowanie próbek jest wykonywane w sposób zautomatyzowany przy użyciu aparatu QIAcube® (nr kat. 9001882 [110 V], nr kat. 9001293 [230 V]; nie zawiera QIAcube Connect) i obejmuje te same etapy, co procedura ręczna, umożliwiając dalsze korzystanie z zestawu PAXgene Blood RNA Kit w celu oczyszczenia RNA o wysokiej jakości. Więcej informacji na temat aparatu QIAcube zawiera dokument QIAcube — Podręcznik użytkownika (*QIAcube User Manual*) oraz strona [www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube).

Zautomatyzowany protokół oczyszczania RNA składa się z 2 części (lub protokołów), „PAXgene Blood RNA Part A” (PAXgene Blood RNA — część A) i „PAXgene Blood RNA Part B” (PAXgene Blood RNA — część B), między którymi wymagane jest wykonanie krótkich czynności ręcznych (patrz Ryc. 10, strona 31).



**Ryc. 10. Zautomatyzowana procedura PAXgene Blood RNA.**

Odwirowany, przepłukany i ponownie zawieszony osad kwasu nukleinowego (patrz część „Załadanie i oczyszczanie RNA”, strona 20) jest przenoszony z próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT) do próbek do przetwarzania (PT), które znajdują się w module wytrząsarki termicznej na stole roboczym aparatu QIAcube. Operator wybiera i uruchamia protokół „PAXgene Blood RNA Part A” (PAXgene Blood RNA — część A) z menu. Aparat QIAcube wykonuje etapy protokołu aż do etapu elucji RNA w buforze do elucji (BR5). Operator przenosi próbki mikrowirówkowe (MCT) zawierające oczyszczone RNA do modułu wytrząsarki termicznej aparatu QIAcube. Operator wybiera i uruchamia protokół

„PAXgene Blood RNA Part B” (PAXgene Blood RNA — część B) z menu, a aparat QIAcube wykonuje denaturację cieplną.

Średni czas przygotowania próbki (na podstawie danych z 12 cykli przygotowań próbek) wynosi 151 minut\*, przy istotnie krótszym czasie pracy ręcznej w porównaniu do protokołu ręcznego.

Uzyski RNA z 2,5 ml ludzkiej krwi pełnej są  $\geq 3$   $\mu\text{g}$  dla  $\geq 95\%$  spośród przetworzonych próbek. Ryc. 11 (strona 33) wskazuje uzyski RNA z łącznie 216 próbek przygotowanych za pomocą protokołu zautomatyzowanego przy użyciu 3 serii zestawu przez 3 operatorów. Ze względu na to, że do tych badań używano zbiorczych próbek krwi, a nie pojedynczych próbek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), wyniki nie odzwierciedlają uzysku RNA oczekiwanego dla pojedynczych próbek pobranych podczas pojedynczego pobrania krwi. Ze względu na to, że uzyski zależą w znacznym stopniu od dawcy, poszczególne uzyski mogą się różnić między sobą (Ryc. 11, strona 33).

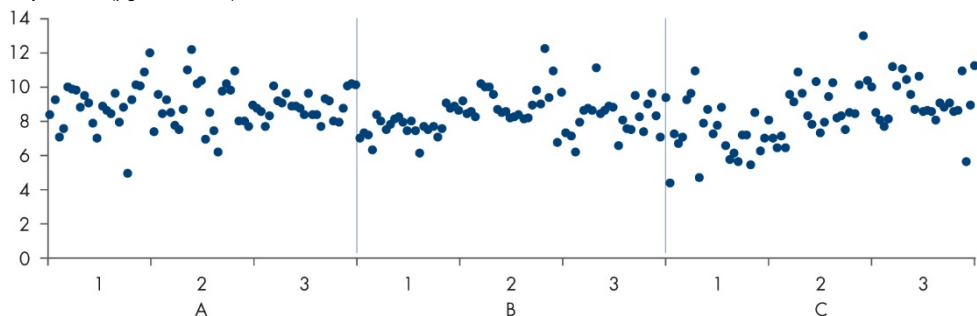
W co najmniej 95% spośród próbek nie zaobserwowano inhibicji reakcji RT-PCR w przypadku stosowania do 30% eluatu. W przypadku stosowania protokołu zautomatyzowanego zanieczyszczenie krzyżowe między próbkami jest niewykrywalne, co zmierzono, wykonując ilościową reakcję RT-PCR w czasie rzeczywistym dla sekwencji transkryptów ABL1 i FOS w próbkach negatywnych pod względem RNA (woda) sparowanych z próbkami pozytywnymi względem RNA (ludzka krew pełna) podczas tego samego cyklu pracy.

RNA oczyszczone za pomocą systemu PAXgene Blood RNA System i zautomatyzowanego protokołu jest czyste, na co wskazuje brak inhibicji reakcji RT-PCR (patrz Ryc. 11, strona 33) oraz wartości  $A_{260}/A_{280}$  mieszczące się w zakresie od 1,8 do 2,2. DNA genomowe jest obecne w stężeniu  $\leq 1\%$  (stężenie procentowe wagowe) w  $\geq 95\%$  spośród wszystkich próbek, co zmierzono, wykonując ilościową reakcję PCR w czasie rzeczywistym dla sekwencji genu beta-aktyny. Na Ryc. 12 i 13 (strony 33 i 34) przedstawiono wartości  $A_{260}/A_{280}$  i względne DNA genomowe dla łącznie 216 próbek przygotowanych za pomocą protokołu zautomatyzowanego przy użyciu 3 serii zestawów przez 3 operatorów.

\* Całkowity czas trwania protokołu, w tym początkowe etapy postępowania z próbkami PAXgene Blood RNA Tubes (wirowania, przepłukiwanie osadu i ponowne zawieszanie osadu).

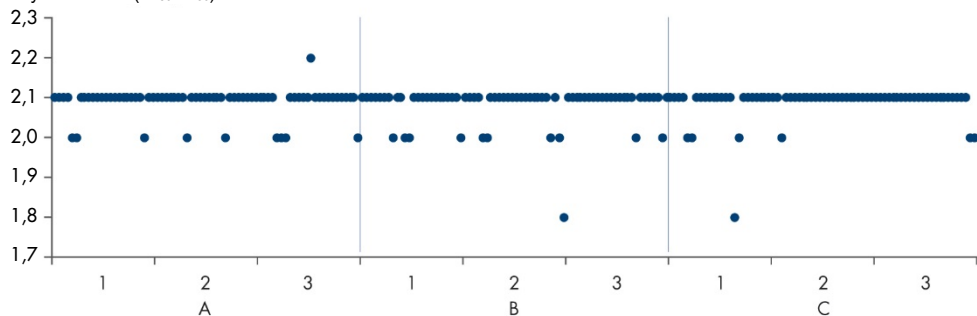


Uzysk RNA ( $\mu\text{g}/2,5 \text{ ml}$  krwi)



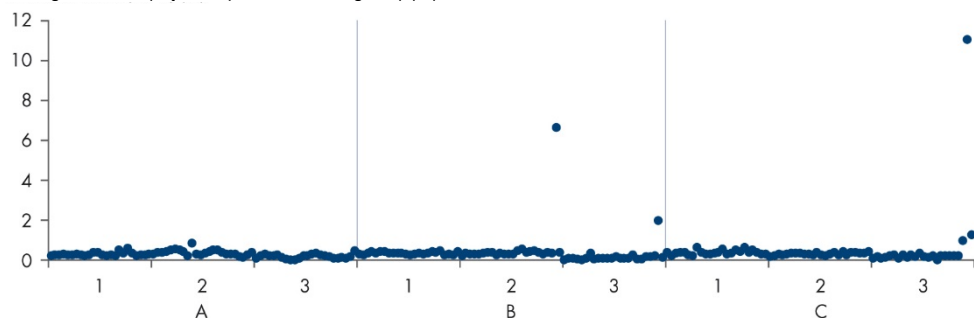
**Ryc. 11. Uzysk RNA — przetwarzanie zautomatyzowane.** Próbkę krwi pobrane od 36 różnych dawców zebrano do probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 6 probówek na dawcę, łącznie 216 probówek). Zawartość probówek zawierających próbki od 6 dawców połączono w jedną próbkę, a następnie ponownie rozdzielono na 36 próbek. 3 różnych operatorów (A, B, C) przetworzyło te 36 próbek otrzymanych z puli 6 dawców. Każdy operator używał 3 różnych serii (1, 2, 3) zestawu PAXgene Blood RNA Kit do zautomatyzowanej ekstrakcji i przetwarzania czterech powtórzeń próbek z każdej z 6 pul dawców. Przedstawiono uzyski RNA dla wszystkich poszczególnych próbek dla każdej kombinacji operator-seria.

Czystość RNA ( $A_{260}/A_{280}$ )



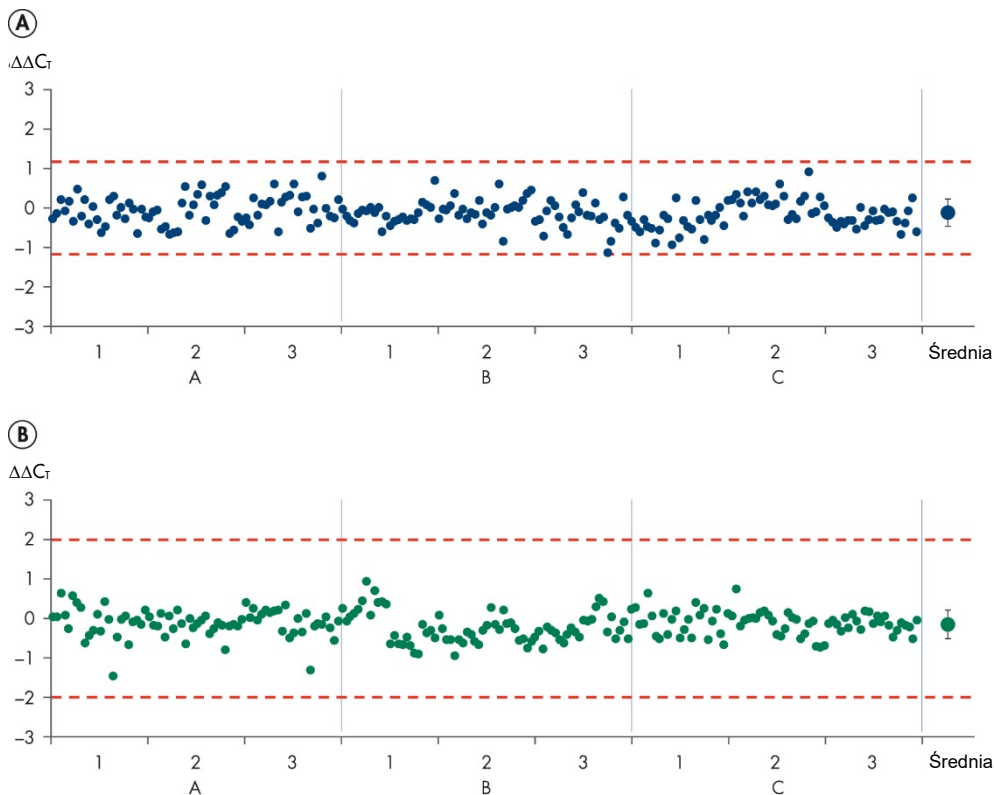
**Ryc. 12. Czystość RNA (wartości  $A_{260}/A_{280}$ ) — przetwarzanie zautomatyzowane.** 3 różnych operatorów (A, B, C) przeprowadziło oczyszczanie RNA za pomocą 3 różnych serii (1, 2, 3) zestawu PAXgene Blood RNA Kit w eksperymencie opisanym na Ryc. 11. Przedstawiono wartości  $A_{260}/A_{280}$  dla wszystkich poszczególnych próbek dla każdej kombinacji operator-seria.

