

Январь 2020 г.

Руководство к PAXgene® Blood RNA Kit

Версия 2



50 (№ по каталогу 762174)

R3 **MAT** 1120409RU

REF

762174



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Произведено QIAGEN GmbH для PreAnalytiX

 **PreAnalytiX**
A QIAGEN / BD Company

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

PAXgene Blood RNA Kits продаются не во всех странах, за справочной информацией обращайтесь к представителю компании.

Ограниченное лицензионное соглашение

Использование настоящего продукта означает согласие покупателя или пользователя PAXgene Blood RNA Kit со следующими условиями:

1. PAXgene Blood RNA Kit подлежит использованию исключительно в соответствии с «Руководством к PAXgene Blood RNA Kit» и только с применением компонентов, входящих в набор. Компания PreAnalytiX не предоставляет лицензии в рамках своей интеллектуальной собственности на использование или объединение компонентов в составе настоящего набора с какими-либо компонентами, не входящими в настоящий набор, за исключением случаев, описанных в «Руководстве к PAXgene Blood RNA Kit», а также в дополнительных протоколах, доступных на веб-сайте по адресу: www.preanalytix.com.
2. Кроме официально заявленных лицензий, компания PreAnalytiX не предоставляет никаких гарантий того, что данный набор и/или его использование не нарушают прав третьих лиц.
3. Данный набор и его компоненты лицензированы для однократного использования и не подлежат повторному использованию, переработке или перепродаже.
4. Компания PreAnalytiX прямо отказывается от всех прочих лицензий, заявленных или подразумеваемых, кроме тех, о которых заявлено официально.
5. Покупатель и пользователь данного набора соглашаются не совершать и не допускать совершения другими лицами каких-либо действий, которые могут привести к любым действиям, запрещенным выше, или способствовать им.
6. Компания PreAnalytiX может требовать исполнения запретов, предусмотренных настоящим ограниченным лицензионным соглашением, в судебном порядке в любом суде и получать возмещение всех понесенных ею следственных и судебных издержек, включая стоимость юридических услуг, по любому иску, направленному на исполнение настоящего ограниченного лицензионного соглашения или любого из своих прав интеллектуальной собственности, связанных с набором и/или его компонентами.

Текущие условия лицензии см. на веб-сайте по адресу: www.preanalytix.com.

Условная продажа

К настоящему продукту прилагается лицензия по ряду патентных формул в рамках US-7,270,953, US-7,682,790, а также EP-1820793 B1 и зарубежных аналогов этих патентных формул на использование продукта для обработки комплекса нуклеиновых кислот, образующегося при заборе образцов в PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-006 BD-8945 1120409 © 2005–2020, PreAnalytiX GmbH, все права защищены.

PreAnalytiX Company

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Швейцария

www.preanalytix.com

Дистрибьюторы PreAnalytiX

Продукция PreAnalytiX производится для PreAnalytiX компанией QIAGEN или BD и распространяется для PreAnalytiX компанией QIAGEN или BD. Продукцию нельзя заказать у PreAnalytiX GmbH.


Контактную информацию регионального дистрибьютора PreAnalytiX см. на последней странице.

Комплектация

| | |
|---|----|
| Комплектация набора..... | 5 |
| Обозначения | 6 |
| Условия хранения..... | 7 |
| Назначение | 8 |
| Ограничения на использование продукта..... | 8 |
| Контроль качества | 9 |
| Техническая поддержка | 9 |
| Информация по технике безопасности | 9 |
| Введение | 13 |
| Принцип действия и порядок работы..... | 13 |
| Забор и стабилизация образцов | 14 |
| Концентрирование и очистка РНК..... | 19 |
| Ручное выделение РНК..... | 19 |
| Автоматизированное выделение РНК | 30 |
| Оборудование и реагенты, обеспечиваемые пользователем..... | 37 |
| Важные примечания | 39 |
| Работа с QIAcube | 39 |
| Запуск QIAcube | 39 |
| Установка протоколов на QIAcube | 39 |
| Загрузка QIAcube..... | 41 |
| Протокол: ручное выделение тотальной РНК из цельной крови человека, собранной в PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)..... | 50 |

| | |
|--|----|
| Протокол: автоматическое выделение тотальной РНК из цельной крови человека, собранной в PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)..... | 59 |
| Руководство по поиску и устранению неполадок..... | 68 |
| Приложение А: Общие замечания о работе с РНК..... | 71 |
| Приложение В: Количественный анализ и определение качества тотальной РНК..... | 73 |
| Приложение С: Обращение с PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) | 75 |
| Информация для заказа..... | 77 |
| История изменения руководства..... | 79 |

Комплектация набора

| PAXgene Blood RNA Kit | | | (50) |
|---------------------------------------|---|---|----------------------------------|
| № по каталогу | | | 762174 |
| Количество образцов для приготовления | | | 50 |
| BR1 | Resuspension Buffer (буфер для ресуспендирования) | RES BUF | 20 мл |
| BR2 | Binding Buffer* (связывающий буфер) | BIND BUF | 18 мл |
| BR3 | Wash Buffer 1* (отмывочный буфер 1) | WASH BUF 1 | 45 мл |
| BR4 | Wash Buffer 2 (concentrate) [†] (отмывочный буфер 2 [концентрат]) | WASH BUF 2 CONC | 11 мл |
| BR5 | Elution Buffer (элюирующий буфер) | ELU BUF | 6 мл |
| RNFW | RNase-Free Water (bottle) (вода, очищенная от РНКаз [флакон]) | PEL WASH | 2 × 125 мл |
| PK | Proteinase K (green lid) (протеиназа К [зеленая крышка]) | PROTK | 2 × 1,4 мл |
| PRC | PAXgene RNA Spin Columns (red) (спин-колонки PAXgene RNA [красного цвета]) | PAXgene RNA COL | 5 × 10 |
| PT | Processing Tubes (2 ml) (пробирки для обработки [2 мл]) | PROC TUBE | 6 × 50 |
| Hemogard | Hemogard™ Closures (крышки Hemogard™ Closures) | SEC CLOS | 50 |
| MCT | Microcentrifuge Tubes (1.5 ml) (микроцентрифужные пробирки [1,5 мл]) | MIC TUBE | 3 × 50, 1 × 10 |
| RNFD | DNase I, RNase-free (lyophilized) (ДНКазы I, свободная от РНКаз [лиофилизированная]) | DNA REM | 1500 единиц Кунитца [‡] |
| RDD | DNA Digestion Buffer (white lid) (буфер для гидролиза ДНК [белая крышка]) | DNA DIG BUF | 2 × 2 мл |
| DRB | DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (Буфер для ресуспендирования ДНКазы [пробирка, сиреневая крышка]) | DNase RES BUF | 2 мл |
| PSC | PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (спин-колонки PAXgene Shredder [сиреневого цвета]) | PAXgene SHRED COL | 5 × 10 |
| Руководство | Руководство к PAXgene Blood RNA Kit (редакция 2) |  | 1 |

*Несовместимо с дезинфицирующими средствами, содержащими отбеливающий компонент. Содержит гуанидиновую соль. Информацию о безопасности см. на стр. 9.

[†] Wash Buffer 2 (BR4) поставляется в виде концентрата. Перед первым использованием добавьте 4 объема этилового спирта (96–100 %, степень чистоты: ч.д.а.), как указано на флаконе, для получения рабочего раствора.

[‡] Единицы Кунитца — это единицы, широко используемые для измерения количества ДНКазы I. Одна единица Кунитца определяется как количество ДНКазы I, вызывающее увеличение количества A_{260} на 0,001 в минуту на миллилитр при 25 °C, pH 5,0, при использовании в качестве субстрата высокополимеризированной ДНК (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 и 363).

Обозначения



Содержит реагенты для <N> процедур анализа



Обратитесь к инструкции по применению



Срок годности



Изделие медицинского назначения для диагностики in vitro



Номер по каталогу



Номер партии



Номер материала



Компоненты



Номер



Стерилизация облучением



Единицы Кунитца



Добавление



Содержит



Восстановлено



Дезоксирибонуклеаза I



Этиловый спирт



Гуанидина изотиоцианат

RNase-Free DNase Set

Набор с ДНКазой, свободной от РНКаз

GTIN

Глобальный идентификационный номер единицы товара



Не использовать повторно



Ограничение по температуре



Верхний предел температуры



Изготовитель



Важное примечание



После добавления во флакон этилового спирта запишите текущую дату



После доставки



Влечет за собой

Условия хранения

Спин-колонки PAXgene RNA spin column (PRC), спин-колонки PAXgene Shredder spin column (PSC), протеиназа К (ПК, Proteinase K) и буферы (BR1, BR2, BR3, BR4 и BR5) хранят в сухом месте при температуре, указанной на этикетке набора.

Набор с ДНКазой, свободной от РНКаз, содержащий ДНКазу I (RNFD, DNase I), буфер для гидролиза ДНК (RDD, DNA digestion buffer) и буфер для ресуспендирования ДНКазы (DRB, DNase resuspension buffer) поставляются при температуре окружающей среды. Сразу по получении поместите все компоненты набора с ДНКазой, свободной от РНКаз, на хранение при температуре, указанной на этикетке. При надлежащем хранении набор сохраняет стабильность до даты истечения срока годности, указанной на коробке комплекта.

Назначение

PAXgene Blood RNA Kit предназначен для выделения внутриклеточной РНК из цельной крови, собранной в PAXgene Blood RNA Tube (BRT). При использовании набора в сочетании с PAXgene Blood RNA Tube (BRT) система обеспечивает выделение внутриклеточной РНК из цельной крови для RT-PCR в рамках молекулярного диагностического анализа. Об использовании PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) см. в *Руководстве к PAXgene Blood RNA Tube*.

Рабочие характеристики системы PAXgene Blood RNA определены только применительно к транскриптам генов FOS и IL1B. Пользователь отвечает за определение надлежащих рабочих характеристик системы PAXgene Blood RNA применительно к другим целевым транскриптам.

Ограничения на использование продукта

PAXgene Blood RNA Kit предназначен для выделения внутриклеточной РНК из цельной крови человека ($4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$ лейкоцитов/мл) с целью проведения диагностики *in vitro*. Он не предназначен для выделения из цельной крови человека геномной ДНК или вирусных нуклеиновых кислот. Поскольку применительно к техническим требованиям по стабилизации валидировано ограниченное количество транскриптов (транскрипты генов FOS и IL1B), рабочие характеристики для всех транскриптов не определены. Персонал лаборатории должен ознакомиться с данными производителя и собственными данными, чтобы определить необходимость валидации для других транскриптов.

Продукт предназначен для применения профессиональными пользователями, напр. лаборантами и врачами, обученными проведению диагностических процедур анализа *in vitro*.

Контроль качества

В рамках сертифицированной по ISO системы управления качеством компании QIAGEN каждая партия PAXgene Blood RNA Kit проходит проверку на соответствие определенным параметрам в целях обеспечения стабильного качества продукции.

Техническая поддержка

Компания QIAGEN гордится качеством и оперативностью своей технической поддержки. В подразделениях нашей технической службы работают опытные специалисты, обладающие обширными практическими и теоретическими знаниями в области молекулярной биологии и применения продукции PreAnalytiX. Если у вас возникнут вопросы о PAXgene Blood RNA Kit, обязательно обращайтесь к нам.

За технической поддержкой и дополнительной информацией обращайтесь в техническую службу QIAGEN по телефону.

Информация по технике безопасности

При работе с химическими веществами обязательно надевайте соответствующие халат, одноразовые перчатки и защитные очки.

Во избежание инфицирования (напр., ВИЧ или вирусом гепатита В), а также травм при работе с биологическими и химическими материалами всегда надевайте соответствующие халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Дополнительную информацию см. в соответствующих паспортах безопасности (ПБ). ПБ для данного набора можно найти, просмотреть и распечатать в интернете по адресу **www.preanalytix.com**, где они размещены в удобном и компактном формате PDF.

ВНИМАНИЕ!

НЕ добавляйте отбеливающие вещества и кислые растворы непосредственно в отходы, образовавшиеся в результате приготовления образцов.

Буфер для связывания (BR2) и wash buffer 1 (BR3) содержат гуанидина тиоцианат, который в сочетании с отбеливающими агентами может образовывать высокоактивные соединения. В случае проливания буфера для связывания (BR2) и wash buffer 1 (BR3) очистите загрязненную поверхность водным раствором подходящего лабораторного моющего средства. В случае проливания жидкости, содержащей потенциальные возбудители инфекции, вымойте загрязненный участок сначала водным раствором лабораторного моющего средства, а затем 1 % (об/об) раствором гипохлорита натрия.

Для дезинфекции смеси раствора, стабилизирующего РНК, и крови из PAXgene Blood RNA Tube (BRT) возьмите 1 объем раствора отбеливателя, имеющегося в продаже (5 % гипохлорита натрия), на 9 объемов смеси раствора, стабилизирующего РНК, и крови.

Отходы, образовавшиеся в результате приготовления образцов, например супернатанты, образовавшиеся на этапах центрифугирования в ходе процедуры выделения РНК, следует считать потенциально инфекционными материалами. Перед утилизацией отходы необходимо автоклавировать или сжигать для уничтожения всех инфекционных материалов. Утилизация должна осуществляться в соответствии с официальными инструкциями.

Следующие заявления об опасных факторах и мерах предосторожности относятся к компонентам PAXgene Blood RNA Kit. Информацию по технике безопасности при работе с PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) см. в *Руководстве к PAXgene Blood RNA Tube*.

Буфер BR2



Содержит: гуанидина тиоцианат. Опасно! Не допускать проглатывания! Может представлять опасность при контакте с кожей или вдыхании. Вызывает серьезные повреждения глаз. Наносит вред водной флоре и фауне с длительными неблагоприятными последствиями. При контакте с кислотами высвобождается высокотоксичный газ. Следует надевать соответствующую защитную одежду, защитные перчатки и средства защиты для глаз/лица. ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Промывать проточной водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если они имеются и если это легко сделать. Немедленно обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу.

Буфер BR3



Содержит: этиловый спирт, гуанидина тиоцианат. Опасно! Легковоспламеняющиеся жидкость и пары. Вызывает серьезные повреждения глаз. При контакте с кислотами высвобождается высокотоксичный газ. Держать вдали от источников тепла/искр/открытого пламени/горячих поверхностей. Не курить. Следует надевать соответствующую защитную одежду, защитные перчатки и средства защиты для глаз/лица. ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Промывать проточной водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если они имеются и если это легко сделать. Немедленно обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу.

ДНКаза I



Содержит: ДНКазу. Опасно! Может вызывать кожные аллергические реакции. При вдыхании может вызывать аллергию, проявления астмы или затруднения дыхания. Не допускайте вдыхания пыли/дыма/газа/аэрозоля/паров/распыленного раствора. Следует надевать соответствующую защитную одежду, защитные перчатки и средства защиты для глаз/лица. Используйте средства защиты дыхательных путей. В случае воздействия или подозрения на воздействие: обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу. Вынести пострадавшего на свежий воздух и обеспечить ему покой и свободу дыхания.

Протеиназа К



Содержит: протеиназу К. Опасно! Вызывает легкое раздражение кожи. При вдыхании может вызывать аллергию, проявления астмы или затруднения дыхания. Не допускайте вдыхания пыли/дыма/газа/аэрозоля/паров/распыленного раствора. Следует надевать соответствующую защитную одежду, защитные перчатки и средства защиты для глаз/лица. Используйте средства защиты дыхательных путей. В случае воздействия или подозрения на воздействие: обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу. Вынести пострадавшего на свежий воздух и обеспечить ему покой и свободу дыхания.