DNA genomowe (stężenie procentowe wagowe) (%)



**Ryc. 13. Czystość RNA (% zanieczyszczenia DNA genomowym) — przetwarzanie zautomatyzowane.** 3 różnych operatorów (A, B, C) przeprowadziło oczyszczanie RNA za pomocą 3 różnych serii (1, 2, 3) zestawu PAXgene Blood RNA Kit w eksperymencie opisanym na Ryc. 11. Przedstawiono ilości DNA genomowego (stężenie procentowe wagowe) dla wszystkich poszczególnych próbek dla każdej kombinacji operator-seria.

Protokół zautomatyzowanego oczyszczania RNA za pomocą systemu PAXgene Blood RNA System zapewnia wysoką odtwarzalność i powtarzalność wyników reakcji RT-PCR przedstawione na Ryc. 14 (strona 35), co sprawia, że jest wysoce skuteczny dla klinicznych testów diagnostycznych.



**Ryc. 14. Odtwarzalność wyników reakcji RT-PCR — między protokołem zautomatyzowanym a ręcznym.** 3 różnych operatorów (A, B, C) przeprowadziło oczyszczanie RNA za pomocą 3 różnych serii (1, 2, 3) zestawu PAXgene Blood RNA Kit, używając protokołu zautomatyzowanego w eksperymencie opisanym na Ryc. 11. Równocześnie oczyszczano RNA z odpowiednich próbek zawierających powtórzenie próbki, używając protokołu ręcznego. Względne poziomy transkryptów **[A]** FOS i **[B]** IL1B określono, przeprowadzając reakcję dupleks RT-PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu 18S rRNA jako wzorca wewnętrznego. Możliwe różnice poziomu transkryptu pomiędzy RNA przygotowanym ze sparowanych próbek krwi z wykorzystaniem obu protokołów ekstrakcji (ręcznego i automatycznego) obliczono metodą  $\Delta\Delta C_T$ . Poszczególne wartości  $\Delta\Delta C_T$  dla wszystkich par próbek (4 powtórzenia x 6 pul dawców x 3 serie zestawu x 3 operatorów = 216 par dla każdego genu) naniesiono na wykres jako pojedyncze punkty ze średnimi (większe punkty) i odchyleniami standardowymi (czarne słupki) dla wszystkich przedstawionych próbek. Linie przerywane wskazują  $\pm 3x$  całkowitą precyzję oznaczeń (FOS: 1,16  $C_T$ ; IL1B: 1,98  $C_T$ ; różne precyzje oznaczenia w porównaniu do Ryc. 1–4, 8 i 9 z powodu różnych wersji oznaczenia).

# Sprzęt i odczynniki zapewniane przez użytkownika

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

## Dla wszystkich protokołów

- Probówki PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; nr kat. 762165)
- Etanol (96–100%, stopień czystości cz.d.a.)
- Pipety\* (od 10 µl do 4 ml)
- Jałowe końcówki do pipet z barierą aerozolową, wolne od RNaz<sup>†</sup>
- Cylinder miarowy<sup>‡</sup>
- Wirówka\* umożliwiającą wirowanie przy 3000–5000 x g, wyposażona w rotor wychylny i kosze na probówki PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Wytrząsarka\*
- Kruszony lód
- Marker permanentny do opisywania sprzętu

## Dla protokołu ręcznego

- Mikrowirówka o zmiennej prędkości obrotowej\* umożliwiającą wirowanie w zakresie co najmniej 1000–8000 x g, chociaż dopuszczalne są mniejsze i większe wartości siły

\* Należy upewnić się, że aparaty są regularnie sprawdzane, konserwowane i kalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.

<sup>†</sup> Należy upewnić się, że użytkownik zaznajomił się z wytycznymi dotyczącymi postępowania z RNA (Załącznik A, strona 64).

<sup>‡</sup> Potrzebny do dodania etanolu do koncentratu buforu BR4.

odśrodkowej (szczegóły zawierają etapy protokołu), wyposażona w rotor dla probówek mikrowirówkowych o pojemności 2 ml

- Wytrząsarka-inkubator\* umożliwiającą inkubację w temperaturze 55°C i 65°C oraz wytrząsanie przy  $\geq 400$  obr./min, nie przekraczając 1400 obr./min (np. Eppendorf® Thermomixer Compact lub równoważny aparat)

### **Dla protokołu zautomatyzowanego**

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

Materiały eksploatacyjne aparatu QIAcube

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

Akcesoria aparatu QIAcube

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

\* Należy upewnić się, że aparaty są regularnie sprawdzane, konserwowane i kalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.

<sup>†</sup> Zawarte również w pakiecie Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, nr kat. 990395)

# Ważne informacje

## Obsługa aparatu QIAcube

Upewnić się, że użytkownik potrafi obsługiwać aparat QIAcube. Przed uruchomieniem zautomatyzowanych protokołów PAXgene Blood RNA należy przeczytać dokument *QIAcube — Instrukcja obsługi* i wszelkie dodatkowe informacje dostarczone z aparatem QIAcube, przykładając szczególną uwagę do informacji dotyczących bezpieczeństwa.

## Uruchamianie aparatu QIAcube

Zamknąć drzwiczki aparatu QIAcube, a następnie włączyć aparat QIAcube, używając przełącznika zasilania (patrz Ryc. 15, strona 39).

Zostanie wyemitowany sygnał dźwiękowy i pojawi się ekran początkowy. Aparat automatycznie wykonuje testy inicjalizacji.

## Instalowanie protokołów w aparacie QIAcube

Zanim możliwe będzie wykonanie pierwszego cyklu przygotowań RNA w aparacie QIAcube konieczna jest wstępna instalacja protokołów. Zainstalować oba protokoły „PAXgene Blood RNA Part A” (PAXgene Blood RNA — część A) i „PAXgene Blood RNA Part B” (PAXgene Blood RNA — część B).

Protokoły są dostępne pod adresem **[www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube)**. Należy je pobrać na pamięć USB dostarczoną z aparatem QIAcube, a następnie przesłać do aparatu QIAcube, używając portu USB.

Port USB umieszczony za panelem ochronnym (patrz Ryc. 15, strona 39), umożliwia podłączenie pamięci USB (dostarczonej z aparatem QIAcube) do aparatu QIAcube. Za pośrednictwem portu USB można również przesyłać pliki danych, takie jak pliki dziennika lub pliki raportów, z aparatu QIAcube do pamięci USB.



Port USB jest przeznaczony do użytku wyłącznie z pamięcią USB dostarczoną przez firmę QIAGEN. Nie należy podłączać innych urządzeń do tego portu.



Nie należy wyciągać pamięci USB podczas pobierania protokołów, przesyłania plików danych lub w trakcie wykonywania protokołu.



Ryc. 15. Widok aparatu QIAcube z przodu.



Ekran dotykowy



Drzwiczki



Port szeregowy RS232 za panelem ochronnym (do użytku wyłącznie przez techników serwisu aparatów firmy QIAGEN)



Port USB za panelem ochronnym



Przełącznik zasilania



Szuflada Waste (Odpady)

## Ładowanie aparatu QIAcube

W celu zaoszczędzenia czasu ładowanie można wykonywać podczas jednego lub obu 10-minutowych etapów wirowania (etapy 3 i 5) w części „Protokół: zautomatyzowane oczyszczanie całkowitego RNA z ludzkiej krwi pełnej pobranej do probówek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)”, strona 57.

### Butelki na odczynniki

Przed każdym cyklem pracy na aparacie QIAcube należy ostrożnie napełnić 4 butelki na odczynniki odczynnikami wymienionymi w Tabeli 3 do wskaźnika poziomu maksymalnego lub, jeśli nie jest to możliwe, do maksymalnego poziomu, na który pozwalają objętości buforów dostarczonych w zestawie PAXgene Blood RNA Kit. Wyraźnie oznaczyć butelki i wieczka nazwami buforów i włożyć napełnione butelki na odczynniki na odpowiednie pozycje w statywie na butelki na odczynniki. Załadować statyw na stół roboczy aparatu QIAcube w przedstawiony sposób (Ryc. 16 i 17, strony 41 i 42).



Dostarczona objętość buforu BR2 nie wypełni butelki na odczynnik do poziomu wskaźnika. Bufory BR3 i BR4 mogą nie wypełnić butelki do poziomu wskaźnika po przetworzeniu wielu próbek w poprzednich cyklach pracy.



Przed umieszczeniem butelek na stole roboczym należy upewnić się, że zdjęto z nich wieczka.



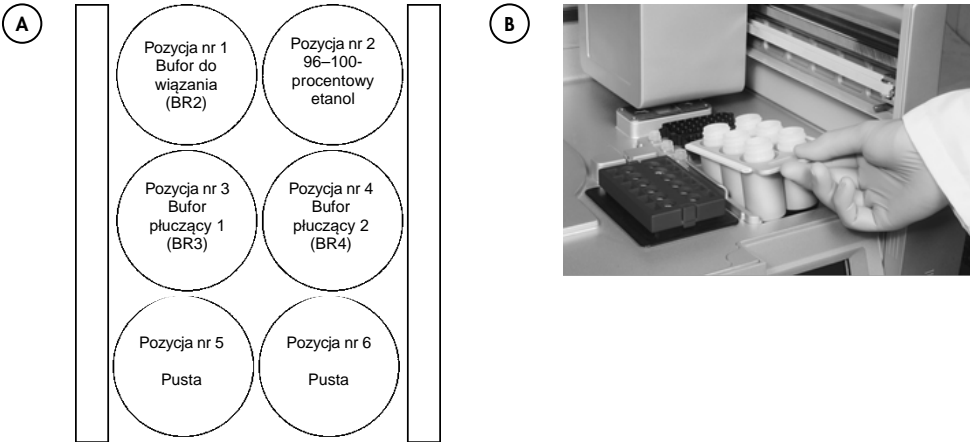
Objętości buforów dostarczone w zestawie PAXgene Blood RNA Kit (50) wystarczają na maksymalnie 7 cykli przygotowań RNA na aparacie QIAcube, przy liczbie próbek od 2 do 12 na cykl. Ogólnie rzecz biorąc, należy unikać wykonywania cykli roboczych z małą liczbą próbek, aby przetworzyć łącznie 50 próbek na zestaw przy maksymalnie 7 cyklach przygotowań RNA. W przypadku wykonania więcej niż 7 cykli przygotowań RNA może zabraknąć buforów do przetworzenia ostatnich próbek.



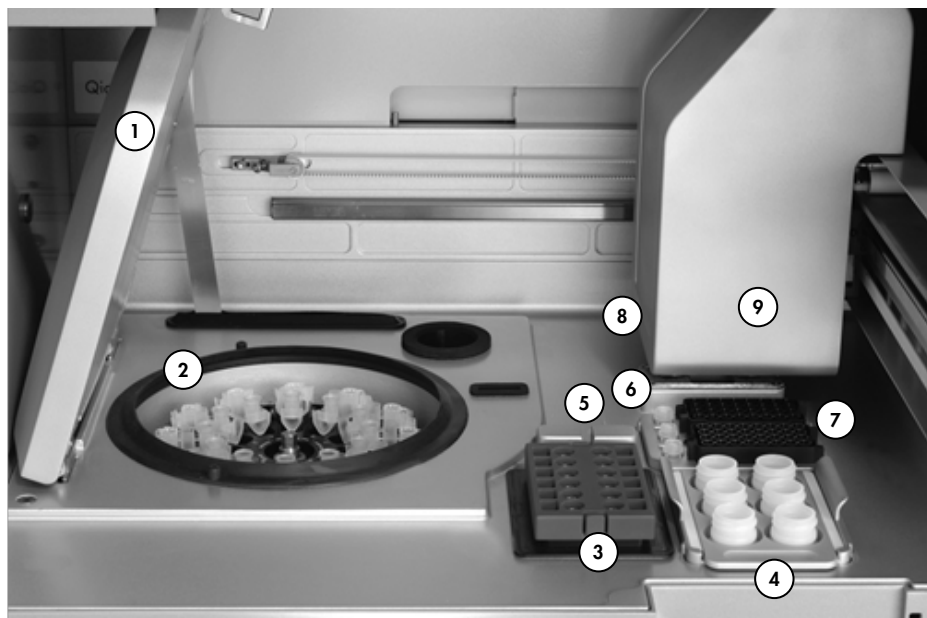
Tabela 3. Pozycje w statywie na butelki na odczynniki

Pozycja	Odczynnik
1	Bufor do wiązania (BR2)
2	96–100-procentowy etanol
3	Bufor płuczący 1 (BR3)
4	Bufor płuczący 2 (BR4)*
5	— (pozostawić pustą)
6	— (pozostawić pustą)

\* Bufor płuczący 2 (BR4) jest dostarczany w postaci koncentratu. Przed pierwszym użyciem dodać 4 objętości etanolu (96–100-procentowego, stopień czystości cz.d.a.), zgodnie z instrukcją na butelce, aby uzyskać roztwór roboczy.



Ryc. 16. Ładowanie statywu na butelki na odczynniki. [A] Schemat pozycji i zawartości butelek w statywie na butelki na odczynniki. [B] Ładowanie statywu do aparatu QIAcube.



Ryc. 17. Widok wnętrza aparatu QIAcube.

- |   |                                 |   |   |
|---|---------------------------------|---|---|
| 1 | Pokrywa wirówki                 | 6 | Gniazda na probówki mikrowirówkowe      |
| 2 | Wirówka                         | 7 | Statywy na końcówki                     |
| 3 | Wyrząsarka                      | 8 | Gniazda do utylizacji końcówek i kolumn |
| 4 | Statyw na butelki na odczynniki | 9 | Ramię robota                            |
| 5 | Czujnik końcówek                |   |   |

Kolumny wirówkowe (PRC, PSC), probówki mikrowirówkowe (MCT) i sprzęty z tworzywa sztucznego do aparatu QIAcube

Umieścić 2 statywy na końcówki wypełnione końcówkami z filtrem, 1000 µl, w aparacie QIAcube (patrz Ryc. 17, strona 42). W razie potrzeby uzupełniać statywy końcówkami.



Używać wyłącznie końcówek z filtrem, 1000 µl, przeznaczonych do użytku z aparatem QIAcube.

Oznaczyć adaptory rotora i probówki mikrowirówkowe (MCT) dla każdej próbki, używając markera permanentnego. Otworzyć kolumny wirówkowe PAXgene Shredder (PSC), które będą używane, a następnie całkowicie odciąć wieczka, używając nożyczek (patrz Ryc. 18, strona 44).



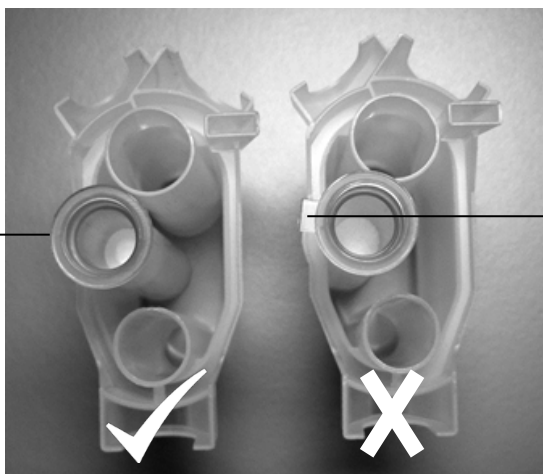
Dla prawidłowej pracy zmechanizowanego chwytaka analizatora QIAcube należy zupełnie usunąć (odciąć) wieczka i wszystkie plastikowe elementy łączące wieczko z kolumnami wirówkowymi niszczarki PAXgene Shredder (PSC; patrz ryc. 16). W przeciwnym razie zmechanizowany chwytak nie będzie mógł prawidłowo chwycić kolumn wirówkowych (PSC, PRC).

Władować kolumnę wirówkową PAXgene RNA (PRC), kolumnę wirówkową PAXgene Shredder (PSC, bez wieczka) i opisaną probówkę mikrowirówkową (MCT) na odpowiednie pozycje w każdym oznaczonym adapterze rotora w sposób przedstawiony w Tabeli 4 i na Ryc. 19 (strona 44).



Upewnić się, że wieczka kolumny wirówkowej (PRC) i probówki mikrowirówkowej (MCT), są dopchnięte aż do dna gniazd przy krawędzi adaptera rotora. W przeciwnym razie wieczka zostaną odłamane podczas wirowania.

Prawidłowo  
o usunięte  
wieczko  
kolumny



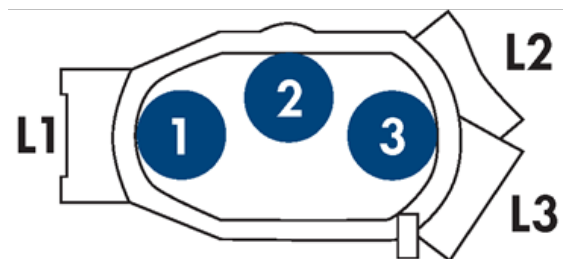
Nieprawidłowo  
usunięte  
wieczko  
kolumny;  
część wieczka  
wciąż  
przyłączona  
do kolumny

**Ryc. 18. Ładowanie kolumny wirówkowej PAXgene Shredder (PSC).** Kolumna wirówkowa PAXgene Shredder (PSC) jest ładowana na środkową pozycję adaptera rotora. Przed załadowaniem kolumny (PSC) należy odciąć wieczko.

**Tabela 4. Sprzęt laboratoryjny w adapterze rotora**

Pozycja	Odczynnik	Pozycja wieczka
1	Kolumna wirówkowa PAXgene RNA (czerwona, PRC)	L1
2	Kolumna wirówkowa PAXgene Shredder (liliowa, PSC) (przed umieszczeniem w adapterze rotora odciąć wieczko)	–
3	Probówka mikrowirówkowa (MCT)*	L3

\* Używać probówek mikrowirówkowych (1,5 ml) dołączonych do zestawu PAXgene Blood RNA Kit.



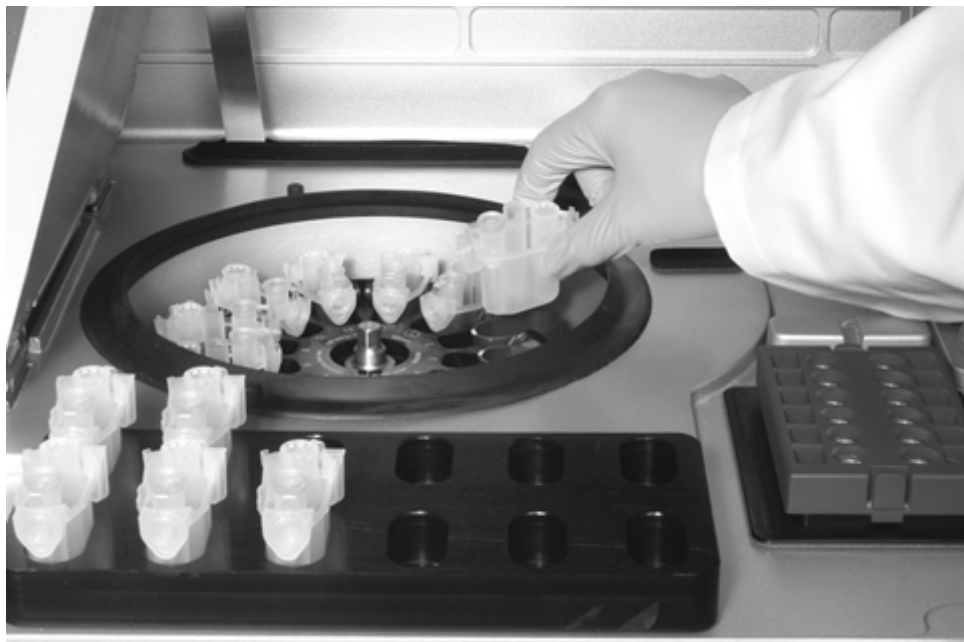
**Ryc. 19. Pozycje w adapterze rotora.** W adapterze rotora znajdują się trzy pozycje probówek (1–3) i trzy pozycje wieczek (L1–L3).