Введение

Сбор цельной крови является первым этапом многих процедур молекулярного анализа, проводимый для исследования клеточной РНК. Однако главной проблемой при проведении таких процедур является нестабильность профиля клеточной РНК *in vitro*. Исследования, проведенные в PreAnalytiX, показали, что количества копий отдельных видов мРНК в цельной крови могут изменяться более чем в 1000 раз при хранении или транспортировке при комнатной температуре.* Это обусловлена как быстрой деградацией РНК, так и индуцированной экспрессией определенных генов после забора крови. Такие изменения профиля экспрессии РНК делают невозможным достоверный анализ экспрессии генов. В связи с этим для точного анализа экспрессии генов в цельной крови человека необходимо метод сохранения профиля экспрессии РНК во время и после флеботомии.

Принцип действия и порядок работы

Компания PreAnalytiX разработала новую систему, обеспечивающую сбор, стабилизацию, хранение и транспортировку образцов цельной крови человека, в сочетании с протоколом быстрого и эффективного выделения внутриклеточной РНК. Эта система требует использования PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; патенты США 6 602 718 и 6 617 170) для забора крови и стабилизации РНК с последующим ручным либо автоматизированным выделением РНК с помощью PAXgene Blood RNA Kit. Протоколы для ручной и автоматизированной процедур обеспечивают вполне эквивалентную эффективность в отношении качества и выхода РНК. Данные о характеристиках качества для протоколов ручной (стр. 22–30) и автоматизированной (стр. 34–36) процедур включены в настоящее руководство.

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

Забор и стабилизация образцов

PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) содержат фирменный набор реагентов, состав которого основан на запатентованной технологии стабилизации РНК. Этот набор реагентов защищает молекулы РНК от деградации под действием РНКаз и сводит к минимуму изменения экспрессии генов *ex vivo*. PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) предназначены для сбора цельной крови человека и стабилизации клеточной РНК в течение не более 3 суток при температуре 18–25 °С (рис. 1 и 2, стр. 15 и 16) либо не более 5 суток при температуре 2–8 °С (рис. 3 и 4, стр. 17 и 18). Данные, имеющиеся на текущий момент, свидетельствуют о стабилизации клеточной ДНК минимум на 11 лет при температуре –20 °С либо –70 °С*. Подробнее о текущих исследованиях по оценке стабильности в течение более длительных периодов времени обращайтесь в техническую службу QIAGEN.

Фактическое время стабилизации РНК может варьироваться в зависимости от вида клеточной РНК и последующих процедур. Поскольку применительно к техническим требованиям по стабилизации валидировано ограниченное количество транскриптов (транскрипты генов FOS и IL1B), рабочие характеристики для всех транскриптов не определены. Персонал лаборатории должен ознакомиться с данными производителя и собственными данными, чтобы определить необходимость валидации для других транскриптов.

* В настоящее время проводится долгосрочное исследование хранения крови в PAXgene Blood RNA Tubes.

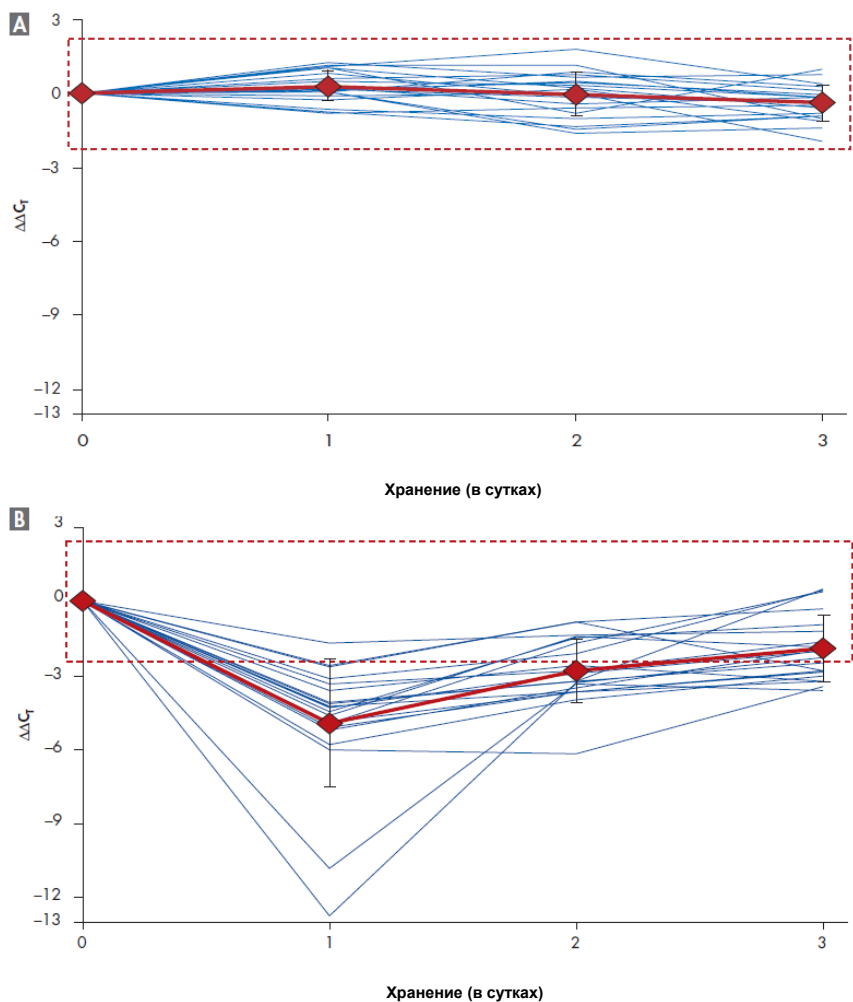


Рис. 1. Стабильность РНК в образцах крови при температуре 18–25 °С: FOS. Кровь бралась у 10 доноров с созданием дубликата образца и хранилась при температуре 18–25 °С в течение указанного количества дней, после чего выполнялось выделение totalной РНК. **[А]** Кровь собиралась в PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) и хранилась в них, а выделение totalной РНК осуществлялось с использованием PAXgene Blood RNA Kit. **[Б]** Кровь собиралась в стандартные пробирки для забора крови с ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранилась в таких пробирках, а выделение totalной РНК осуществлялось стандартным органическим методом экстракции с очисткой на кремнезёмной мембране. Относительные уровни транскрипции FOS определялись методом real-time, duplex RT-PCR с использованием в качестве внутреннего стандарта 18S-rРНК. На график нанесены значения для всех образцов и показаны средние значения и стандартные отклонения для всех образцов. Пунктирными линиями показана $\pm 3\sigma$ общая погрешность анализа ($2,34 C_T$).

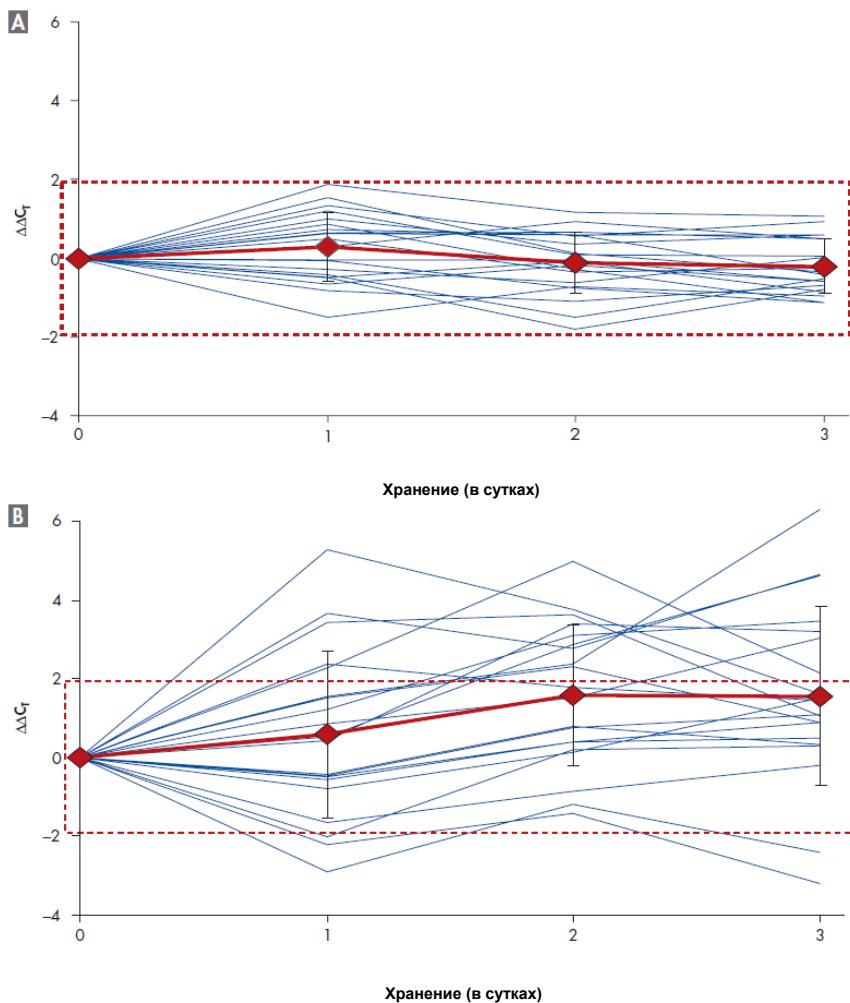


Рис. 2. Стабильность РНК в образцах крови при температуре 18–25 °С: IL1B. Забор крови и выделение totalной РНК, после хранения при температуре 18–25 °С, осуществлялись, как показано на рис. 1. Относительные уровни транскрипции IL1B определялись методом real-time, duplex RT-PCR с использованием в качестве внутреннего стандарта 18S-pРНК. На график нанесены значения для всех образцов и показаны средние значения и стандартные отклонения для всех образцов. Пунктирными линиями показана $\pm 3\sigma$ общая погрешность анализа ($1,93 C_T$).

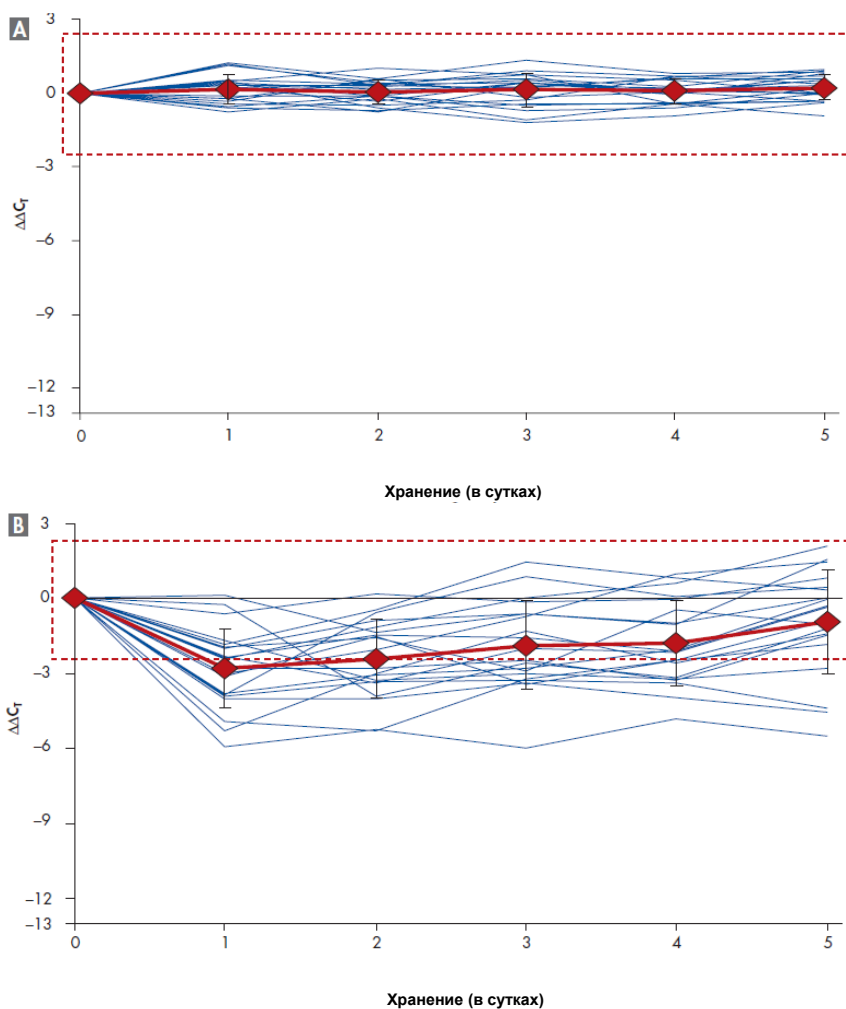


Рис. 3. Стабильность РНК в образцах крови при температуре 2-8°C: FOS. Кровь бралась у 10 доноров с созданием дубликата образца и хранилась при температуре 2-8°C в течение указанного количества дней, после чего выполнялось выделение totalной РНК. **[А]** Кровь собиралась в PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) и хранилась в них, а выделение totalной РНК осуществлялось с использованием PAXgene Blood RNA Kit. **[Б]** Кровь собиралась в стандартные пробирки для забора крови с ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранилась в таких пробирках, а выделение totalной РНК осуществлялось стандартным органическим методом экстракции с очисткой на кремнеземной мембране. Относительные уровни транскрипции FOS определялись методом real-time, duplex RT-PCR с использованием в качестве внутреннего стандарта 18S-pPHK. На график нанесены значения для всех образцов и показаны средние значения и стандартные отклонения для всех образцов. Пунктирными линиями показана $\pm 3x$ общая погрешность анализа ($2,34 C_T$).

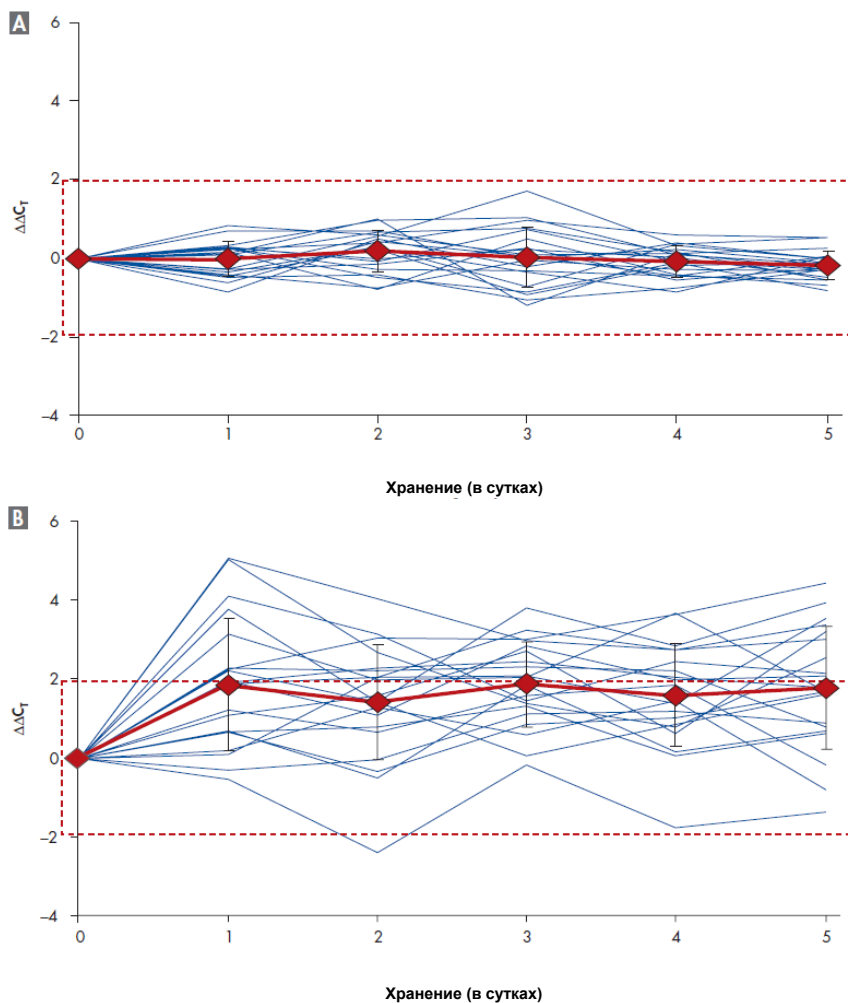


Рис. 4. Стабильность РНК в образцах крови при температуре 2-8°C: IL1B. Забор крови и выделение totalной РНК, после хранения при температуре 2-8°C, осуществлялись, как показано на рис. 3. Относительные уровни транскрипции IL1B определялись методом real-time, duplex RT-PCR с использованием в качестве внутреннего стандарта 18S-rРНК. На график нанесены значения для всех образцов и показаны средние значения и стандартные отклонения для всех образцов. Пунктирными линиями показана $\pm 3x$ общая погрешность анализа ($1.93 C_t$).