## Ładowanie wirówki

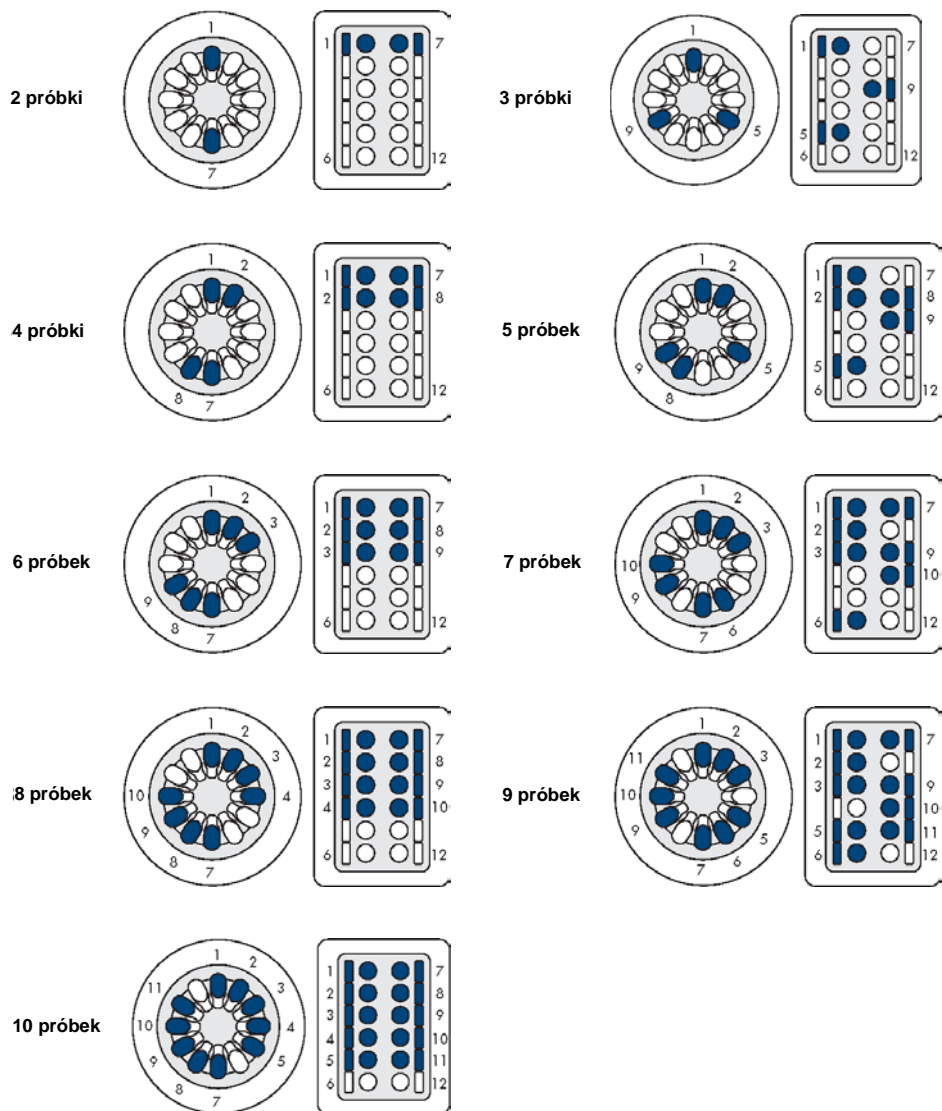
Załadować zmontowane adaptory rotora do koszy wirówki w sposób przedstawiony na Ryc. 20 poniżej.



W przypadku przetwarzania mniej niż 12 próbek należy upewnić się, że rotor wirówki załadowano w taki sposób, aby był wyważony promieniowo (patrz Ryc. 21, strona 46). Wszystkie kosze wirówki muszą być zamontowane przed rozpoczęciem protokołu, nawet jeśli przetwarzanych jest mniej niż 12 próbek. Nie można przetwarzać pojedynczej (jednej) próbki lub 11 próbek.



**Ryc. 20. Ładowanie wirówki.** Załadować zmontowane adaptory rotora do koszy wirówki.



**Ryc. 21. Ładowanie wirówki i wytrząsarki.** Przedstawiono pozycje wirówki i wytrząsarki używane w celu przetwarzania od dwóch (2) do dziesięciu (10) próbek. Nie można przetwarzać jednej próbki lub 11 próbek.

## Probówki do przetwarzania (PT)

Wyciągnąć wszystkie probówki do przetwarzania (PT), które pozostały w gniazdach na probówki mikrowirówkowe po poprzednich cyklach pracy (patrz Ryc. 17, strona 42). Napełnić 3 probówki do przetwarzania (PT) ilością odczynników podaną w Tabeli 5, odpowiednio do liczby próbek przetwarzanych w cyklu pracy.

W celu przygotowania mieszaniny inkubacyjnej DNazy I należy dodać wskazaną objętość buforu do trawienia DNA (RDD) za pomocą pipety do probówki do przetwarzania (PT), a następnie dodać wskazaną objętość roztworu podstawowego DNazy I (RNFD). Wymieszać, delikatnie pipetując całą objętość mieszaniny w górę i w dół 3 razy, używając końcówki do pipety 1000 µl.

Używać probówek do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml dołączonych do zestawu PAXgene Blood RNA Kit. Wyraźnie opisać probówki (PT) nazwami odczynników i umieścić je na odpowiednich pozycjach w gniazdach na probówki mikrowirówkowe, w sposób przedstawiony w Tabeli 6 (strona 48).



DNaza I (RNFD) jest szczególnie wrażliwa na denaturację fizyczną. Mieszać wyłącznie za pomocą pipety, używając końcówek do pipety o dużym otworze wylotowym, aby zminimalizować tarcie. Nie wytrząsać.



Należy upewnić się, że za pomocą pipety dodawane są wymagane objętości określone w Tabeli 5.

**Tabela 5. Wymagane objętości odczynników, które należy dodać do próbek do przetwarzania umieszczonych w gniazdach próbek mikrowirówkowych**

Liczba próbek	Objętość odczynnika dla wskazanej liczby próbek (μl)		
	Proteinaza K (PK)	Mieszanina inkubacyjna DNazy I	Bufor do elucji (BR5)
2	126	187 (23 DNazy I + 164 buforu Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNazy I + 228 buforu Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNazy I + 292 buforu Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNazy I + 356 buforu Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNazy I + 421 buforu Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNazy I + 485 buforu Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNazy I + 549 buforu Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNazy I + 613 buforu Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNazy I + 678 buforu Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNazy I + 806 buforu Buffer RDD)	1177

**Tabela 6. Gniazda na próbki mikrowirówkowe**

	Pozycja		
	A	B	C
<b>Zawartość</b>	Proteinaza K (PK)	Mieszanina inkubacyjna DNazy I	Bufor do elucji (BR5)
<b>Naczynie</b>	Probówka do przetwarzania (PT)*	Probówka do przetwarzania (PT)*	Probówka do przetwarzania (PT)*

\* Używać probówek do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml dołączonych do zestawu PAXgene Blood RNA Kit.



# Protokół: ręczne oczyszczanie całkowitego RNA z ludzkiej krwi pełnej pobranej do probówek PAXgene Blood RNA Tube (BRT)

## Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Upewnić się, że opakowanie zestawu jest nienaruszone i nieuszkodzone, a żaden z buforów nie wyciekł. Nie używać zestawu, który jest uszkodzony.
- Podczas używania pipety należy upewnić się, że nastawiono ją na odpowiednią objętość, a aspiracja i dozowanie płynu jest wykonywana ostrożnie — cała objętość płynu jest pobierana do pipety i wypuszczana z niej.
- Aby uniknąć przenoszenia próbek do nieprawidłowych probówek lub kolumn wirówkowych, należy upewnić się, że wszystkie probówki i kolumny wirówkowe zostały prawidłowo opisane markerem permanentnym. Opisać wieczko i boczną część każdej probówki (PT, MCT). W przypadku kolumny wirówkowej opisać boczną część powiązanej z nią probówki do przetwarzania (PT). Po przeniesieniu płynu do probówki lub kolumny wirówkowej należy ją zamknąć.
- Rozlanie próbek i buforów podczas procedury może spowodować obniżenie uzysku i jakości RNA.
- Wszystkie etapy tego protokołu, w tym etapy wirowania, należy wykonywać w temperaturze pokojowej (15–25°C), o ile nie określono inaczej.

Z powodu czułości technologii amplifikacji kwasu nukleinowego podczas postępowania z próbkami konieczne jest podjęcie następujących środków ostrożności w celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego:

- Ostrożnie nanosić próbkę na kolumnę wirówkową (PRC, PSC) za pomocą pipety, bez zamaczania brzegu kolumny.
- Należy zawsze zmieniać końcówki pipet pomiędzy przenoszeniami płynów. Używać końcówek do pipet z barierą aerozolu.

- Unikać dotykania membrany kolumny wirówkowej (PRC, PSC) końcówką pipety.
- Po wytrząsaniu lub ogrzewaniu próbki mikrowirówkowej (MCT) krótko odwirować kolumnę, aby usunąć krople z wnętrza wieczka.
- Nosić rękawiczki przez cały czas przeprowadzania procedury. W przypadku kontaktu rękawiczek z próbką natychmiast zmienić rękawiczki.
- Przed umieszczeniem kolumny wirówkowej (PRC, PSC) w mikrowirówce należy ją zamknąć. Odwirować w sposób opisany w procedurze.
- Otwierać tylko jedną kolumnę wirówkową (PRC, PSC) naraz i zachować ostrożność, aby uniknąć wytwarzania aerozoli.
- W celu wydajnego równoległego przetwarzania wielu próbek należy nappełnić statyw próbkami do przetwarzania (PT), do których będzie można przenieść kolumny wirówkowe (PRC, PSC) po wirowaniu. Wyrzucić zużyte próbki do przetwarzania (PT) zawierające płyn, który przepłynął przez kolumnę, a następnie umieścić nowe próbki do przetwarzania (PT) z kolumnami wirówkowymi (PRC, PSC) bezpośrednio w mikrowirówce.

## Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Krew należy pobrać do próbek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zgodnie z instrukcjami zawartymi w dokumencie *PAXgene Blood RNA Tube — Instrukcja obsługi*. W razie potrzeby można zapoznać się z zaleceniami dotyczącymi postępowania z próbkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) przedstawionymi w Załączniku C (strona 71).
- Aby zapewnić całkowitą liczbę krwinek, należy upewnić się, że po pobraniu krwi próbki PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) są inkubowane przez co najmniej 2 godziny w temperaturze pokojowej. Inkubacja próbek PAXgene Blood RNA Tube (BRT) przez noc może spowodować zwiększenie uzysku. Jeśli po pobraniu krwi próbka PAXgene Blood RNA Tube (BRT) była przechowywana w temperaturze 2–8°C, –20°C lub –70°C, przed rozpoczęciem procedury należy doprowadzić ją do temperatury pokojowej, a następnie przechowywać ją w temperaturze pokojowej przez 2 godziny.
- Przeczytać informacje dotyczące bezpieczeństwa na stronie 10.
- Przeczytać wytyczne dotyczące postępowania z RNA (Załącznik A, strona 68).