Концентрирование и очистка РНК

PAXgene Blood RNA Kit предназначен для выделения тотальной РНК из 2,5 мл цельной крови человека, собранной в PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Эта процедура проста и может выполняться вручную либо автоматизированно (см. рис. 5 и 10, стр. 20 и 31). В рамках обоих протоколов выделение РНК начинается с этапа центрифугирования с целью осаждения нуклеиновых кислот в PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Осадок отмывают и ресуспендируют, после чего осуществляется ручное либо автоматизированное выделение РНК. В принципе оба протокола состоят из одних и тех же этапов работы с одними и теми же компонентами набора.

Ручное выделение РНК

Более конкретно, ресуспендированный осадок инкубируют в оптимизированных буферах с протеиназой К (PK, Proteinase K) для гидролиза белков. Выполняют дополнительное центрифугирование через спин-колонку PAXgene Shredder spin column (PSC) для гомогенизации клеточного лизата и удаления остаточного клеточного дебриса, и супернатант проточной фракции переносят в новую микроцентрифужную пробирку. Для коррекции условий связывания добавляют этиловый спирт, и лизат наносят на спин-колонку PAXgene RNA spin column (PRC). Во время кратковременного центрифугирования РНК селективно связывается на кремнеземной мембране PAXgene, тогда как примеси проходят через нее. Остатки примесей удаляются на последующих нескольких этапах эффективной отмывки. Между первым и вторым этапами отмывки мембрану обрабатывают ДНКазой I (RNFD, DNase I) для удаления следов связанной ДНК. После этапов отмывки РНК элюируется в элюирующем буфере (BR5) и денатурируется нагреванием.

Тотальная РНК, выделенная с использованием системы PAXgene Blood RNA, является чистой. При использовании протокола ручной процедуры значения A_{260}/A_{280} находятся в диапазоне от 1,8 до 2,2 и ≤ 1 % (массовая доля) геномной ДНК присутствует в ≥ 95 % всех образцов, как показывают данные измерений методом количественной real-time PCR применительно к последовательности гена бета-актина. Не менее чем в 95 % образцов не наблюдается ингибирования RT-PCR при использовании до 30 % элюата.

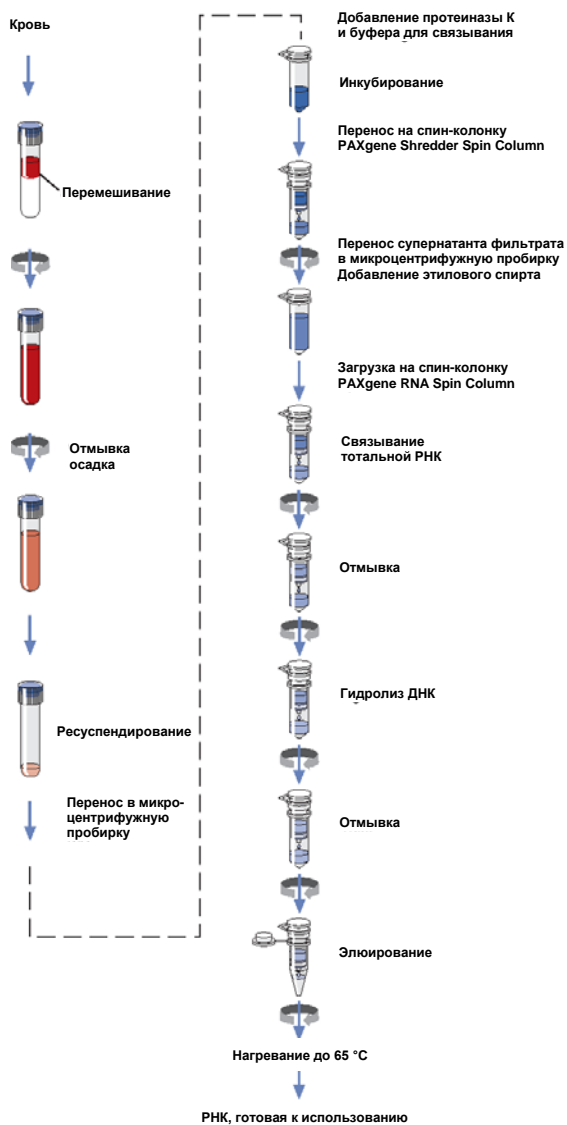


Рис. 5. Ручная процедура PAXgene Blood RNA.

При использовании протокола ручной процедуры среднее время приготовления образцов (по данным о циклах приготовления 12 образцов) составляет приблизительно 90 минут*, причем требуется лишь 40 минут рабочего времени оператора. Выход РНК из 2,5 мл цельной крови здорового человека составляет ≥ 3 мкг для ≥ 95 % обработанных образцов. Поскольку выход в большой степени зависит от донора, он может быть разным в каждом конкретном случае. Для отдельных доноров система PAXgene Blood RNA обеспечивает выход, характеризующийся высокой воспроизводимостью и повторяемостью (рис. 6 и 7, стр. 22 и 23), а также высокую воспроизводимую и повторяемую результатов RT-PCR (рис. 8 и 9, стр. 28 и 29) и, таким образом, является очень надежным средством клинического диагностического анализа.

На рис. 6 (стр. 22) показаны параметры общей повторяемости и воспроизводимости для системы PAXgene Blood RNA. Проводились дополнительные исследования с целью изучения влияния особенностей разных партий PAXgene Blood RNA kit и разных операторов на воспроизводимость выхода РНК и качества real time RT-PCR. Поскольку для этих исследований использовались образцы из пулов крови, а не в индивидуальных PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), полученные результаты не отражают показателей воспроизводимости системы, в том числе колебаний от одного забора крови к другому,— отражена лишь повторяемость применительно к приготовлению образцов (см. рис. 7, стр. 23).

* Общее время выполнения протокола включая предварительную обработку PAXgene Blood RNA Tubes (процедуры центрифугирования, отмывки осадка и ресуспендирования осадка).

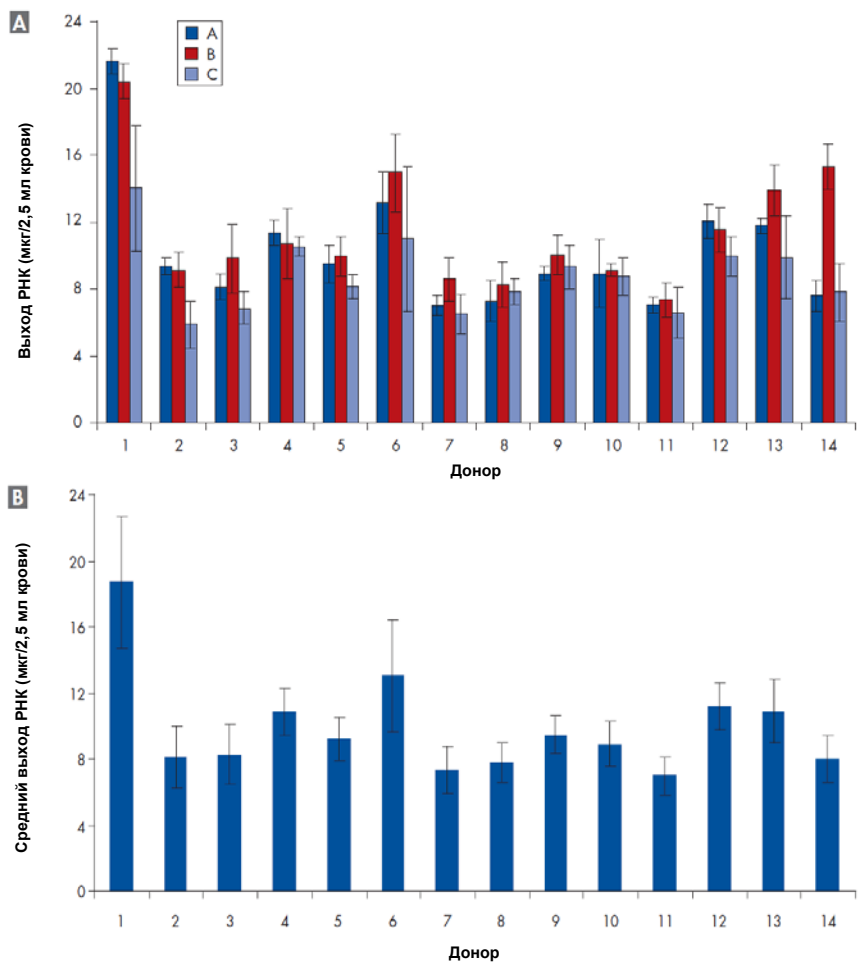


Рис. 6. Воспроизводимость и повторяемость результатов выделения РНК. Образцы крови от 14 доноров в четырех повторностях обрабатывались вручную каждым из 3 лаборантов (А, В, С). Использовалось три набора оборудования, и все образцы, приготовленные одним и тем же лаборантом, обрабатывались на одном и том же оборудовании. **[А]** Показаны средние значения и стандартные отклонения для выхода РНК применительно к репликатам образцов от одних и тех же доноров, обработанных разными лаборантами. **[В]** Двенадцать репликатов образцов крови от каждого из 14 доноров обрабатывались 3 лаборантами. Представлены средние значения и стандартные отклонения для выхода РНК применительно к образцам от одних и тех же доноров, обработанных всеми лаборантами. Для всех образцов РНК соотношения A_{260}/A_{280} варьировались в диапазоне от 1,8 до 2,2.

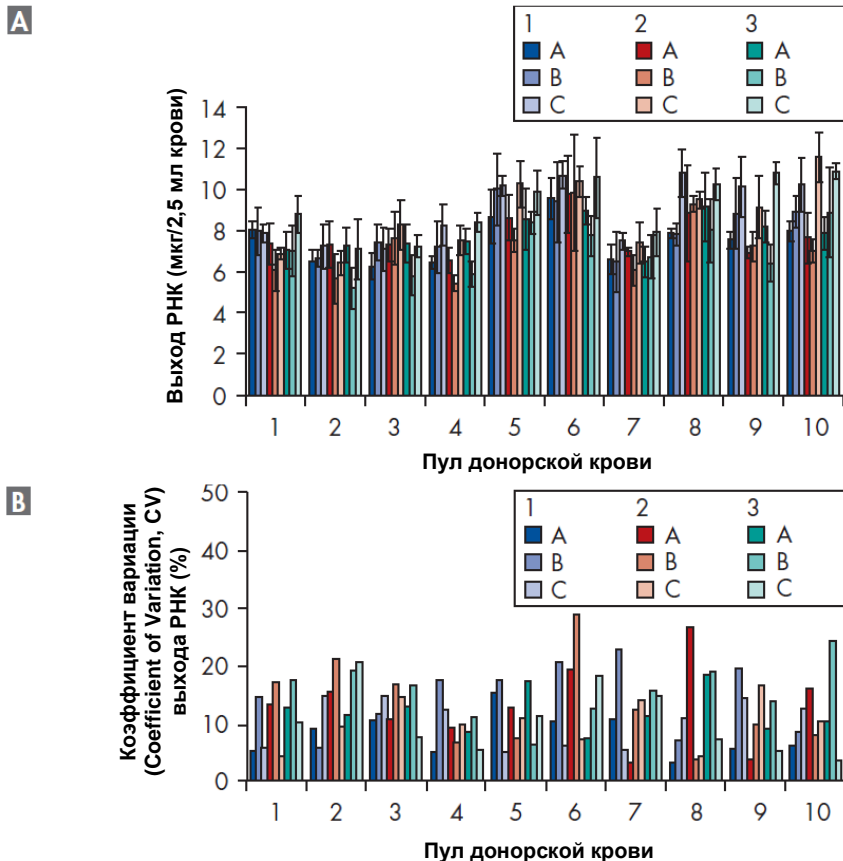


Рис. 7. Повторяемость и воспроизводимость выхода РНК для разных операторов и партий PAXgene Blood RNA Kit при использовании образцов смешанной крови от нескольких доноров. Образцы крови от 30 разных доноров собирались в PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; по 12 пробирок на одного донора, всего 360 пробирок). Содержимое пробирок от 3 доноров смешивалось и затем повторно аликвотировалось на 36 проб. Эти 36 проб на каждый пул крови от 3 доноров обрабатывались вручную 3 операторами. Каждый оператор использовал для экстракции 3 разных партии PAXgene Blood RNA Kit и обрабатывал пробы из каждого из 10 пулов донорской крови в четырех повторностях. **[А]** Выход РНК и стандартное отклонение для каждого сочетания оператора и партии. Пробы крови из 10 пулов донорской крови в четырех повторностях обрабатывались 3 операторами (А, В, С) с использованием наборов из каждой из 3 партий (1, 2, 3). Представлены средние значения выхода (столбцы) и стандартные отклонения («усы» погрешности) для каждой из четырех параллельных проб из одного и того же пула донорской крови применительно к разным операторам и разным партиям наборов. **[В]** Коэффициент вариации (Coefficient of Variation, CV) выхода РНК на каждый пул донорской крови для всех сочетаний оператора и партии (А, В, С; 1, 2, 3) согласно расчетам исходя из среднего выхода и стандартного отклонения выхода, показанных на рис. 7А.

Таблица 1А. Воспроизводимость в пределах каждой партии и для каждого пользователя применительно к определенным пулам донорской крови (1, 6, 9, 10)

| Сочетание данных | Пул донорской крови 1 5,1 × 10 ⁶ клеток/мл | | | Пул донорской крови 6 6,5 × 10 ⁶ клеток/мл | | |
|--------------------------|--|---|---|--|---|---|
| | Средний выход (мкг) | Стандартное отклонение (Standard Deviation, SD) (мкг) | Коэффициент вариации (Coefficient of Variation, CV) (%) | Средний выход (мкг) | Стандартное отклонение (Standard Deviation, SD) (мкг) | Коэффициент вариации (Coefficient of Variation, CV) (%) |
| Партия 1, пользователь А | 8,03 | 0,42 | 5 | 9,55 | 0,99 | 10 |
| Партия 1, пользователь В | 7,98 | 1,17 | 15 | 9,38 | 1,94 | 21 |
| Партия 1, пользователь С | 7,87 | 0,45 | 6 | 10,71 | 0,65 | 6 |
| Партия 2, пользователь А | 7,32 | 0,98 | 13 | 9,78 | 1,89 | 19 |
| Партия 2, пользователь В | 6,09 | 1,04 | 17 | 9,82 | 2,83 | 29 |
| Партия 2, пользователь С | 6,87 | 0,31 | 4 | 10,37 | 0,74 | 7 |
| Партия 3, пользователь А | 7,04 | 0,90 | 13 | 8,96 | 0,68 | 8 |
| Партия 3, пользователь В | 6,98 | 1,22 | 17 | 7,73 | 0,97 | 13 |
| Партия 3, пользователь С | 8,78 | 0,89 | 10 | 10,59 | 1,94 | 18 |
| Сочетание данных | Пул донорской крови 9 8,4 × 10 ⁶ клеток/мл | | | Пул донорской крови 10 10,2 × 10 ⁶ клеток/мл | | |
| | Средний выход (мкг) | Стандартное отклонение (Standard Deviation, SD) (мкг) | Коэффициент вариации (Coefficient of Variation, CV) (%) | Средний выход (мкг) | Стандартное отклонение (Standard Deviation, SD) (мкг) | Коэффициент вариации (Coefficient of Variation, CV) (%) |
| Партия 1, пользователь А | 7,52 | 0,41 | 6 | 7,96 | 0,49 | 6 |
| Партия 1, пользователь В | 8,82 | 1,72 | 19 | 8,90 | 0,76 | 9 |
| Партия 1, пользователь С | 10,14 | 1,46 | 14 | 10,22 | 1,29 | 13 |
| Партия 2, пользователь А | 6,92 | 0,27 | 4 | 7,63 | 1,23 | 16 |
| Партия 2, пользователь В | 7,20 | 0,71 | 10 | 7,00 | 0,56 | 8 |
| Партия 2, пользователь С | 9,14 | 1,52 | 17 | 11,56 | 1,21 | 10 |
| Партия 3, пользователь А | 8,18 | 0,76 | 9 | 7,85 | 0,82 | 10 |
| Партия 3, пользователь В | 6,41 | 0,88 | 14 | 8,88 | 2,17 | 24 |
| Партия 3, пользователь С | 10,78 | 0,56 | 5 | 10,88 | 0,37 | 3 |

Таблица 1В. Воспроизводимость для каждого пользователя и по всем партиям применительно к определенным пулам донорской крови (1, 6, 9, 10).

| Сочетание данных | Пул донорской крови 1 5,1 × 10 ⁶ клеток/мл | | | Пул донорской крови 6 6,5 × 10 ⁶ клеток/мл | | |
|----------------------------|--|---|---|--|---|---|
| | Средний выход (мкг) | Стандартное отклонение (Standard Deviation, SD) (мкг) | Коэффициент вариации (Coefficient of Variation, CV) (%) | Средний выход (мкг) | Стандартное отклонение (Standard Deviation, SD) (мкг) | Коэффициент вариации (Coefficient of Variation, CV) (%) |
| Пользователь А, все партии | 7,46 | 0,85 | 11 | 9,43 | 1,22 | 13 |
| Пользователь В, все партии | 7,02 | 1,31 | 19 | 8,98 | 2,09 | 23 |
| Пользователь С, все партии | 7,84 | 0,98 | 13 | 10,56 | 1,15 | 11 |
| Сочетание данных | Пул донорской крови 9 8,4 × 10 ⁶ клеток/мл | | | Пул донорской крови 10 10,2 × 10 ⁶ клеток/мл | | |
| | Средний выход (мкг) | Стандартное отклонение (Standard Deviation, SD) (мкг) | Коэффициент вариации (Coefficient of Variation, CV) (%) | Средний выход (мкг) | Стандартное отклонение (Standard Deviation, SD) (мкг) | Коэффициент вариации (Coefficient of Variation, CV) (%) |
| Пользователь А, все партии | 7,54 | 0,72 | 10 | 7,81 | 0,82 | 11 |
| Пользователь В, все партии | 7,48 | 1,50 | 20 | 8,26 | 1,54 | 19 |
| Пользователь С, все партии | 10,02 | 1,34 | 13 | 10,89 | 1,10 | 10 |

Таблица 1С. Воспроизводимость в рамках каждой партии и по всем пользователям применительно к определенным пулам донорской крови (1, 6, 9, 10).

| Сочетание данных | Пул донорской крови 1 5,1 × 10 ⁶ клеток/мл | | | Пул донорской крови 6 6,5 × 10 ⁶ клеток/мл | | |
|-------------------------------|--|---|---|--|---|---|
| | Средний выход (мкг) | Стандартное отклонение (Standard Deviation, SD) (мкг) | Коэффициент вариации (Coefficient of Variation, CV) (%) | Средний выход (мкг) | Стандартное отклонение (Standard Deviation, SD) (мкг) | Коэффициент вариации (Coefficient of Variation, CV) (%) |
| | Партия 1, все пользователи | 7,96 | 0,69 | 9 | 9,88 | 1,34 |
| Партия 2, все пользователи | 6,76 | 0,93 | 14 | 9,99 | 1,84 | 18 |
| Партия 3, все пользователи | 7,60 | 1,27 | 17 | 9,09 | 1,71 | 19 |
| Сочетание данных | Пул донорской крови 9 8,4 × 10 ⁶ клеток/мл | | | Пул донорской крови 10 10,2 × 10 ⁶ клеток/мл | | |
| | Средний выход (мкг) | Стандартное отклонение (Standard Deviation, SD) (мкг) | Коэффициент вариации (Coefficient of Variation, CV) (%) | Средний выход (мкг) | Стандартное отклонение (Standard Deviation, SD) (мкг) | Коэффициент вариации (Coefficient of Variation, CV) (%) |
| | Партия 1, все пользователи | 8,83 | 1,63 | 19 | 9,02 | 1,27 |
| Партия 2, все пользователи | 7,75 | 1,36 | 18 | 8,73 | 2,31 | 26 |
| Партия 3, все пользователи | 8,46 | 1,99 | 24 | 9,20 | 1,80 | 20 |

Таблица 1D. Воспроизводимость по всем партиям и по всем пользователям применительно к определенным пулам донорской крови (1, 6, 9, 10).

| Сочетание данных | Пул донорской крови 1 5,1 × 10 ⁶ клеток/мл | | | Пул донорской крови 6 6,5 × 10 ⁶ клеток/мл | | |
|---------------------|--|---|---|--|---|---|
| | Средний выход (мкг) | Стандартное отклонение (Standard Deviation, SD) (мкг) | Коэффициент вариации (Coefficient of Variation, CV) (%) | Средний выход (мкг) | Стандартное отклонение (Standard Deviation, SD) (мкг) | Коэффициент вариации (Coefficient of Variation, CV) (%) |
| | Партия 1, все пользователи | 7,44 | 1,09 | 15 | 9,66 | 1,65 |
| Сочетание данных | Пул донорской крови 9 8,4 × 10 ⁶ клеток/мл | | | Пул донорской крови 10 10,2 × 10 ⁶ клеток/мл | | |
| | Средний выход (мкг) | Стандартное отклонение (Standard Deviation, SD) (мкг) | Коэффициент вариации (Coefficient of Variation, CV) (%) | Средний выход (мкг) | Стандартное отклонение (Standard Deviation, SD) (мкг) | Коэффициент вариации (Coefficient of Variation, CV) (%) |
| | Партия 1, все пользователи | 8,35 | 1,70 | 20 | 8,99 | 1,80 |

Подробный анализ для 4 репрезентативных пулов донорской крови. Пулы крови подбирались по уровню лейкоцитов и отражают верхнее, срединное и нижнее значения нормального диапазона уровня лейкоцитов (4,8 × 10⁶–1,1 × 10⁷ лейкоцитов/мл). Уровень лейкоцитов соответствует среднему значению по 3 показателям уровня лейкоцитов у 3 доноров на каждой пул крови.

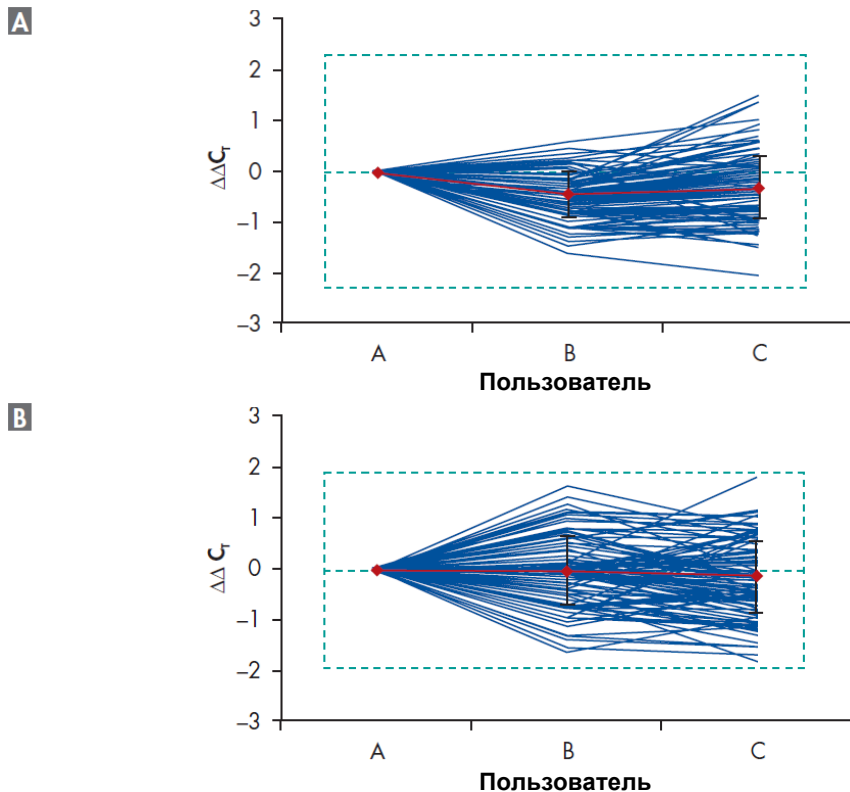


Рис. 8. Воспроизводимость результатов RT-PCR — по разным пользователям. РНК, выделявшаяся в рамках опыта, показанного на рис. 7, использовалась для real-time RT-PCR. Относительные уровни транскрипции **[A] FOS** и **[B] IL1B** определялись методом real-time, duplex RT-PCR с использованием в качестве внутреннего стандарта 18S-рРНК. На графике представлены значения для всех проб по отношению к значениям для пользователя 1 (10 пулов донорской крови x 3 партии наборов x 4 репликата = 120 наборов данных для каждого гена), показаны также средние значения (красные линии) и стандартные отклонения (черные полосы) для всех представленных проб. Пунктирными линиями показана $\pm 3\sigma$ общая погрешность анализов (FOS: 2.34 C_t ; IL1B: 1.93 C_t).

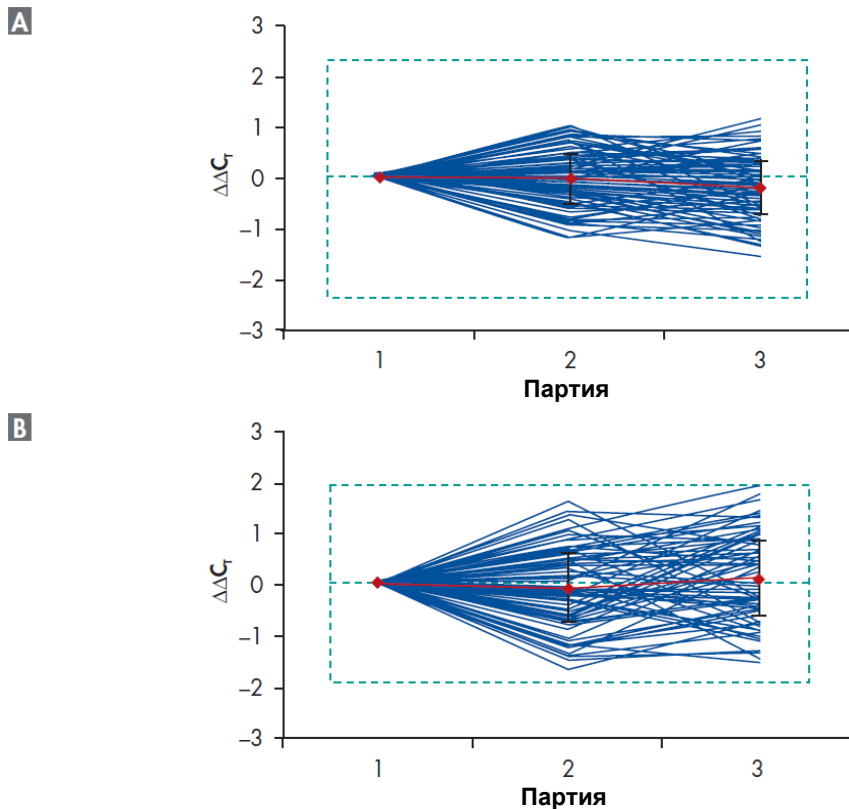


Рис. 9. Воспроизводимость результатов RT-PCR — по разным партиям наборов. РНК, выделявшаяся в рамках опыта, показанного на рис. 7, использовалась для real-time RT-PCR. Относительные уровни транскрипции **[А]** FOS и **[В]** IL1B определялись методом real-time, duplex RT-PCR с использованием в качестве внутреннего стандарта 18S-pРНК. На графике представлены значения для всех проб по отношению к значениям для партии наборов 1 (10 пулов донорской крови x 3 пользователя x 4 репликата = 120 наборов данных для каждого гена), показаны также средние значения (красные линии) и стандартные отклонения (черные полосы) для всех представленных проб. Пунктирными линиями показана $\pm 3\sigma$ общая погрешность анализов (FOS: 2.34 C_T ; IL1B: 1.93 C_T).

Таблица 2. Сводка данных RT-PCR из рис. 8 и 9

| Тест-система | Тест-система FOS/18S rRNA | | Тест-система IL1B/18S rRNA | |
|---|-----------------------------------|---|-----------------------------------|---|
| Сравнение данных | Среднее ($\Delta\Delta C_t$) | \pm стандартное отклонение (Standard Deviation, SD) ($\Delta\Delta C_t$) | Среднее ($\Delta\Delta C_t$) | \pm стандартное отклонение (Standard Deviation, SD) ($\Delta\Delta C_t$) |
| Воспроизводимость для каждого пользователя и по всем партиям | | | | |
| Все пользователи, партия 1– партия 1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Все пользователи, партия 1– партия 2 | -0,03 | 0,48 | -0,07 | 0,66 |
| Все пользователи, партия 1– партия 3 | -0,21 | 0,52 | 0,11 | 0,71 |
| Воспроизводимость для каждого пользователя и по всем партиям | | | | |
| Все партии, пользователь А– пользователь А | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Все партии, пользователь А– пользователь В | -0,46 | 0,44 | -0,06 | 0,69 |
| Все партии, пользователь А– пользователь С | -0,31 | 0,60 | -0,15 | 0,71 |

Пользователь: Лаборант, который проводил исследование.
Партия: номер партии наборов, который использовался в ходе этого исследования.
SD: стандартное отклонение (Standard Deviation).
Средние значения $\Delta\Delta C_t$ (N = 120) и стандартные отклонения показаны для данных, представленных на рис. 8 и 9.

Автоматизированное выделение РНК

Приготовление образцов автоматизируется с помощью стандартного прибора QIAcube® (№ по кат. 9001882 [110 V], № по кат. 9001293 [230 V], исключая QIAcube Connect) и осуществляется в том же порядке, что и ручная процедура, что позволяет по-прежнему использовать PAXgene Blood RNA Kit для выделения РНК на высоком уровне качества. Подробнее о QIAcube см. в *Руководстве пользователя QIAcube* и на веб-сайте по адресу: www.qiagen.com/MyQIAcube.

Протокол автоматизированного выделения РНК состоит из 2 частей (или протоколов), «PAXgene Blood RNA Part A» (PAXgene Blood RNA, часть А) и «PAXgene Blood RNA, часть В» (PAXgene Blood RNA, часть В), с кратковременной ручной операцией между ними (см. рис. 10, стр. 31).