- Upewnić się, że aparaty, takie jak pipety i wytrząsarka-inkubator, zostały sprawdzone i skalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.
- Wytrząsarka-inkubator jest używana w etapach 5 i 20. Ustawić temperaturę wytrząsarki-inkubatora na 55°C.
- Podczas przechowywania buforu do wiązania (BR2) może wytrącić się osad. W razie potrzeby ogrzać bufor do temperatury 37°C, aby rozpuścić osad.
- Bufor płuczący 2 (BR4) jest dostarczany w postaci koncentratu. Przed pierwszym użyciem dodać 4 objętości etanolu (96–100-procentowego, stopień czystości cz.d.a.), zgodnie z instrukcją na butelce, aby uzyskać roztwór roboczy.
- W przypadku używania zestawu RNase-Free DNase Set po raz pierwszy należy przygotować roztwór podstawowy DNazy I. Rozpuścić DNazę I w postaci stałej (RNFD; 1500 jednostek Kunitza)\* w 550 µl buforu do przygotowywania zawiesiny DNazy (DRB) dostarczonego z zestawem. Uważać, aby nie rozsypać DNazy I (RNFD) podczas otwierania fiolki. Nie wytrząsać zrekonstruowanej DNazy I (RNFD). DNaza I jest szczególnie wrażliwa na denaturację fizyczną. Mieszanie należy wykonywać jedynie poprzez delikatne odwracanie probówki.
- Aktualne dane wskazują, że zrekonstruowaną DNazę I (RNFD) można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 6 tygodni. W celu długoterminowego przechowywania DNazy I (RNFD) należy przenieść roztwór podstawowy ze szklanej fiolki, podzielić go na porcje przeznaczone do jednorazowego użytku (użyć probówek mikrowirówkowych [MCT] o pojemności 1,5 ml dostarczonych z zestawem; wystarczają one do przygotowania 5 porcji) i przechowywać w temperaturze –20°C przez maksymalnie 9 miesięcy. Rozmrożone porcje można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 6 tygodni. Rozmrożonych porcji nie należy zamrażać ponownie.
- Należy upewnić się, że podczas rekonstrukcji i rozdzielania na porcje roztworu DNazy I (RNFD) przestrzegane są wytyczne dotyczące postępowania z RNA (Załącznik A, strona 68).

\* Jednostki Kunitza to jednostki powszechnie stosowane do pomiaru DNazy I, definiowane jako ilość DNazy I, która powoduje wzrost wartości absorpcji  $A_{260}$  o 0,001 na minutę na mililitr w temperaturze 25°C, pH 5,0, przy stosowaniu wysoko spolimeryzowanego DNA jako substratu (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 i 363).

## Procedura

1. Wirować probówkę PAXgene Blood RNA Tube (BRT) przez 10 minut przy 3000–5000 x g, używając rotora wychylnego.



Aby zapewnić całkowitą lizę krwinek, należy upewnić się, że próbka krwi była inkubowana w probówce PAXgene Blood RNA Tube (BRT) przez co najmniej 2 godziny w temperaturze pokojowej (15–25°C).



W rotorze muszą znajdować się adaptory do probówek o okrągłym dnie. W przypadku użycia innych typów adapterów do probówek może dojść do pęknięcia probówek podczas wirowania.

2. Usunąć supernatant poprzez dekantację lub za pomocą pipety. Dodać 4 ml wody wolnej od RNaz (RNFW) do osadu, a następnie zamknąć probówkę, używając nowego dodatkowego zamknięcia BD Hemogard (dostarczone z zestawem).

W przypadku dekantacji supernatantu należy uważać, aby nie naruszyć osadu i należy osuszyć brzeg próbki czystym ręcznikiem papierowym.

3. Wytrząsać do momentu, gdy widoczne będzie rozpuszczenie osadu, a następnie wirować przez 10 minut przy 3000–5000 x g, używając rotora wychylnego. Usunąć i wyrzucić cały supernatant.

Niewielka ilość nierozpuszczonego osadu w supernatancie obecna po worteksowaniu, ale przed wirowaniem, nie zakłóci procedury.



Niecałkowite usunięcie supernatantu doprowadzi do inhibicji lizy i rozcieńczenia lizatu, co spowoduje zakłócenie warunków wiązania RNA do membrany PAXgene.

4. Dodać 350 µl buforu do przygotowywania zawiesiny (BR1) i wytrząsać do momentu, gdy widoczne będzie rozpuszczenie osadu.
5. Za pomocą pipety przenieść próbkę do próbki mikrowirówkowej (MCT) o pojemności 1,5 ml. Dodać 300 µl buforu do wiązania (BR2) i 40 µl proteinazy K (PK). Wymieszać, wytrząsając przez 5 sekund, a następnie inkubować przez 10 minut w temperaturze 55°C przy 400–1400 obr./min, używając wytrząsarki-inkubatora. Po inkubacji ustawić temperaturę wytrząsarki-inkubatora na 65°C (do etapu 20).



Nie mieszać buforu do wiązania (BR2) i proteiny K (PK) przed dodaniem ich do próbki.

6. Za pomocą pipety nanieść lizat na kolumnę wirówkową PAXgene Shredder (PSC; liliowa) umieszczoną w próbówce do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml, a następnie wirować przez 3 minuty przy maksymalnej prędkości (ale nie przekraczając siły odśrodkowej 20 000 x g).



Ostrożnie nanieść lizat na kolumnę wirówkową (PSC) za pomocą pipety, a następnie wzrokowo sprawdzić, czy cały lizat został przeniesiony na kolumnę wirówkową (PSC).

Aby uniknąć uszkodzenia kolumn (PSC) i próbek (PT), nie należy przekraczać siły odśrodkowej 20 000 x g.



Niektóre próbki mogą przepłynąć przez kolumnę wirówkową PAXgene Shredder (PSC) bez wirowania. Jest to spowodowane niską lepkością próbek i nie należy tego uznawać za oznakę nieprawidłowego działania produktu.

7. Ostrożnie przenieść cały supernatant frakcji, która przepłynęła przez kolumnę, do świeżej próbki mikrowirówkowej (MCT) o pojemności 1,5 ml, nie naruszając osadu w próbówce do przetwarzania.
8. Dodać 350 µl etanolu (96–100%, stopień czystości cz.d.a.). Wymieszać, wytrząsając, a następnie krótko odwirować (1–2 sekundy przy 500–1000 x g), aby usunąć krople z wnętrza wieczka.



Wirowanie nie może trwać dłużej niż 1–2 sekundy, gdyż mogłoby to doprowadzić do osadzenia kwasów nukleinowych i zmniejszenia uzysku całkowitego RNA.

9. Za pomocą pipety nanieść 700 µl próbki na kolumnę wirówkową PAXgene RNA (PRC; czerwona) umieszczoną w próbówce do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml, a następnie wirować przez 1 minutę przy 8000–20 000 x g. Umieścić kolumnę wirówkową (PRC) w nowej próbówce do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml i wyrzucić starą próbkę do przetwarzania (PT) zawierającą frakcję, która przepłynęła przez kolumnę.

10. Za pomocą pipety nanieść pozostałą objętość próbki na kolumnę wirówkową PAXgene RNA (PRC), a następnie wirować przez 1 minutę przy 8000–20 000 x g. Umieścić kolumnę wirówkową (PRC) w nowej probówce do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml i wyrzucić starą probówkę do przetwarzania (PT) zawierającą frakcję, która przepłynęła przez kolumnę.



Ostrożnie nanieść próbkę na kolumnę wirówkową (PRC) za pomocą pipety, a następnie wzrokowo sprawdzić, czy cała próbka została przeniesiona na kolumnę wirówkową (PRC).

11. Za pomocą pipety nanieść 350 µl buforu płuczącego 1 (BR3) na kolumnę wirówkową PAXgene RNA (PRC). Wirować przez 1 minutę przy 8000–20 000 x g. Umieścić kolumnę wirówkową (PRC) w nowej probówce do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml i wyrzucić starą probówkę do przetwarzania (PT) zawierającą frakcję, która przepłynęła przez kolumnę.

12. Dodać 10 µl roztworu podstawowego DNazy I (RNFD) do 70 µl buforu do trawienia DNA (RDD) w probówce mikrowirówkowej (MCT) o pojemności 1,5 ml. Wymieszać, delikatnie ostukując probówkę, a następnie krótko odwirować, aby zebrać pozostałości płynu ze ścianek próbki.

W przypadku przetwarzania, na przykład 10 próbek, dodać 100 µl roztworu podstawowego DNazy I (RNFD) do 700 µl buforu do trawienia DNA (RDD). Używać probówek mikrowirówkowych (MCT) o pojemności 1,5 ml dostarczonych z tym zestawem.



DNaza I jest szczególnie wrażliwa na denaturację fizyczną. Mieszanie należy wykonywać jedynie poprzez delikatne ostukiwanie próbki. Nie wytrząsać.

13. Za pomocą pipety nanieść mieszaninę inkubacyjną DNazy I (RNFD) (80 µl) bezpośrednio na membranę kolumny wirówkowej PAXgene RNA (PRC) i pozostawić na stole roboczym (20–30°C) na 15 minut.



Upewnić się, że mieszanina inkubacyjna DNazy I (RNFD) została naniesiona bezpośrednio na membranę. Trawienie DNaz będzie niecałkowite, jeśli część mieszaniny zostanie naniesiona na ścianki lub pierścień O-ring kolumny wirówkowej (PRC) i pozostanie na nim.

14. Za pomocą pipety nanieść 350 µl buforu płuczącego 1 (BR3) na kolumnę wirówkową PAXgene RNA (PRC), a następnie wirować przez 1 minutę przy 8000–20 000 x g. Umieścić kolumnę wirówkową (PRC) w nowej probówce do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml i wyrzucić starą probówkę do przetwarzania (PT) zawierającą frakcję, która przepłynęła przez kolumnę.
15. Za pomocą pipety nanieść 500 µl buforu płuczącego 2 (BR4) na kolumnę wirówkową PAXgene RNA (PRC), a następnie wirować przez 1 minutę przy 8000–20 000 x g. Umieścić kolumnę wirówkową (PRC) w nowej probówce do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml i wyrzucić starą probówkę do przetwarzania (PT) zawierającą frakcję, która przepłynęła przez kolumnę.



Bufor płuczący 2 (BR4) jest dostarczany w postaci koncentratu. Przed użyciem upewnić się, że do buforu płuczącego 2 (BR4) dodano etanol (patrz część „Czynności do wykonania przed rozpoczęciem”, strona 50).

16. Za pomocą pipety nanieść kolejne 500 µl buforu płuczącego 2 (BR4) na kolumnę wirówkową PAXgene RNA (PRC). Wirować przez 3 minuty przy 8000–20 000 x g.
17. Wyrzucić probówkę do przetwarzania (PT) zawierającą frakcję, która przepłynęła przez kolumnę, i umieścić kolumnę wirówkową PAXgene RNA (PRC) w nowej probówce do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml. Wirować przez 1 minutę przy 8000–20 000 x g.
18. Wyrzucić probówkę do przetwarzania (PT) zawierającą frakcję, która przepłynęła przez kolumnę. Umieścić kolumnę wirówkową PAXgene RNA (PRC) w probówce mikrowirówkowej (MCT) o pojemności 1,5 ml, a następnie za pomocą pipety nanieść 40 µl buforu do elucji (BR5) bezpośrednio na membranę kolumny wirówkowej PAXgene RNA (PRC). Wirować przez 1 minutę przy 8000–20 000 x g w celu elucji RNA. W celu osiągnięcia maksymalnej wydajności elucji istotne jest, aby zwiłżyć całą membranę buforem do elucji (BR5).
19. Powtórzyć etap elucji (etap 18) w opisany sposób, używając 40 µl buforu do elucji (BR5) i tej samej próbki mikrowirówkowej (MCT).
20. Inkubować eluat przez 5 minut w temperaturze 65°C w wyrzäsarce-inkubatorze (z etapu 5) bez wyrzäsania. Po inkubacji niezwłocznie schłodzić na lodzie.