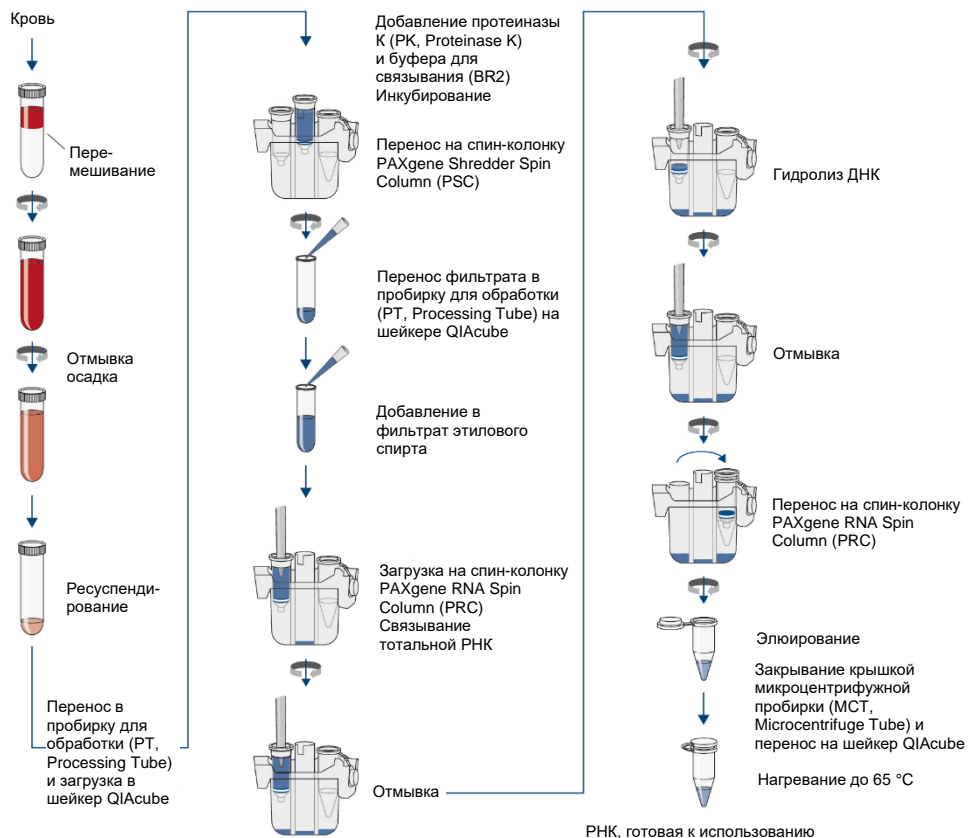


Рис. 10. Автоматизированная процедура PAXgene Blood RNA.

Центрифугированный, отмытый и ресуспендированный осадок нуклеиновых кислот (см. раздел «Концентрирование и очистка РНК», стр. 19) переносится из PAXgene Blood RNA Tube (BRT) в пробирки для обработки (PT, Processing Tube), которые помещаются в термошейкер на рабочем столе QIAcube. Оператор выбирает в меню на рабочем столе и запускает протокол «PAXgene Blood RNA Part A» (PAXgene Blood RNA, часть A). QIAcube выполняет этапы работы, предусмотренные протоколом, вплоть до элюирования РНК в элюирующем буфере (BR5). Оператор переносит микроцентрифужные пробирки (MCT, Microcentrifuge Tube) с выделенной РНК в термошейкер QIAcube. Оператор выбирает в меню на рабочем столе и запускает протокол «PAXgene Blood RNA Part B» (PAXgene Blood RNA, часть B), и QIAcube выполняет термическую денатурацию.

Среднее время приготовления образцов (по данным о циклах приготовления 12 образцов) составляет 151 минуту*; в данном случае тратится значительно меньше рабочего времени оператора по сравнению с ручной процедурой.

Выход РНК из 2,5 мл цельной крови здорового человека составляет ≥ 3 мкг для ≥ 95 % обработанных образцов. На рис. 11 (стр. 34) показаны уровни выхода РНК для 216 образцов, приготовленных по протоколу автоматизированной процедуры 3 операторами с использованием 3 партий наборов. Поскольку в рамках этих исследований использовались образцы из пулов крови, а не в индивидуальных PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), полученные результаты не отражают выход РНК, ожидаемый для отдельных образцов при индивидуальном заборе крови. Поскольку показатели выхода в большой степени зависят от донора, они могут быть разными в каждом конкретном случае (рис. 11, стр. 34).

* Общее время выполнения протокола включая предварительную обработку PAXgene Blood RNA Tubes (процедуры центрифугирования, отмытки осадка и ресуспендирования осадка).

Не менее чем в 95 % образцов не наблюдается ингибирования RT-PCR при использовании до 30 % элюата. При использовании протокола автоматизированной процедуры перекрестная контаминация между образцами не выявляется, о чем свидетельствуют результаты измерений методом количественной real-time RT-PCR применительно к транскриптам ABL1 и FOS в РНК-отрицательных образцах (воде) в паре с РНК-положительными образцами (цельной кровью человека) в рамках одного и того же цикла.

РНК, выделенная с помощью системы PAXgene Blood RNA с использованием протокола автоматизированной процедуры, является чистой, о чем говорит отсутствие ингибирования RT-PCR (см. рис. 11, стр. 34), а также значения A_{260}/A_{280} в диапазоне от 1,8 до 2,2. Геномная ДНК присутствует на уровне ≤ 1 % (массовая доля) в ≥ 95 % всех образцов, как показывают данные измерений методом количественной real-time PCR применительно к последовательности гена бета-актина. На рис. 12 и 13 (стр. 34 и 35) показаны значения A_{260}/A_{280} и относительное содержание геномной ДНК в 216 образцах, приготовленных по протоколу для автоматизированной процедуры 3 операторами с использованием 3 партий наборов.

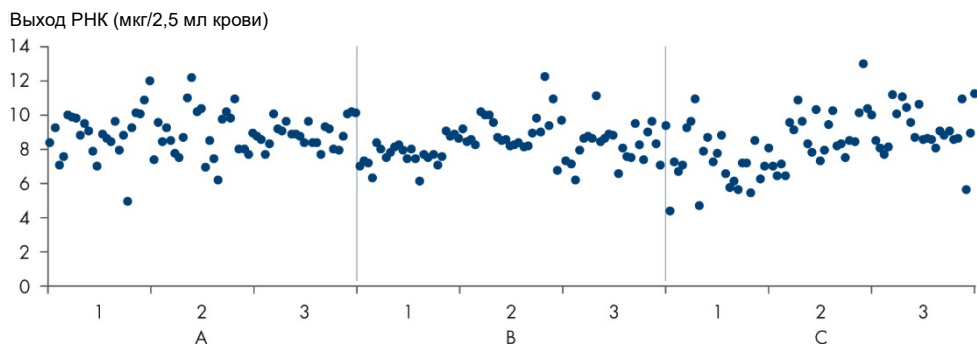


Рис. 11. Выход РНК — автоматизированная обработка. Образцы крови от 36 разных доноров собирались в PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; по 6 пробирок на одного донора, всего 216 пробирок). Содержимое пробирок от 6 доноров смешивалось и затем повторно аликвотировалось на 36 проб. Эти 36 проб на каждый пул крови от 6 доноров обрабатывались 3 операторами (А, В, С). Каждый оператор использовал для автоматизированной экстракции 3 разных партии PAXgene Blood RNA Kit (1, 2, 3) и обрабатывал пробы из каждого из пулов крови от 6 доноров в четырех повторностях. Показаны показатели выхода РНК для всех отдельных образцов применительно к каждому сочетанию оператора и партии.

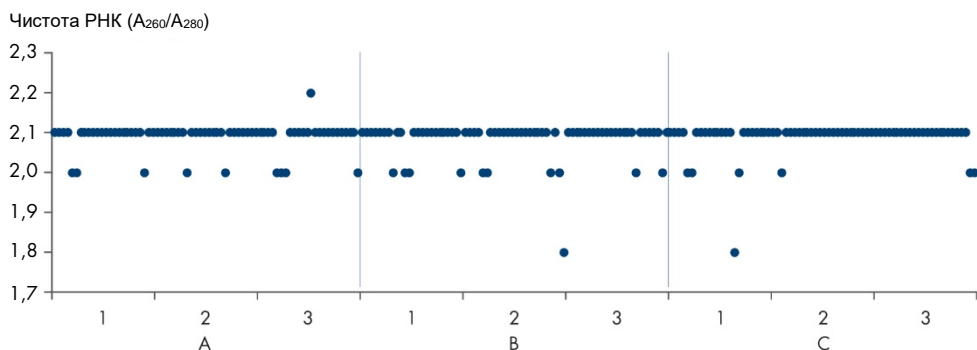


Рис. 12. Чистота РНК (значения A_{260}/A_{280}) — автоматизированная обработка. РНК выделялась 3 операторами (А, В, С) с использованием 3 разных партий PAXgene Blood RNA Kit (1, 2, 3) в ходе опыта, показанного на рис. 11. Показаны значения A_{260}/A_{280} для всех отдельных образцов для каждого сочетания оператора и партии.

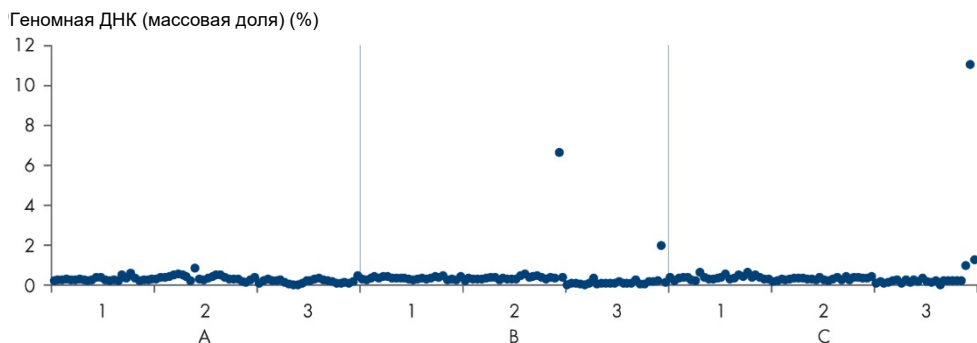


Рис. 13. Чистота РНК (% загрязнения геномной ДНК) — автоматизированная обработка. РНК выделялась 3 операторами (А, В, С) с использованием 3 разных партий PAXgene Blood RNA Kit (1, 2, 3) в ходе опыта, показанного на рис. 11. Показаны значения количества геномной ДНК (массовая доля) во всех отдельных образцах для каждого сочетания оператора и партии.

Протокол автоматизированной процедуры выделения РНК с использованием системы PAXgene Blood RNA обеспечивает высокую воспроизводимость и повторяемость результатов RT-PCR, как показано на рис. 14 (стр. 36) и, таким образом, является очень надежным средством клинического диагностического анализа.

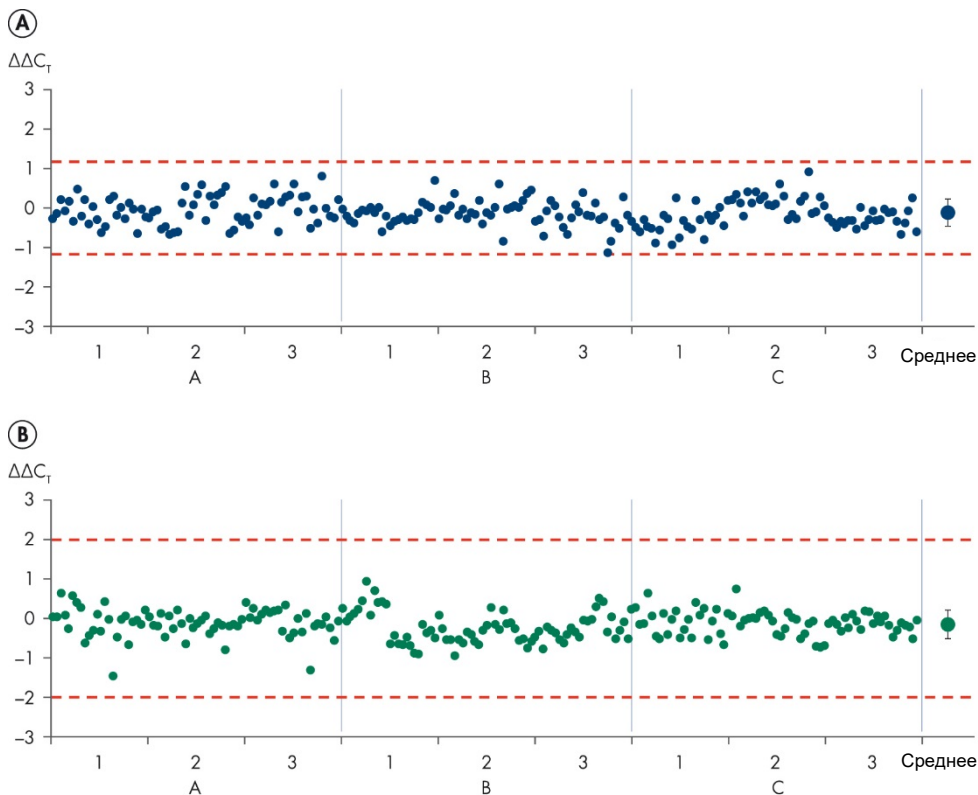


Рис. 14. Воспроизводимость результатов RT-PCR — сравнение протоколов автоматизированной и ручной процедур. РНК выделялась 3 операторами (А, В, С) с использованием 3 разных партий PAXgene Blood RNA Kit (1, 2, 3) по протоколу автоматизированной процедуры в ходе опыта, показанного на рис. 11. Параллельно РНК выделялась из соответствующих пробирок с репликатами с использованием протокола ручной процедуры. Относительные уровни транскрипции [А] FOS и [В] IL1B определялись методом real-time, duplex RT-PCR с использованием в качестве внутреннего стандарта 18S-pРНК. Возможные различия уровней транскрипции между РНК, приготовленной из парных образцов крови с использованием двух протоколов экстракции (протокола автоматизированной процедуры и протокола ручной процедуры), рассчитывались методом $\Delta\Delta C_t$. Отдельные значения $\Delta\Delta C_t$ для всех пар образцов (4 репликата \times 6 пулов донорской крови \times 3 партии наборов \times 3 оператора = 216 пар для каждого гена) показаны на графике отдельными точками. Для всех образцов показаны средние значения (более крупные точки) и стандартные отклонения (черные полосы). Пунктирными линиями показана $\pm 3\sigma$ общая погрешность анализов (FOS: 1,16 C_t ; IL1B: 1,98 C_t ; погрешности анализа отличаются от таковых на рис. 1–4, 8 и 9, что обусловлено использованием разных версий тест-системы).

Оборудование и реагенты, обеспечиваемые пользователем

При работе с химическими веществами обязательно надевайте соответствующие халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Подробнее см. в соответствующих паспортах безопасности (ПБ), предоставляемых поставщиком продукции.

Для всех протоколов

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; № по кат. 762165)
- Этиловый спирт (96–100 %, степень чистоты: ч.д.а.)
- Пипетки* (10 мкл–4 мл)
- Стерильные наконечники для пипеток с аэрозольным барьером, очищенные от РНКаз[†]
- Градуированный цилиндр[‡]
- Центрифуга*, способная обеспечить ускорение 3000–5000 $\times g$ и оснащенная ротором со свободно подвешенными стаканами, в которые можно поместить PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Вортекс-миксер*
- Дробленый лед
- Ручка со стойкими чернилами для маркировки

* Следите за тем, чтобы приборы регулярно проверялись, обслуживались и калибровались в соответствии с рекомендациями производителя.

[†] Обязательно ознакомьтесь с указаниями по работе с РНК (приложение А, стр. 71).

[‡] Для добавления этилового спирта в концентрат буфера BR4.

Для протокола ручной процедуры

- Микроцентрифуга с переменной скоростью вращения ротора*, способная обеспечить ускорение не менее 1000–8000 x *g*, хотя применяются также и меньшие и большие ускорения (*g*) (см. подробнее в протоколе) и оснащенная ротором для микроцентрифужных пробирок 2 мл
- Термошейкер*, способный обеспечить инкубацию при 55 °C и 65 °C и встряхивание со скоростью 400 об/мин, но не более 1400 об/мин (напр., Eppendorf® Thermomixer Compact или аналог)

Для протокола автоматизированной процедуры

- QIAcube* (QIAGEN, № по кат. 9001882 [110 V], № по кат. 9001293 [230 V])
- Ножницы

Расходные материалы для QIAcube

- Filter-Tips, 1000 µl (1024) (QIAGEN, № по кат. 990352)[†]
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, № по кат. 990393)[†]
- Rotor Adapters (10 x 24) (QIAGEN, № по кат. 990394)[†]

Дополнительные принадлежности к QIAcube

- Reagent Bottle Rack (QIAGEN, № по кат. 990390)[†]
- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, № по кат. 990392)[†]

* Следите за тем, чтобы приборы регулярно проверялись, обслуживались и калибровались в соответствии с рекомендациями производителя.

[†] Также входит в комплект Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, № по кат. 990395)

Важные примечания

Работа с QIAcube

Обязательно ознакомьтесь с принципами работы с QIAcube. Прочтите *Руководство пользователя QIAcube* и все дополнительные информационные материалы, прилагаемые к QIAcube, обращая особое внимание на информацию по технике безопасности, перед началом выполнения протоколов автоматизированной процедуры PAXgene Blood RNA.

Запуск QIAcube

Закройте дверцу QIAcube и включите QIAcube с помощью выключателя питания (см. рис. 15, стр. 40).

Будет подан звуковой сигнал, и отобразится экран запуска. Прибор автоматически выполнит диагностические процедуры при загрузке.

Установка протоколов на QIAcube

Начальная установка протоколов необходима перед выполнением первого цикла подготовки РНК на QIAcube. Установите как протокол «PAXgene Blood RNA Part A» (PAXgene Blood RNA, часть A), так и протокол «PAXgene Blood RNA Part B» (PAXgene Blood RNA, часть B).

Протоколы предоставляются на веб-сайте по адресу www.qiagen.com/MyQIAcube, их необходимо загрузить на USB-накопитель, входящий в комплект поставки QIAcube, и перенести на QIAcube через USB-порт.

USB-порт, расположенный за защитной панелью (см. рис. 15, стр. 40), позволяет подсоединить к QIAcube USB-накопитель (входит в комплект поставки QIAcube). В свою очередь, с QIAcube на USB-накопитель через USB-порт можно переносить файлы данных, например файлы журнала или файлы отчетов.



USB-порт предназначен только для USB-накопителя, предоставленного QIAGEN. Не подсоединяйте к этому порту другие устройства.



Не удаляйте USB-накопитель во время загрузки протоколов, переноса файлов данных или выполнения протокола.



Рис. 15. QIAcube, вид спереди.

1

Сенсорный экран

2

Дверца

3

Последовательный порт RS232 за защитной панелью (подлежит использованию только специалистами сервисной службы QIAGEN)

4

USB-порт за защитной панелью.

5

Выключатель питания

6

Отсек отходов

Загрузка QIAcube

Для экономии времени загрузку можно выполнять во время одного из 10-минутных этапов центрифугирования или обоих этих этапов (этапы 3 и 5) — см. «Протокол: автоматизированное выделение тотальной РНК из цельной крови человека, собранной в PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)», стр. 59.

Флаконы для реагентов

Перед каждым циклом работы QIAcube тщательно заполните 4 флакона для реагентов реагентами, перечисленными в таблице 3, до указателя максимального уровня или, если это невозможно, до уровня, допустимого исходя из объемов буферов, входящих в комплект поставки PAXgene Blood RNA Kit. Четко напишите названия буферов на флаконах и крышках и поместите флаконы, заполненные реагентами, в надлежащие места на штативе для флаконов с реагентами. Загрузите штатив на рабочий стол QIAcube, как показано на иллюстрациях (рис. 16 и 17, стр. 42 и 43).



Входящего в комплект поставки объема буфера BR2 недостаточно для заполнения флакона для реагентов до указателя максимального уровня. Объемы буферов BR3 и BR4 может быть недостаточно для заполнения флакона до указателя максимального уровня после обработки нескольких образцов в ходе предыдущих циклов.



Обязательно снимайте крышки с флаконов, прежде чем поместить их на рабочий стол.



Объемы буферов, входящие в комплект поставки PAXgene Blood RNA Kit (50), позволяют выполнить не более 7 циклов подготовки РНК на QIAcube при использовании от 2 до 12 образцов на каждый цикл. В целом следует избегать выполнения циклов с меньшим количеством образцов, так чтобы обрабатывать в общей сложности по 50 образцов на каждый набор с не более чем 7 циклами подготовки РНК. Выполнение более 7 циклов подготовки РНК может привести к тому, что объема буферов не хватит для обработки последних образцов.

Таблица 3. Позиции на штативе для флаконов с реагентами

| Позиция | Реагент |
|---------|----------------------------|
| 1 | Буфер для связывания (BR2) |
| 2 | Этиловый спирт (96–100 %) |
| 3 | Wash buffer 1 (BR3) |
| 4 | Wwash buffer 2 (BR4)* |
| 5 | – (оставить пустой) |
| 6 | – (оставить пустой) |

* Wash buffer 2 (BR4) поставляется в виде концентрата. Перед первым использованием добавьте 4 объема этилового спирта (96–100 %, степень чистоты: ч.д.а.), как указано на флаконе, для получения рабочего раствора.

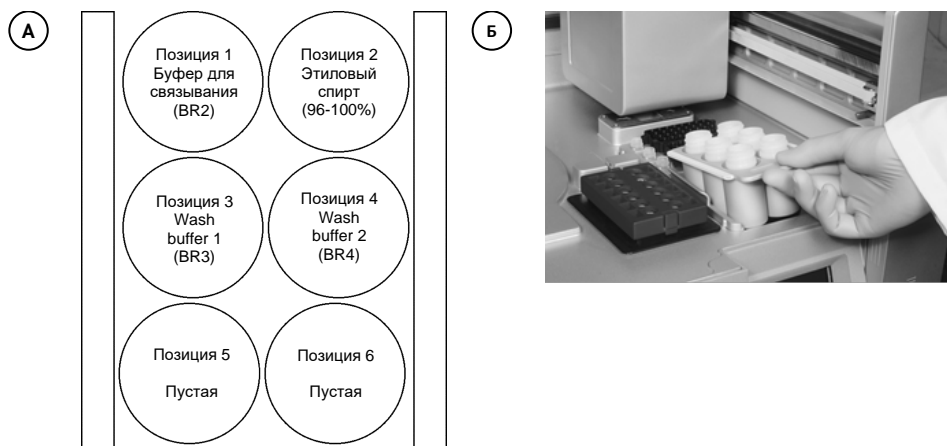


Рис. 16. Загрузка штатива для флаконов с реагентами. [A] Схематическое представление позиций и содержимого флаконов на штативе для флаконов с реагентами. **[B]** Загрузка штатива на QIAcube.

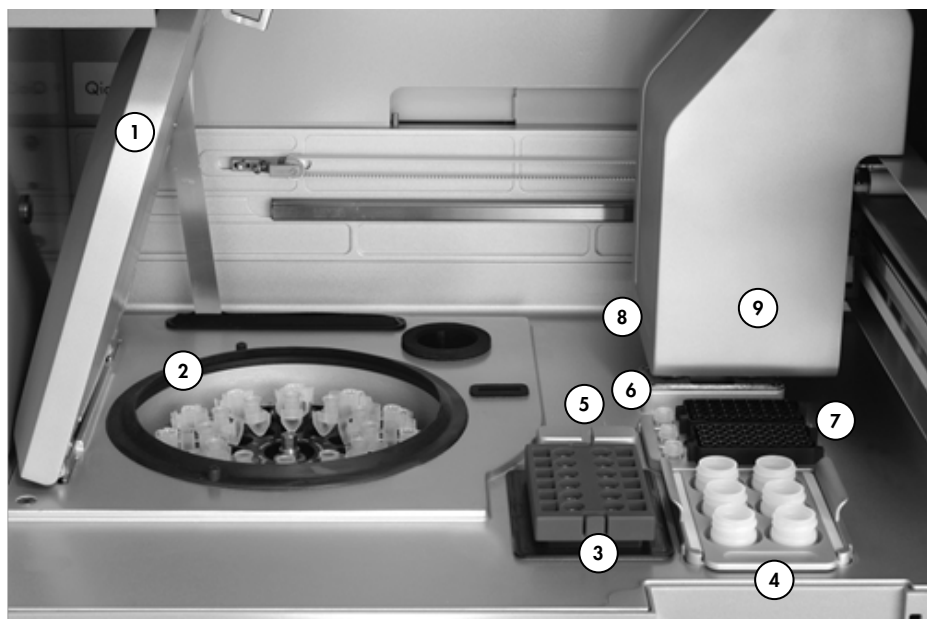


Рис. 17. QIAcube, вид изнутри.

- | | |
|------------------------------------|---|
| ① Крышка центрифуги | ⑥ Гнезда для микроцентрифужных пробирок |
| ② Центрифуга | ⑦ Штативы с наконечниками |
| ③ Шейкер | ⑧ Гнезда для удаления наконечников и колонок в отходы |
| ④ Штатив для флаконов с реагентами | ⑨ Манипулятор |
| ⑤ Датчик для наконечников | |

Спин-колонок (PRC, PSC), микроцентрифужные пробирки (МСТ, Microcentrifuge Tube) и пластиковая посуда QIAcube

Поместите на QIAcube 2 штатива для наконечников, заполненных наконечниками с фильтрами 1000 мкл (см. рис. 17, стр. 43). При необходимости повторно заполните штативы наконечниками.



Используйте только наконечники с фильтрами 1000 мкл, предназначенные для работы с QIAcube.

Промаркируйте адаптеры ротора и микроцентрифужные пробирки (МСТ, Microcentrifuge Tube) для каждого образца ручкой со стойкими чернилами. Откройте спин-колонок PAXgene Shredder spin column (PSC), которые предполагается использовать, и полностью срежьте с них крышки ножницами (см. рис. 18, стр. 45).



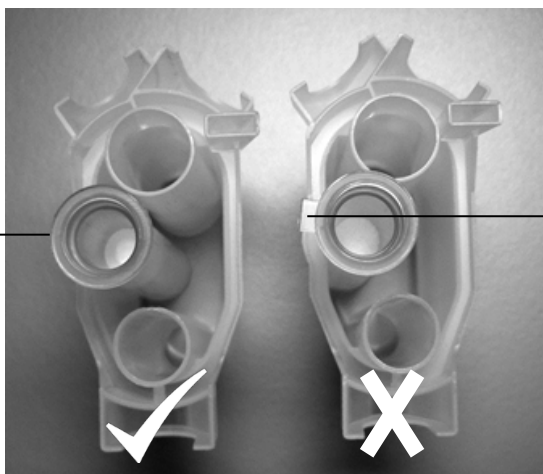
Для обеспечения правильной работы роботизированного захватывающего механизма QIAcube полностью удаляйте (срезайте) крышки и все пластиковые части, соединяющие крышку со спин-колонкой PAXgene Shredder spin column (PSC; см. рис. 16). В противном случае роботизированный захватывающий механизм не сможет правильно захватывать спин-колонок (PSC, PRC).

Установите спин-колону PAXgene RNA spin column (PRC), спин-колону PAXgene Shredder spin column (PSC, без крышки) и маркированную микроцентрифужную пробирку (МСТ, Microcentrifuge Tube) в надлежащие позиции на каждом маркированном адаптере ротора, как показано в табл. 4 и на рис. 19 (стр. 45).



Убедитесь, что крышки спин-колонок (PRC, PAXgene RNA spin column) и микроцентрифужной пробирки (МСТ, Microcentrifuge Tube) продвинуты до самого дна гнезд у края адаптера ротора,— в противном случае крышки отломятся во время центрифугирования.

Крышка колонки удалена правильно



Крышка колонки удалена неправильно: часть крышки осталась прикрепленной

Рис. 18. Загрузка спин-колонки PAXgene Shredder spin column (PSC). Спин-колонка PAXgene Shredder spin column (PSC) установлена в центральную позицию на адаптере ротора. Срежьте крышку перед установкой колонки (PSC, PAXgene Shredder spin column).

Таблица 4. Лабораторная посуда на адаптере ротора

| Позиция | Реагент | Позиция крышки |
|---------|--|----------------|
| 1 | PAXgene RNA spin column (красная, PRC) | L1 |
| 2 | Спин-колонка PAXgene Shredder spin column (сиреневая, PSC) (срежьте крышку перед установкой в адаптер ротора) | – |
| 3 | Микроцентрифужная пробирка (MCT, Microcentrifuge Tube)* | L3 |

* Используйте микроцентрифужные пробирки (1,5 мл), входящие в комплект поставки PAXgene Blood RNA Kit.

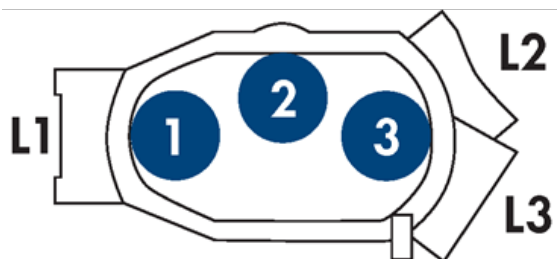


Рис. 19. Позиции на адаптере ротора. На адаптере ротора имеется три места для пробирок (1–3) и три места для крышек (L1–L3).

Загрузка центрифуги

Установите собранные адаптеры ротора в стаканы центрифуги, как показано на рис. 20 ниже.



При обработке менее 12 образцов обязательно обеспечивайте радиальное равновесие загрузки ротора центрифуги (см. рис. 21, стр. 47). Все стаканы центрифуги должны быть установлены до запуска цикла, предусмотренного протоколом, даже если планируется обработка менее 12 образцов. Обработка одного образца или 11 образцов невозможна.

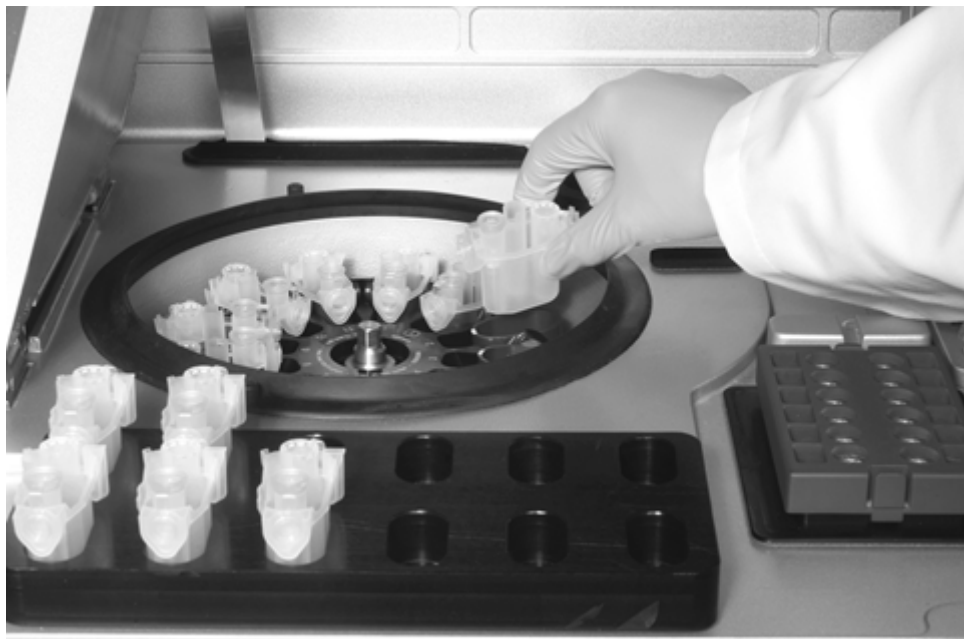


Рис. 20. Загрузка центрифуги. Установите собранные адаптеры ротора в стаканы центрифуги.