Ta inkubacja w temperaturze 65°C powoduje denaturację RNA do dalszych zastosowań. Nie przekraczać czasu lub temperatury inkubacji.

21. Jeśli próbki RNA nie będą od razu wykorzystywane, należy przechowywać je w temperaturze –20°C lub –70°C.

Ze względu na to, że po cyklach zamrażania i rozmrażania RNA pozostaje w postaci zdenaturowanej, nie jest konieczne powtarzanie inkubacji w temperaturze 65°C. W przypadku używania próbek RNA w oznaczeniu diagnostycznym należy postępować zgodnie z instrukcjami dostarczonymi przez producenta.

W celu dokładnego oznaczenia ilościowego RNA poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm zalecamy rozcieńczenie próbek buforem Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5.\* Rozcieńczenie próbki w wodzie wolnej od RNaz może spowodować otrzymanie nieprawidłowo niskich wartości.

Wyzerować spektrofotometr za pomocą próby ślepej zawierającej bufor do elucji (BR5) i bufor Tris-HCl w takim samym stosunku jak w mierzonych próbkach. Bufor do elucji (BR5) charakteryzuje się wysoką absorbancją przy długości fali 220 nm, co, w przypadku nieprawidłowego wyzerowania spektrofotometru, może spowodować otrzymanie wysokiego poziomu absorbancji tła.

**Uwaga:** W celu oznaczenia ilościowego w buforze Tris-HCl należy skorzystać z następującej zależności

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ } \mu\text{g/ml}$ . Patrz Załącznik B, strona 69.

\* Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.



# Protokół: zautomatyzowane oczyszczanie całkowitego RNA z ludzkiej krwi pełnej pobranej do probówek PAXgene Blood RNA Tube (BRT)

## Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Upewnić się, że opakowanie zestawu jest nienaruszone i nieuszkodzone, a żaden z buforów nie wyciekł. Nie używać zestawu, który jest uszkodzony.
- Podczas używania pipety należy upewnić się, że nastawiono ją na odpowiednią objętość, a aspiracja i dozowanie płynu jest wykonywana ostrożnie — cała objętość płynu jest pobierana do pipety i wypuszczana z niej.
- Aby uniknąć przenoszenia próbek do nieprawidłowych probówek i sprzętu wykonanego z tworzywa sztucznego, należy upewnić się, że wszystkie probówki do przetwarzania (PT), probówki mikrowirówkowe (MCT) i adaptory rotora zostały prawidłowo opisane markerem permanentnym. Opisać wieczko i boczną część każdej probówki mikrowirówkowej (MCT), boczną część każdej probówki do przetwarzania (PT) i zewnętrzną ściankę każdego adaptera rotora.
- Rozlanie próbek i buforów podczas procedury może spowodować obniżenie uzysku i jakości RNA.
- Wszystkie etapy tego protokołu, w tym etapy wirowania, należy wykonywać w temperaturze pokojowej (15–25°C), o ile nie określono inaczej.

Z powodu czułości technologii amplifikacji kwasu nukleinowego podczas postępowania z próbkami konieczne jest podjęcie następujących środków ostrożności w celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego:

- Za pomocą pipety ostrożnie dodać próbkę na dno probówki do przetwarzania (PT), bez zamaczania brzegu probówki.
- Należy zawsze zmieniać końcówki pipet pomiędzy przenoszeniami płynów. Używać końcówek do pipet z barierą aerozolu.

- Unikać dotykania membrany kolumny wirówkowej (PRC, PSC) końcówką pipety.
- Po wytrząsaniu lub ogrzewaniu próbówki mikrowirówkowej (MCT) krótko odwirować kolumnę, aby usunąć krople z wnętrza wieczka.
- Nosić rękawiczki przez cały czas przeprowadzania procedury. W przypadku kontaktu rękawiczek z próbką natychmiast zmienić rękawiczki.

## Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Krew należy pobrać do próbek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zgodnie z instrukcjami zawartymi w dokumencie *PAXgene Blood RNA Tube — Instrukcja obsługi*. W razie potrzeby można zapoznać się z zaleceniami dotyczącymi postępowania z próbkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) przedstawionymi w Załączniku C (strona 71).
- Aby zapewnić całkowitą lizę krwinek, należy upewnić się, że po pobraniu krwi próbówki PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) są inkubowane przez co najmniej 2 godziny w temperaturze pokojowej. Inkubacja próbek PAXgene Blood RNA Tube (BRT) przez noc może spowodować zwiększenie uzysku. Jeśli po pobraniu krwi próbówka PAXgene Blood RNA Tube (BRT) była przechowywana w temperaturze 2–8°C, –20°C lub –70°C, przed rozpoczęciem procedury należy doprowadzić ją do temperatury pokojowej, a następnie przechowywać ją w temperaturze pokojowej przez 2 godziny.
- Przeczytać informacje dotyczące bezpieczeństwa na stronie 10.
- Przeczytać część „Ważne informacje”, strona 38.
- Przeczytać wytyczne dotyczące postępowania z RNA (Załącznik A, strona 68).
- Przeczytać dokument *QIAcube — Instrukcja obsługi* i wszelkie dodatkowe informacje dostarczone z aparatem QIAcube, przykładając szczególną uwagę do informacji dotyczących bezpieczeństwa.
- Należy dopilnować sprawdzenia, konserwacji i regularnej kalibracji zgodnie z zaleceniami producenta wszystkich urządzeń, takich jak pipety oraz analizator QIAcube.
- Podczas przechowywania buforu do wiązania (BR2) może wytrącić się osad. W razie potrzeby ogrzać bufor do temperatury 37°C, aby rozpuścić osad.
- Bufor płuczący 2 (BR4) jest dostarczany w postaci koncentratu. Przed pierwszym użyciem dodać 4 objętości etanolu (96–100-procentowego, stopień czystości cz.d.a.), zgodnie z instrukcją na butelce, aby uzyskać roztwór roboczy.

- W przypadku używania zestawu RNase-Free DNase Set po raz pierwszy należy przygotować roztwór podstawowy DNazy I. Rozpuścić DNazę I w postaci stałej (RNFD; 1500 jednostek Kunitza)\* w 550 µl buforu do przygotowywania zawiesiny DNazy (DRB) dostarczonego z zestawem. Uważać, aby nie rozsypać DNazy I (RNFD) podczas otwierania fiolki. Nie wytrząsać zrekonstruowanej DNazy I (RNFD). DNaza I jest szczególnie wrażliwa na denaturację fizyczną. Mieszanie należy wykonywać jedynie poprzez delikatne odwracanie probówki.
- Aktualne dane wskazują, że zrekonstruowaną DNazę I (RNFD) można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 6 tygodni. W celu długoterminowego przechowywania DNazy I (RNFD) należy przenieść roztwór podstawowy ze szklanej fiolki, podzielić go na porcje przeznaczone do jednorazowego użytku (użyć probówek mikrowirówkowych [MCT] o pojemności 1,5 ml dostarczonych z zestawem; wystarczają one do przygotowania 5 porcji) i przechowywać w temperaturze –20°C przez maksymalnie 9 miesięcy. Rozmrożone porcje można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 6 tygodni. Rozmrożonych porcji nie należy zamrażać ponownie.
- Należy upewnić się, że podczas rekonstrukcji i rozdzielania na porcje roztworu DNazy I (RNFD) przestrzegane są wytyczne dotyczące postępowania z RNA (Załącznik A, strona 68).
- Zamontować odpowiedni adapter wytrząsarki (dołączony z aparatem QIAcube; używać adaptera dla probówek z zabezpieczeniem typu safe-lock o pojemności 2 ml, oznaczony cyfrą „2”), a następnie umieścić statyw wytrząsarki na adapterze.
- Sprawdzić szufladę Waste (Odpady) i w razie potrzeby opróżnić ją.
- Zainstalować protokoły, jeśli nie wykonano tego wcześniej dla poprzednich cykli roboczych. Zainstalować oba protokoły „PAXgene Blood RNA Part A” (PAXgene Blood RNA — część A) i „PAXgene Blood RNA Part B” (PAXgene Blood RNA — część B). Patrz część „Instalowanie protokołów w aparacie QIAcube”, strona 38.

\* Jednostki Kunitza to jednostki powszechnie stosowane do pomiaru DNazy I, definiowane jako ilość DNazy I, która powoduje wzrost wartości absorpcji  $A_{260}$  o 0,001 na minutę na mililitr w temperaturze 25°C, pH 5,0, przy stosowaniu wysoko spolimeryzowanego DNA jako substratu (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 i 363).

## Procedura

1. Zamknąć drzwiczki aparatu QIAcube, a następnie włączyć aparat QIAcube, używając przełącznika zasilania (patrz Ryc. 15, strona 39).

Zostanie wyemitowany sygnał dźwiękowy i pojawi się ekran początkowy. Aparat automatycznie wykonuje testy inicjalizacji.

2. Otworzyć drzwiczki aparatu QIAcube, a następnie załadować wymagane odczytniki i sprzęt wykonany z tworzywa sztucznego do aparatu QIAcube. Patrz część „Ładowanie aparatu QIAcube”, strona 40.

W celu zaoszczędzenia czasu ładowanie można wykonywać podczas jednego lub obu 10-minutowych etapów wirowania (etapy 3 i 5) opisanych poniżej.

3. Wirować próbkę PAXgene Blood RNA Tube (BRT) przez 10 minut przy 3000–5000 x g, używając rotora wychylnego.



Aby zapewnić całkowitą liczę krwinek, należy upewnić się, że próbka krwi była inkubowana w próbówce PAXgene Blood RNA Tube (BRT) przez co najmniej 2 godziny w temperaturze pokojowej (15–25°C).



W rotorze muszą znajdować się adaptory do próbek o okrągłym dnie. W przypadku użycia innych typów adapterów do próbek może dojść do pęknięcia próbek podczas wirowania.

4. Usunąć supernatant poprzez dekantację lub za pomocą pipety. Dodać 4 ml wody wolnej od RNaz (RNFW) do osadu, a następnie zamknąć próbkę, używając nowego dodatkowego zamknięcia BD Hemogard (dostarczone z zestawem).

W przypadku dekantacji supernatantu należy uważać, aby nie naruszyć osadu i należy osuszyć brzeg próbki czystym ręcznikiem papierowym.

5. Wytrząsać do momentu, gdy widoczne będzie rozpuszczenie osadu, a następnie wirować przez 10 minut przy 3000–5000 x g, używając rotora wychylnego. Usunąć i wyrzucić cały supernatant.