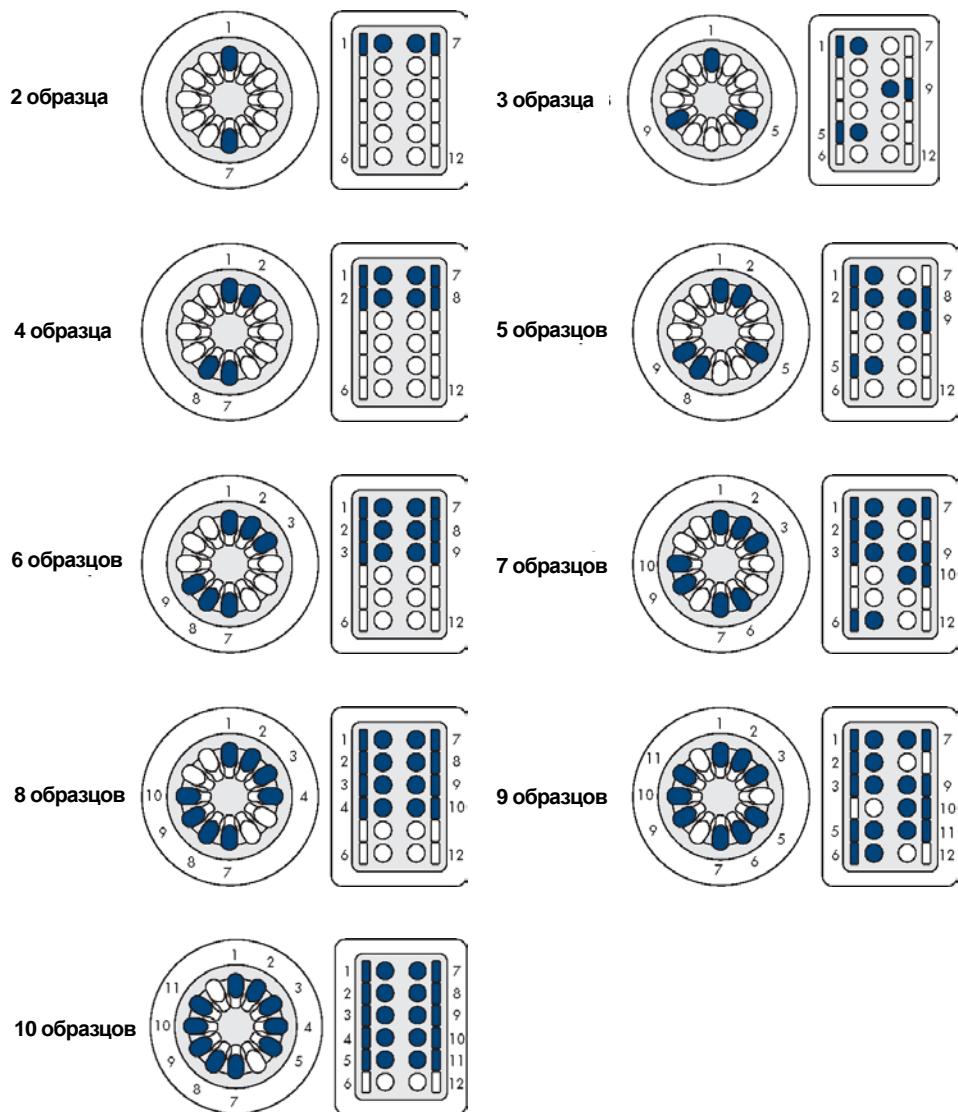


Рис. 21. Загрузка центрифуги и шейкера. Показаны позиции на центрифуге и шейкере для обработки от 2 (двух) до 10 (десяти) образцов. Обработка одного образца или 11 образцов невозможна.

Пробирки для обработки (PT, Processing Tube)

Удалите все пробирки для обработки (PT, Processing Tube), оставшиеся в гнездах для микроцентрифужных пробирок после предыдущих циклов (см. рис. 17, стр. 43). Заполните 3 пробирки для обработки (PT, Processing Tube) количеством реагентов, указанным в табл. 5, в соответствии с количеством образцов, которое обрабатывается в ходе цикла.

Для инкубационной смеси с ДНКазой I внесите пипеткой в пробирку для обработки (PT, Processing Tube) указанный объем буфера для гидролиза ДНК (RDD, DNA digestion buffer) и добавьте указанный объем исходного раствора ДНКазы I (RNFD, DNase I). Перемешайте все содержимое, осторожно набрав и выпустив его пипеткой по 3 раза, используя наконечник пипетки 1000 мкл.

Используйте пробирки для обработки (PT, Processing Tube) объемом 2 мл, входящие в комплект поставки PAXgene Blood RNA Kit. Четко напишите на пробирках для обработки (PT, Processing Tube) названия реагентов и установите пробирки в надлежащие позиции в гнезда для микроцентрифужных пробирок, как показано в табл. 6 (стр. 49).



ДНКаза I (RNFD, DNase I) особенно чувствительна к физической денатурации. Перемешивайте содержимое только пипетированием, используя наконечники пипеток с широким просветом для сведения к минимуму фрагментации. Не перемешивайте содержимое вихревым способом.



Обязательно вносите пипеткой только необходимый объем, указанный в табл. 5.

Таблица 5. Объем реагентов, которые необходимо вносить в пробирки для обработки, устанавливаемые в гнезда для микроцентрифужных пробирок

| Количество образцов | Объем реагента для указанного количества образцов (мкл) | | |
|---------------------|---|-------------------------------------|------------------------|
| | Протеиназа К (PK, Proteinase K) | Инкубационная смесь с ДНКазой I | Элюирующий буфер (BR5) |
| 2 | 126 | 187 (23 ДНКазы I + 164 Buffer RDD) | 313 |
| 3 | 170 | 261 (33 ДНКазы I + 228 Buffer RDD) | 399 |
| 4 | 213 | 334 (42 ДНКазы I + 292 Buffer RDD) | 486 |
| 5 | 256 | 407 (51 ДНКазы I + 356 Buffer RDD) | 572 |
| 6 | 299 | 481 (60 ДНКазы I + 421 Buffer RDD) | 658 |
| 7 | 342 | 554 (69 ДНКазы I + 485 Buffer RDD) | 745 |
| 8 | 386 | 627 (78 ДНКазы I + 549 Buffer RDD) | 831 |
| 9 | 429 | 701 (88 ДНКазы I + 613 Buffer RDD) | 918 |
| 10 | 472 | 775 (97 ДНКазы I + 678 Buffer RDD) | 1004 |
| 12 | 558 | 921 (115 ДНКазы I + 806 Buffer RDD) | 1177 |

Таблица 6. Гнезда для микроцентрифужных пробирок

| | Позиция | | |
|------------|---|---|---|
| | А | Б | В |
| Содержимое | Протеиназа К (PK, Proteinase K) | Инкубационная смесь с ДНКазой I | Элюирующий буфер (BR5) |
| Сосуд | Пробирка для обработки (PT, Processing Tube)* | Пробирка для обработки (PT, Processing Tube)* | Пробирка для обработки (PT, Processing Tube)* |

* Используйте пробирки для обработки (PT, Processing Tube) объемом 2 мл, входящие в комплект поставки PAXgene Blood RNA Kit.

Протокол: ручное выделение тотальной РНК из цельной крови человека, собранной в PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Важные замечания перед началом работы

- Убедитесь, что коробка с набором находится в полной сохранности и не имеет повреждений и что буферы не протекли. Не используйте набор, имеющий повреждения.
- При использовании пипетки следите за правильностью задания объема, набирайте и выпускайте жидкость осторожно и полностью.
- Во избежание переноса образцов не в ту пробирку или спин-колонку обязательно правильно маркируйте все пробирки и спин-колонки ручкой со стойкими чернилами. Маркируйте как крышку, так и корпус каждой пробирки (PT, MCT). У спин-колонок маркируйте корпус пробирки для обработки (PT, Processing Tube). Закрывайте каждую пробирку или спин-колонку после переноса в нее жидкости.
- Проливание образцов и буферов во время процедуры может привести к снижению выхода и чистоты РНК.
- Если не указано иное, все этапы данного протокола, в том числе этапы центрифугирования, должны выполняться при комнатной температуре (15–25 °C).

В силу чувствительности технологий амплификации нуклеиновых кислот при работе с образцами во избежание перекрестной контаминации необходимо принимать следующие меры предосторожности:

- Переносите образец в спин-колонку (PRC, PSC) осторожно, не замочив края колонки.
- Всегда заменяйте наконечники пипеток между операциями переноса жидкости. Используйте наконечники пипеток с аэрозольным барьером.

- Не допускайте соприкосновения наконечника пипетки с мембраной спин-колонки (PRC, PSC).
- После перемешивания вихревым способом или нагрева содержимого микроцентрифужной пробирки (МСТ, Microcentrifuge Tube) кратковременно центрифугируйте пробирку, чтобы удалить капли жидкости с внутренней стороны крышки.
- Всю процедуру необходимо выполнять в перчатках. В случае соприкосновения перчаток с образцом немедленно замените перчатки.
- Закрывайте спин-колонку (PRC, PSC) перед помещением ее в микроцентрифугу. Выполняйте центрифугирование в соответствии с инструкциями.
- Открывайте только по одной спин-колонке (PRC, PSC) за один раз и соблюдайте осторожность во избежание формирования аэрозолей.
- Для эффективной параллельной обработки нескольких образцов рекомендуется заполнять штатив пробирками для обработки (PT, Processing Tube), в которые можно перенести спин-колонки (PRC, PSC) после центрифугирования. Удаляйте в отходы пробирки для обработки (PT, Processing Tube) с фильтратом и устанавливайте новые пробирки для обработки (PT, Processing Tube) со спин-колонками (PRC, PSC) прямо в микроцентрифугу.

Необходимые действия перед началом процедуры

- Кровь необходимо собирать в PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) в соответствии с инструкциями *Руководства к PAXgene Blood RNA Tube*. При необходимости см. В приложении С (стр. 75) рекомендации по работе с PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) необходимо обязательно инкубировать не менее 2 часов при комнатной температуре после забора крови для обеспечения полного лизиса клеток крови. Инкубация PAXgene Blood RNA Tube (BRT) в течение ночи позволяет увеличить выход. Если PAXgene Blood RNA Tube (BRT) после сбора крови хранилась при температуре 2–8 °C, –20 °C или –70 °C, сначала доведите ее

до комнатной температуры, а затем выдержите при комнатной температуре в течение 2 часов перед началом процедуры.

- Ознакомьтесь с информацией по технике безопасности на стр. 9.
- Ознакомьтесь с указаниями по работе с РНК (приложение А, стр. 71).
- Следите за тем, чтобы все приборы, например пипетки и термошейкер, регулярно проверялись и калибровались в соответствии с рекомендациями производителя.
- Термошейкер необходим на этапах 5 и 20. Установите на термошейкере температуру 55 °C.
- В буфере для связывания (BR2) при хранении может образовываться осадок. При необходимости нагрейте его до 37 °C, чтобы растворить осадок.
- Wash buffer 2 (BR4) поставляется в виде концентрата. Перед первым использованием добавьте 4 объема этилового спирта (96–100 %, степень чистоты: ч.д.а.), как указано на флаконе, для получения рабочего раствора.
- Если набор с ДНКазой, свободной от РНКаз, используется в первый раз, приготовьте исходный раствор ДНКазы I. Разведите твердую ДНКазу I (RNFD, DNase I; 1500 единиц Кунитца)* 550 мкл буфера для ресуспендирования ДНКазы (DRB, DNase resuspension buffer), входящего в набор. Соблюдайте осторожность, не допуская потери ДНКазы I при открывании флакона. Не перемешивайте разведенную ДНКазу I (RNFD, DNase I) вихревым способом. ДНКазы I особенно чувствительна к физической денатурации. Перемешивание должно осуществляться только путем осторожного переворачивания пробирки.

* Единицы Кунитца — это единицы, широко используемые для измерения количества ДНКазы I. Одна единица Кунитца определяется как количество ДНКазы I, вызывающее увеличение количества A_{260} на 0,001 в минуту на миллилитр при 25 °C, pH 5,0, при использовании в качестве субстрата высокополимеризованной ДНК (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 и 363).

- Согласно имеющимся на текущий момент данным, разведенную ДНКазу I (RNFD, DNase I) можно хранить при температуре 2–8 °C не более 6 недель. Для длительного хранения ДНКазы I (RNFD, DNase I) удалите исходный раствор из стеклянного флакона, разделите его на аликвоты, предназначенные для одноразового использования (используйте микроцентрифужные пробирки [МСТ, Microcentrifuge Tube] объемом 1,5 мл, входящие в комплект поставки набора; их количества хватает на создание 5 аликвот), и храните при температуре –20 °C не более 9 месяцев. Размороженные аликвоты можно хранить при температуре 2–8 °C не более 6 недель. После размораживания не замораживайте аликвоты повторно.
- При разведении и аликвотировании ДНКазы I (RNFD, DNase I) обязательно следуйте указаниям по работе с РНК (приложение А, стр. 71).

Порядок работы

1. Центрифугируйте PAXgene Blood RNA Tube (BRT) в течение 10 минут при 3000–5000 x g, используя ротор со свободно подвешенными стаканами.



Образец должен быть обязательно инкубирован в PAXgene Blood RNA Tube (BRT) в течение не менее 2 часов при комнатной температуре (15–25 °C),— это необходимо для достижения полного лизиса клеток крови.



Ротор должен содержать адаптеры для пробирок, предназначенные для круглодонных пробирок. В случае использования адаптера пробирок другого типа пробирки могут разбиться при центрифугировании.

2. Удалите супернатант декантированием или пипетированием. Добавьте в осадок 4 мл воды, очищенной от РНКаз (RNFW, RNase-Free Water), и закройте пробирку новой вспомогательной крышкой BD Hemogard (входит в комплект поставки набора).

Если супернатант декантируется, соблюдайте осторожность, чтобы не потревожить осадок, и насухо вытрите край пробирки чистой бумажной салфеткой.

3. Перемешивайте содержимое вихревым способом до видимого растворения осадка и центрифугируйте в течение 10 минут при 3000–5000 x g, используя ротор со свободно подвешенными стаканами. Удалите и утилизируйте весь супернатант.

Небольшое количество дебриса, присутствующее в супернатанте после вихревого перемешивания, но до центрифугирования, не влияет на процедуру.



Неполное удаление супернатанта приведет к ингибированию лизиса и разведению лизата и таким образом окажет влияние на условия связывания РНК на мембране PAXgene.