Niewielka ilość nierozpuszczonego osadu w supernatancie obecna po worteksowaniu, ale przed wirowaniem, nie zakłóci procedury.



Niecałkowite usunięcie supernatantu doprowadzi do inhibicji lizy i rozcieńczenia lizatu, co spowoduje zakłócenie warunków wiązania RNA do membrany PAXgene.

6. Dodać 350 µl buforu do przygotowywania zawiesiny (BR1) i wytrząsać do momentu, gdy widoczne będzie rozpuszczenie osadu.
7. Za pomocą pipety przenieść próbkę do próbki do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml.



Używać próbek do przetwarzania (PT) o pojemności 2 ml dołączonych do zestawu PAXgene Blood RNA Kit.

8. Załadować otwarte próbki do przetwarzania (PT) zawierające próbki do wytrząsarki aparatu QIAcube (patrz Ryc. 17, strona 42). W celu ułatwienia ładowania ponumerowano pozycje próbek. Włożyć złącza statywu wytrząsarki (dołączone z aparatem QIAcube) do gniazd znajdujących się z boku statywu wytrząsarki, obok każdej próbki do przetwarzania. Umożliwia to detekcję próbek podczas kontroli załadowanych materiałów.



Należy upewnić się, że zamontowano odpowiedni adapter wytrząsarki (adapter wytrząsarki, próbki z zabezpieczeniem typu safe-lock o pojemności 2 ml, oznaczony cyfrą „2”, dołączony do aparatu QIAcube).



W przypadku przetwarzania mniej niż 12 próbek należy upewnić się, że statyw wytrząsarki załadowano w sposób przedstawiony na Ryc. 21, strona 46. Nie można przetwarzać jednej próbki lub 11 próbek.

9. Zamknąć drzwiczki aparatu QIAcube (patrz Ryc. 15, strona 39).
10. Wybrać protokół „PAXgene Blood RNA Part A” (PAXgene Blood RNA — część A) i uruchomić go.

Postępować zgodnie z instrukcjami wyświetlanymi na ekranie dotykowym aparatu QIAcube.



Upewnić się, że na aparacie QIAcube zainstalowano obie części programu (część A i część B) (patrz część „Instalowanie protokołów na aparacie QIAcube”, strona 38).



Aparat QIAcube wykona kontrole załadowanych materiałów dla próbek, końcówek do pipety, adapterów rotora i butelek na odczynniki.

11. Po ukończeniu protokołu „PAXgene Blood RNA Part A” (PAXgene Blood RNA — część A) należy otworzyć drzwiczki aparatu QIAcube (patrz Ryc. 15, strona 39). Wyciągnąć kolumny wirówkowe PAXgene RNA (PRC) z adapterów rotora i puste probówki do przetwarzania (PT) z wytrząsarki i wyrzucić je.



Podczas wykonywania programu aparat przenosi kolumny wirówkowe z pozycji 1 adaptera rotora (pozycja L1 wiezka) na pozycję 3 adaptera rotora (pozycja L2 wiezka) (patrz Ryc. 19, strona 44).

12. Zamknąć wiezka wszystkich probówek mikrowirówkowych (MCT) o pojemności 1,5 ml zawierających oczyszczony RNA w adapterach rotora (pozycja 3, pozycja L3 wiezka, patrz Ryc. 19, strona 44). Przenieść probówki mikrowirówkowe (MCT) o pojemności 1,5 ml do adaptera wytrząsarki aparatu QIAcube (patrz Ryc. 17, strona 42).
13. Zamknąć drzwiczki aparatu QIAcube (patrz Ryc. 15, strona 39).
14. Wybrać protokół „PAXgene Blood RNA Part B” (PAXgene Blood RNA — część B) i uruchomić go.

Postępować zgodnie z instrukcjami wyświetlanymi na ekranie dotykowym aparatu QIAcube.



W trakcie tego programu wykonywana jest inkubacja próbek w temperaturze 65°C, która powoduje denaturację RNA do dalszych zastosowań. Etapu tego nie należy pomijać nawet jeśli w dalszych zastosowaniach uwzględniony jest etap denaturacji cieplnej. Dostateczny stopień denaturacji RNA ma kluczowe znaczenie dla uzyskania maksymalnej wydajności w dalszych zastosowaniach.

15. Po ukończeniu programu „PAXgene Blood RNA Part B” (PAXgene Blood RNA — część B) należy otworzyć drzwiczki aparatu QIAcube (patrz Ryc. 15, strona 39). Niezwłocznie umieścić probówki mikrowirówkowe (MCT) zawierające oczyszczony RNA na lodzie.



**OSTRZEŻENIE:** Gorąca powierzchnia. Wytrząsarka może osiągnąć temperaturę do 70°C (158°F). Unikać kontaktu z gorącą powierzchnią.



Nie pozostawiać oczyszczonego RNA w aparacie QIAcube. Oczyszczone RNA może ulec rozkładowi, gdyż próbki nie są schłodzone. Z tego względu nie jest zalecane przeprowadzanie cykli przygotowań próbek przez noc, bez nadzoru.

16. Jeśli próbki RNA nie będą od razu wykorzystywane, należy przechowywać je w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  lub  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Ze względu na to, że po cyklach zamrażania i rozmrażania RNA pozostaje w postaci zdenaturowanej, nie jest konieczne powtarzanie protokołu inkubacji cieplnej („PAXgene Blood RNA Part B”) (PAXgene Blood RNA — część B). W przypadku używania próbek RNA w oznaczeniu diagnostycznym należy postępować zgodnie z instrukcjami dostarczonymi przez producenta.

W celu dokładnego oznaczenia ilościowego RNA poprzez absorbancję przy długości fali 260 nm zalecamy rozcieńczenie próbek buforem Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5. \* Rozcieńczenie próbki w wodzie wolnej od RNaz może spowodować otrzymanie nieprawidłowo niskich wartości.

Wyzerować spektrofotometr za pomocą próby ślepej zawierającej bufor do elucji (BR5) i bufor Tris-HCl w takim samym stosunku jak w mierzonych próbkach. Bufor do elucji (BR5) charakteryzuje się wysoką absorbancją przy długości fali 220 nm, co, w przypadku nieprawidłowego wyzerowania spektrofotometru, może spowodować otrzymanie wysokiego poziomu absorbancji tła.



W celu oznaczenia ilościowego w buforze Tris-HCl należy skorzystać z następującej zależności

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ } \mu\text{g/ml}$ . Patrz Załącznik B, strona 69.

\* Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

17. Wyciągnąć statyw na butelki na odczynniki ze stołu roboczego aparatu QIAcube (patrz Ryc. 17, strona 42), a następnie zamknąć wszystkie butelki odpowiednio oznaczonymi wieczkami. Bufory w butelkach można przechowywać w temperaturze pokojowej (15–25°C) przez maksymalnie 3 miesiące. Usunąć i wyrzucić pozostałe odczynniki znajdujące się w probówkach do przetwarzania (PT) w gniazdach na mikroprobówki QIAcube (patrz Ryc. 17, strona 42). Wyciągnąć adaptery rotora z wirówki i wyrzucić je (patrz Ryc. 17, strona 42). Opróżnić szufladę Waste (Odpady) aparatu QIAcube (patrz Ryc. 15, strona 39). Zamknąć drzwiczki aparatu QIAcube, a następnie wyłączyć aparat QIAcube, używając przełącznika zasilania (patrz Ryc. 15, strona 39).



# Rozwiązywanie problemów

Ta część instrukcji może przydać się w przypadku wystąpienia ewentualnych problemów. Aby uzyskać więcej informacji, należy także zapoznać się ze stroną często zadawanych pytań w witrynie naszego Centrum pomocy technicznej pod adresem: **[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx)**. Naukowcy z działu serwisu firmy QIAGEN chętnie odpowiedzą na wszelkie pytania dotyczące informacji i protokołów opisanych w niniejszej instrukcji obsługi, a także technologii próbek i testów (informacje kontaktowe znajdują się na ostatniej stronie lub pod adresem [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Komentarze i wskazówki

---

### RNA uległ rozkładowi

Zanieczyszczenie RNazami



Należy zachować ostrożność, aby podczas procedury lub dalszego postępowania nie wprowadzić RNaz do odczynników (patrz Załącznik A, strona 68).

### Niski uzysk RNA

a) Do próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pobrano mniej niż 2,5 ml krwi



Należy upewnić się, że do próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT; patrz *PAXgene Blood RNA Tube — Instrukcja obsługi*) pobrano 2,5 ml krwi.




b) Stężenie RNA zmierzono w wodzie




W celu dokładnego oznaczenia ilościowego RNA należy rozcieńczyć w buforze Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5\* (patrz Załącznik B, strona 69).

\* Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

## Komentarze i wskazówki

- c) Na etapie 9 i 10 protokołu ręcznego przeniesiono pozostałości komórek do probówek wirówkowych PAXgene RNA (PRC)  Należy unikać przenoszenia dużych cząstek podczas przenoszenia supernatantu za pomocą pipety na etapie 7 protokołu ręcznego (przeniesienie niewielkiej ilości osadu nie zakłóci procedury).
- d) Supernatant nie został całkowicie usunięty na etapie 3  Należy upewnić się, że usunięto cały supernatant. W przypadku dekantacji supernatantu należy usunąć krople z brzegu probówki PAXgene Blood RNA Tube (BRT), osuszając ją ręcznikiem papierowym. Należy podjąć odpowiednie środki ostrożności, aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego.
- e) Po pobraniu krwi do probówki PAXgene Blood RNA Tube (BRT) krew była inkubowana przez mniej niż 2 godziny  Po pobraniu krwi należy ją inkubować w probówce PAXgene Blood RNA Tube (BRT) przez co najmniej 2 godziny.

### Niska wartość $A_{260}/A_{280}$

- a) Do rozcieńczenia RNA w celu pomiaru stosunku  $A_{260}/A_{280}$  użyto wody  W celu rozcieńczenia RNA przed pomiarem czystości należy użyć buforu Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5 \* (patrz Załącznik B, strona 69).

\* 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.

## Komentarze i wskazówki

---

- b) Nieprawidłowe  
wyzerowanie  
spektrofotometru



Wyzerować spektrofotometr za pomocą próby ślepej zawierającej bufor do elucji (BR5) i bufor Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5, w takim samym stosunku jak w mierzonych próbkach. Bufor do elucji (BR5) charakteryzuje się wysoką absorbancją przy długości fali 220 nm, co, w przypadku nieprawidłowego wyzerowania spektrofotometru, może spowodować otrzymanie wysokiego poziomu absorbancji tła.

## Awaria aparatu

Nieprawidłowa obsługa  
aparatu QIAcube

Przeczytać dokument *QIAcube — Podręcznik użytkownika* (QIAcube User Manual), przykładając szczególną uwagę do sekcji „Rozwiązywanie problemów”. Upewnić się, że aparat QIAcube jest prawidłowo konserwowany, zgodnie z opisem w dokumencie *QIAcube — Podręcznik użytkownika*.

# Załącznik A: Ogólne uwagi dotyczące postępowania z RNA

## Postępowanie z RNA



Rybonukleazy (RNazy) są bardzo stabilnymi i aktywnymi enzymami, które na ogół nie wymagają kofaktorów do działania. Ponieważ RNazy trudno inaktywować i nawet bardzo małe ich ilości wystarczają do rozkładu RNA, nie wolno używać jakichkolwiek sprzętów wykonanych ze szkła lub z tworzywa sztucznego bez wcześniejszego wyeliminowania możliwego zanieczyszczenia RNazami. Należy zachować szczególną ostrożność, aby uniknąć przypadkowego wprowadzenia RNaz do próbki z RNA w trakcie trwania lub po zakończeniu procedury oczyszczania. Aby wytworzyć i zachować środowisko niezawierające RNaz, należy wdrożyć środki ostrożności na etapach obróbki wstępnej oraz stosowania jednorazowych i wielorazowych naczyń i roztworów podczas pracy z RNA.

## Ogólne postępowanie



Podczas pracy z RNA należy zawsze stosować prawidłową mikrobiologiczną technikę aseptyczną. Dłonie i części kurzu przenoszą bakterie i pleśń i są najczęstszymi źródłami zanieczyszczeń RNazami. Podczas postępowania z odczynnikami i próbkami RNA należy zawsze nosić lateksowe lub winylowe rękawiczki, aby uniknąć zanieczyszczenia RNazami z powierzchni skóry lub zakurzonych urządzeń laboratoryjnych. Rękawiczki należy często zmieniać, a próbki trzymać zamknięte, gdy tylko to możliwe. Podczas rozdzielania porcji do dalszych zastosowań za pomocą pipety należy trzymać oczyszczony RNA na lodzie.

Protokoły usuwania zanieczyszczeń RNazami ze sprzętów wykonanych ze szkła oraz roztworów można znaleźć w ogólnych wytycznych dotyczących metod biologii molekularnej, takich jak publikacja Sambrook, J. i Russella, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

# Załącznik B: Oznaczenie ilościowe i określenie jakości całkowitego RNA

## Oznaczenie ilościowe RNA

Stężenie RNA należy określić poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm ( $A_{260}$ ) w spektrofotometrze. Aby zagwarantować istotność wyniku, odczyty powinny mieścić się w zakresie liniowym spektrofotometru. Absorbancja równa 1 jednostce przy długości fali 260 nm odpowiada 44 µg RNA na ml ( $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$ ). Ta zależność jest ważna tylko w przypadku pomiarów w buforze Tris-HCl o stężeniu 10 mM,\* pH 7,5. Z tego względu, jeśli konieczne jest rozcieńczenie próbki RNA, należy ją rozcieńczyć w buforze Tris-HCl o stężeniu 10 mM. Zgodnie z poniższym omówieniem (patrz część „Czystość RNA”, strona 70) stosunek wartości absorbancji przy 260 i 280 nm zapewnia szacunkową ocenę czystości RNA. Podczas pomiaru próbek RNA należy być pewnym, że kuwety są wolne od RNaz. Wyzerować spektrofotometr za pomocą próby ślepej zawierającej bufor do elucji (BR5) i bufor Tris-HCl w takim samym stosunku jak w mierzonych próbkach. Bufor do elucji (BR5) charakteryzuje się wysoką absorbancją przy długości fali 220 nm, co, w przypadku nieprawidłowego wyzerowania spektrofotometru, może spowodować otrzymanie wysokiego poziomu absorbancji tła. Poniżej przedstawiono przykład obliczenia wykonywanego podczas oznaczenia ilościowego RNA.

Objętość próbki RNA	= 80 µl
Rozcieńczenie (1/15)	= 10 µl próbki RNA + 140 µl buforu Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5
Zmierzyć absorbancję rozcieńczonej próbki w kuwecie (wolnej od RNaz).	
$A_{260}$	= 0,3
Stężenie próbki	= $44 \times A_{260} \times \text{współczynnik rozcieńczenia}$ = $44 \times 0,3 \times 15$ = 198 µg/ml

\* Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

Całkowity uzysk                    = stężenie x objętość próbki w mililitrach  
    = 198 µg/ml x 0,08 ml  
    = 15,8 µg RNA

## Czystość RNA

Stosunek odczytów przy długości fali 260 nm i 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) udostępnia szacunkową wartość czystości RNA w odniesieniu do zanieczyszczeń, które charakteryzują się absorbancją światła ultrafioletowego (UV), takich jak białka. Jednakże, pH ma znaczący wpływ na stosunek  $A_{260}/A_{280}$ . Niższe pH prowadzi do uzyskania niższego stosunku  $A_{260}/A_{280}$  i zmniejszonej czułości na zanieczyszczenia białkowe.\* W celu uzyskania dokładnych wartości zalecamy wykonywanie pomiaru absorbancji w buforze Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5. Stosunek  $A_{260}/A_{280}$  czystego RNA w buforze Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 7,5, mieści się w zakresie 1,8–2,2. Wyzerować spektrofotometr za pomocą próby ślepej zawierającej bufor do elucji (BR5) i bufor Tris-HCl w takim samym stosunku jak w mierzonych próbkach. Bufor do elucji (BR5) charakteryzuje się wysoką absorbancją przy długości fali 220 nm, co, w przypadku nieprawidłowego wyzerowania spektrofotometru, może spowodować otrzymanie wysokiego poziomu absorbancji tła.

\* 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.

## Załącznik C: Postępowanie z próbkami PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



Poniższe zalecenia firmy BD mogą ułatwić postępowanie z próbkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Więcej informacji na temat próbek PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) zawiera dokument *PAXgene Blood RNA Tube — Instrukcja obsługi*.

### Instrukcje dotyczące zdejmowania zamknięcia Hemogard firmy BD

1. Chwycić próbkę PAXgene Blood RNA Tube (BRT) jedną ręką, kładąc kciuk pod zamknięciem BD Hemogard. (W celu zwiększenia stabilności położyć ramię na twardej powierzchni). Przekręcić zamknięcie BD Hemogard drugą ręką, jednocześnie naciskając kciukiem drugiej ręki w górę DO MOMENTU POLUZOWANIA KORKA PROBÓWKI.
2. Przed uniesieniem zamknięcia należy odsunąć kciuk. NIE NALEŻY używać kciuka do zepchnięcia zamknięcia z próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Przestroga: Jeśli próbka PAXgene Blood RNA Tube (BRT) zawiera krew, istnieje ryzyko narażenia na czynniki zakaźne. Aby uniknąć obrażeń podczas zdejmowania zamknięcia, istotne jest, aby odsunąć kciuk, który jest używany do naciskania zamknięcia w górę, od próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT) od razu po poluzowaniu zamknięcia BD Hemogard.
3. Zdjąć zamknięcie z próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT). W mało prawdopodobnym przypadku oddzielenia osłony wykonanej z tworzywa sztucznego od gumowego korka NIE NALEŻY PONOWNIE MONTOWAĆ ZAMKNIĘCIA. Ostrożnie zdjąć gumowy korek z próbki PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

## **Instrukcje dotyczące wkładania dodatkowego zamknięcia Hemogard firmy BD**

1. Wymienić zamknięcie probówki PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Przekręcić i mocno wciskać do momentu całkowitego osadzenia korka. Całkowite ponowne wprowadzenie korka jest kluczowe, aby zamknięcie pozostawało na swoim miejscu podczas postępowania z probówką PAXgene Blood RNA Tube (BRT).



# Informacje dotyczące zamawiania

Produkt	Spis treści	Nr kat.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 kolumn wirówkowych PAXgene, 50 kolumn wirówkowych Shredder, probówki do przetwarzania, DNaza I wolna od RNaz, odczynniki i bufony wolne od RNaz. Do użytku w połączeniu z probówkami PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 probówek do pobierania krwi	762165
<b>Powiązane produkty, które można zamówić w firmie QIAGEN</b>		
Starter Pack, QIAcube	Pakiet zawiera: statywy na butelki na odczynniki (3); paski do oznaczania statywów (8); końcówki z filtrem, 200 µl (1024); końcówki z filtrem, 1000 µl (1024); końcówki z filtrem, 1000 µl, duży otwór wylotowy (1024); butelki na odczynniki o pojemności 30 ml (18); adaptery rotora (240); uchwyt do adaptera rotora	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Jałowe, jednorazowe końcówki z filtrem, na statywie	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Butelki na odczynniki (30 ml) z wieczkami; pakiet po 6; do użytku ze statywem na butelki na odczynniki QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	Na 240 przygotowań: 240 jednorazowych adapterów rotora; do użytku z aparatem QIAcube	990394

Reagent Bottle Rack	Statyw mieszczący 6 butelek na odczynniki o pojemności 30 ml na stole roboczym aparatu QIAcube	990390
Rotor Adapter Holder	Uchwyt na 12 jednorazowych adapterów rotora; do użytku z aparatem QIAcube	990392

### **Powiązane produkty, które można zamówić w firmie BD\***

Blood Collection Set	Zestaw BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: igła 21G, 0,75 cala (0,8 x 19 mm), 12-calowy (305 mm) wężyk z adapterem typu luer; 50 na pudełko, 200 na opakowanie zbiorcze	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Opakowanie zbiorcze tylko dla średnicy 13 mm i 16 mm; 1000/opakowanie zbiorcze	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	Probówka do pobierania krwi 13 x 75 mm, pojemność 4,0 ml z czerwonym zamknięciem BD Hemogard i papierową etykietą; 100/pudełko, 1000/opakowanie zbiorcze	368975

\* Te produkty do pobierania krwi reprezentują typowe produkty, których można używać z probówkami PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Więcej informacji na temat tych akcesoriów, w tym sposób zamawiania, przedstawiono na stronie [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu firmy PreAnalytiX lub QIAGEN. Instrukcje obsługi i podręczniki firm PreAnalytiX i QIAGEN są dostępne w witrynie [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) i [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Można je także zamówić w serwisie technicznym firmy PreAnalytiX.

# Historia zmian w instrukcji

Dokument i wersja	Zmiany	Data
HB-0101-004, R2	Zmiany wprowadzone w celu spełnienia wymogów systemu GHS w całej treści dokumentu	Czerwiec 2015 r.
HB-0101-005, R3	Nowy szablon; zmiany w protokole zautomatyzowanym i danych dotyczących skuteczności; aktualizacja informacji dotyczących bezpieczeństwa w celu spełnienia wymogów systemu GHS; zmiany w szczegółach dotyczących aparatu oraz w oświadczeniu dotyczącym ograniczeń w zakresie stosowania produktu.	Luty 2019 r.
HB-0101-006, R3	Poprawiono nazwę zestawu w tabeli „Zawartość zestawu” na stronie 5.	Styczeń 2020 r.

## PreAnalytiX Worldwide

### Produkty firmy PreAnalytiX są dystrybuowane przez firmy QIAGEN i 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**