4. Добавьте 350 мкл буфера для ресуспендирования (BR1) и перемешивайте вихревым способом до видимого растворения осадка.
5. Пипеткой перенесите образец в микроцентрифужную пробирку (MCT, Microcentrifuge Tube) объемом 1,5 мл. Добавьте 300 мкл буфера для связывания (BR2) и 40 мкл протеиназы К (PK, Proteinase K). Перемешивайте вихревым способом в течение 5 секунд и инкубируйте в течение 10 минут при 55 °C, используя термошейкер со скоростью вращения 400–1400 об/мин. После инкубации установите на термошейкере температуру 65 °C (для этапа 20).



Не смешивайте друг с другом буфер для связывания (BR2) и протеиназу К (PK, Proteinase K) до их добавления в образец.

6. Пипеткой перенесите лизат прямо в спин-колонку PAXgene Shredder spin column (PSC, сиреневого цвета), помещенную в пробирку для обработки (PT, Processing Tube) объемом 2 мл, и центрифугируйте в течение 3 минут при максимальной скорости (но не более 20 000 x g).



Осторожно перенесите лизат пипеткой в спин-колонку (PSC) и визуально убедитесь в том, что лизат перенесен в спин-колонку (PSC) полностью.

Во избежание повреждения колонок (PSC) и пробирок для обработки (PT, Processing Tube) не превышайте значения ускорения 20 000 x g.



Некоторые образцы могут протекать через спин-колонку PAXgene Shredder spin column (PSC) без центрифугирования. Это связано с низкой вязкостью некоторых образцов и не должно рассматриваться как признак дефекта продукта.

7. Осторожно перенесите весь супернатант проточной фракции в новую микроцентрифужную пробирку (МСТ, Microcentrifuge Tube) объемом 1,5 мл, не потревожив осадка в пробирке для обработки.
8. Добавьте 350 мкл этилового спирта (96–100 %, степень чистоты: ч.д.а.). Перемешайте вихревым способом и кратковременно центрифугируйте (в течение 1–2 секунд при 500–1000 x g), чтобы удалить капли жидкости с внутренней стороны крышки пробирки.



Время центрифугирования не должно превышать 1–2 секунд — в противном случае возможно осаждение нуклеиновых кислот и снижение выхода тотальной РНК.

9. Пипеткой перенесите 700 мкл образца в спин-колонку PAXgene RNA spin column (PRC, красного цвета), помещенную в пробирку для обработки (PT, Processing Tube) объемом 2 мл, и центрифугируйте в течение 1 минуты при 8000–20 000 x g. Поместите спин-колонку (PRC) в новую пробирку для обработки (PT, Processing Tube) объемом 2 мл, а старую пробирку для обработки (PT, Processing Tube) с фильтратом удалите в отходы.
10. Пипеткой перенесите оставшуюся часть образца в спин-колонку PAXgene RNA spin column (PRC) и центрифугируйте в течение 1 минуты при 8000–20 000 x g. Поместите спин-колонку (PRC) в новую пробирку для обработки (PT, Processing Tube) объемом 2 мл, а старую пробирку для обработки (PT, Processing Tube) с фильтратом удалите в отходы.



Осторожно перенесите образец пипеткой в спин-колонку (PSC) и визуально убедитесь в том, что образец перенесен в спин-колонку (PSC) полностью.

11. Пипеткой внесите 350 мкл wash buffer 1 (BR3) в спин-колонку PAXgene RNA spin column (PRC). Центрифугируйте в течение 1 минуты при 8000–20 000 $\times g$. Поместите спин-колонку (PRC) в новую пробирку для обработки (PT, Processing Tube) объемом 2 мл, а старую пробирку для обработки (PT, Processing Tube) с фильтратом удалите в отходы.

12. Добавьте 10 мкл исходного раствора ДНКазы I (RNFD, DNase I) к 70 мкл буфера для гидролиза ДНК (RDD, DNA digestion buffer) в микроцентрифужной пробирке (MCT, Microcentrifuge Tube) объемом 1,5 мл. Перемешайте осторожным постукиванием по пробирке и кратковременно центрифугируйте, чтобы собрать остатки жидкости со стенок пробирки.

При обработке, например, 10 образцов добавьте 100 мкл исходного раствора ДНКазы I (RNFD, DNase I) к 700 мкл буфера для гидролиза ДНК (RDD, DNA digestion buffer). Используйте микроцентрифужные пробирки (MCT, Microcentrifuge Tube) объемом 1,5 мл, входящие в комплект поставки набора.



ДНКазы I особенно чувствительны к физической денатурации. Перемешивание должно осуществляться только путем осторожного постукивания по пробирке. Не перемешивайте содержимое вихревым способом.

13. Пипеткой нанесите инкубационную смесь с ДНКазой I (RNFD, DNase I) (80 мкл) прямо на мембрану спин-колонки PAXgene RNA spin column (PRC) и поместите на рабочий стол (при температуре 20–30 °C) на 15 минут.



Убедитесь, что инкубационная смесь с ДНКазой I (RNFD, DNase I) нанесена непосредственно на мембрану. Гидролиз ДНКазой будет неполным, если часть смеси была нанесена на стенки или уплотнительное кольцо спин-колонки (PRC) и остается на них.

14. Пипеткой внесите 350 мкл wash buffer 1 (BR3) в спин-колонку PAXgene RNA spin column (PRC) и центрифугируйте в течение 1 минуты при 8000–20 000 $\times g$. Поместите спин-колонку (PRC) в новую пробирку для обработки (PT, Processing Tube) объемом 2 мл, а старую пробирку для обработки (PT, Processing Tube) с фильтратом удалите в отходы.

15. Пипеткой внесите 500 мкл wash buffer 2 (BR4) в спин-колонку PAXgene RNA spin column (PRC) и центрифугируйте в течение 1 минуты при 8000–20 000 $\times g$. Поместите спин-колонку (PRC) в новую пробирку для обработки (PT, Processing Tube) объемом 2 мл, а старую пробирку для обработки (PT, Processing Tube) с фильтратом удалите в отходы.



Wash buffer 2 (BR4) поставляется в виде концентрата. Обязательно добавьте в wash buffer 2 (BR4) этиловый спирт перед использованием (см. раздел «Необходимые действия перед началом процедуры», стр. 51).

16. Внесите еще 500 мкл wash buffer 2 (BR4) в спин-колонку PAXgene RNA spin column (PRC). Центрифугируйте в течение 3 минут при 8000–20 000 $\times g$.

17. Удалите в отходы пробирку для обработки (PT, Processing Tube) с фильтратом и поместите спин-колонку PAXgene RNA spin column (PRC) в новую пробирку для обработки (PT, Processing Tube) объемом 2 мл. Центрифугируйте в течение 1 минуты при 8000–20 000 $\times g$.

18. Удалите в отходы пробирку для обработки (PT, Processing Tube) с фильтратом. Поместите спин-колонку PAXgene RNA spin column (PRC) в микроцентрифужную пробирку (MCT, Microcentrifuge Tube) объемом 1,5 мл и пипеткой нанесите 40 мкл элюирующего буфера (BR5) непосредственно на мембрану спин-колонки PAXgene RNA spin column (PRC). Центрифугируйте в течение 1 минуты при 8000–20 000 $\times g$, чтобы элюировать РНК.

Важно полностью смочить мембрану элюирующим буфером (BR5), чтобы обеспечить максимальную эффективность элюирования.

19. Повторите этап элюирования (этап 18), как описано выше, используя 40 мкл элюирующего буфера (BR5) и ту же микроцентрифужную пробирку (МСТ, Microcentrifuge Tube).

20. Инкубируйте элюат в течение 5 минут при температуре 65 °С в термошейкере (который использовался на этапе 5) без встряхивания. После инкубации немедленно охладите элюат на льду.

Этот этап инкубации при 65 °С обеспечивает денатурацию РНК для последующих этапов работы. Не превышайте время и температуру инкубации.

21. Если образцы РНК не планируется использовать немедленно, поместите их на хранение при температуре –20 °С или –70 °С.

Поскольку РНК остается в денатурированном состоянии после повторного замораживания и оттаивания, в повторной инкубации при 65 °С нет необходимости. Если образцы РНК используются для диагностического анализа, следуйте инструкциям производителя.

Для точного определения количества РНК по оптической плотности при длине волны 260 нм мы рекомендуем разводить образцы 10 ммоль трис-НСl, рН 7,5.* Разведение образца водой, очищенной от РНКаз, может привести к получению заниженных значений.

Обнулите спектрофотометр холостой пробой с тем же соотношением элюирующего буфера (BR5) и буфера трис-НСl, что и в образцах, которые будут исследоваться. Элюирующий буфер (BR5) имеет высокую оптическую плотность при длине волны 220 нм, что может дать высокие фоновые уровни оптической плотности, если спектрофотометр обнулен неправильно.

Примечание. Для количественного анализа в буфере трис-НСl используйте следующее соотношение:

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ мкг/мл}$. См. приложение В, стр. 73.

* При работе с химическими веществами обязательно надевайте соответствующие халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Подробнее см. в соответствующих паспортах безопасности (ПБ), предоставляемых поставщиком продукции.

Протокол: автоматическое выделение тотальной РНК из цельной крови человека, собранной в PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Важные замечания перед началом работы

- Убедитесь, что коробка с набором находится в полной сохранности и не имеет повреждений и что буферы не протекли. Не используйте набор, имеющий повреждения.
- При использовании пипетки следите за правильностью задания объема, набирайте и выпускайте жидкость осторожно и полностью.
- Во избежание переноса образцов не в те пробирки и пластиковые принадлежности обязательно правильно маркируйте все пробирки для обработки (PT, Processing Tube), микроцентрифужные пробирки (MCT, Microcentrifuge Tube) и адаптеры ротора ручкой со стойкими чернилами. Маркируйте как крышку, так и корпус каждой микроцентрифужной пробирки (MCT, Microcentrifuge Tube), корпус каждой пробирки для обработки (PT, Processing Tube) и наружную стенку каждого адаптера ротора.
- Проливание образцов и буферов во время процедуры может привести к снижению выхода и чистоты РНК.
- Если не указано иное, все этапы данного протокола, в том числе этапы центрифугирования, должны выполняться при комнатной температуре (15–25 °C).

В силу чувствительности технологий амплификации нуклеиновых кислот при работе с образцами во избежание перекрестной контаминации необходимо принимать следующие меры предосторожности:

- Пипеткой осторожно внесите пробу в пробирку для обработки (PT, Processing Tube) вблизи дна пробирки, не замочив ее края.
- Всегда заменяйте наконечники пипеток между операциями переноса жидкости. Используйте наконечники пипеток с аэрозольным барьером.
- Не допускайте соприкосновения наконечника пипетки с мембраной спин-колонки (PRC, PSC).
- После перемешивания вихревым способом или нагрева содержимого микроцентрифужной пробирки (МСТ, Microcentrifuge Tube) кратковременно центрифугируйте пробирку, чтобы удалить капли жидкости с внутренней стороны крышки.
- Всю процедуру необходимо выполнять в перчатках. В случае соприкосновения перчаток с образцом немедленно замените перчатки.

Необходимые действия перед началом процедуры

- Кровь необходимо собирать в PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) в соответствии с инструкциями *Руководства к PAXgene Blood RNA Tube*. При необходимости см. В приложении С (стр. 75) рекомендации по работе с PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) необходимо обязательно инкубировать не менее 2 часов при комнатной температуре после забора крови для обеспечения полного лизиса клеток крови. Инкубация PAXgene Blood RNA Tube (BRT) в течение ночи позволяет увеличить выход. Если PAXgene Blood RNA Tube (BRT) после сбора крови хранилась при температуре 2–8 °C, –20 °C или –70 °C, сначала доведите ее до комнатной температуры, а затем выдержите при комнатной температуре в течение 2 часов перед началом процедуры.
- Ознакомьтесь с информацией по технике безопасности на стр. 9.
- Ознакомьтесь с «важными примечаниями», стр. 39.
- Ознакомьтесь с указаниями по работе с РНК (приложение А, стр. 71).

- Прочтите *Руководство пользователя QIAcube* и все дополнительные информационные материалы, прилагаемые к QIAcube, обращая особое внимание на информацию по технике безопасности.
- Следите за тем, чтобы все приборы, например пипетки и QIAcube, регулярно проверялись и калибровались в соответствии с рекомендациями производителя.
- В буфере для связывания (BR2) при хранении может образовываться осадок. При необходимости нагрейте его до 37 °C, чтобы растворить осадок.
- Wash buffer 2 (BR4) поставляется в виде концентрата. Перед первым использованием добавьте 4 объема этилового спирта (96–100 %, степень чистоты: ч.д.а.), как указано на флаконе, для получения рабочего раствора.
- Если набор с ДНКазой, свободной от РНКаз, используется в первый раз, приготовьте исходный раствор ДНКазы I. Разведите твердую ДНКазу I (RNFD, DNase I; 1500 единиц Кунитца)* 550 мкл буфера для ресуспендирования ДНКазы (DRB, DNase resuspension buffer), входящего в набор. Соблюдайте осторожность, не допуская потери ДНКазы I при открывании флакона. Не перемешивайте разведенную ДНКазу I (RNFD, DNase I) вихревым способом. ДНКазы I особенно чувствительна к физической денатурации. Перемешивание должно осуществляться только путем осторожного переворачивания пробирки.
- Согласно имеющимся на текущий момент данным, разведенную ДНКазу I (RNFD, DNase I) можно хранить при температуре 2–8 °C не более 6 недель. Для длительного хранения ДНКазы I (RNFD, DNase I) удалите исходный раствор из стеклянного флакона, разделите его на аликвоты, предназначенные для одноразового использования (используйте микроцентрифужные пробирки [МСТ] объемом 1,5 мл, входящие в комплект поставки набора; их количества хватает на создание 5 аликвот), и храните при температуре –20 °C не более 9 месяцев.

* Единицы Кунитца — это единицы, широко используемые для измерения количества ДНКазы I. Одна единица Кунитца определяется как количество ДНКазы I, вызывающее увеличение количества A_{260} на 0,001 в минуту на миллилитр при 25 °C, pH 5,0, при использовании в качестве субстрата высокополимеризированной ДНК (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 и 363).

Размороженные аликвоты можно хранить при температуре 2–8 °С не более 6 недель. После размораживания не замораживайте аликвоты повторно.

- При разведении и аликвотировании ДНКазы I (RNFD, DNase I) обязательно следуйте указаниям по работе с РНК (приложение А, стр. 71).
- Установите надлежащий адаптер шейкера (входит в комплект поставки QIAcube; используйте адаптер для пробирок с безопасным замком объемом 2 мл, с маркировкой «2») и установите на адаптер штатив шейкера.
- Проверьте отсек для отходов и при необходимости опорожните его.
- Установите протоколы, если они не были установлены для предыдущих циклов. Установите как протокол «PAXgene Blood RNA Part A» (PAXgene Blood RNA, часть А), так и протокол «PAXgene Blood RNA Part B» (PAXgene Blood RNA, часть В). См. раздел «Установка протоколов на QIAcube», стр. 39.

Порядок работы

1. Закройте дверцу QIAcube и включите QIAcube с помощью выключателя питания (см. рис. 15, стр. 40).

Будет подан звуковой сигнал, и отобразится экран запуска. Прибор автоматически выполнит диагностические процедуры при загрузке.

2. Откройте дверцу QIAcube и загрузите в QIAcube необходимые реагенты и пластиковую посуду. См. раздел «Загрузка QIAcube», стр. 41.

Для экономии времени загрузку можно выполнять во время одного из последующих 10-минутных этапов центрифугирования или обоих этих этапов (этапы 3 и 5).

3. Центрифугируйте PAXgene Blood RNA Tube (BRT) в течение 10 минут при 3000–5000 x g, используя ротор со свободно подвешенными стаканами.



Образец должен быть обязательно инкубирован в PAXgene Blood RNA Tube (BRT) в течение не менее 2 часов при комнатной температуре (15–25 °C),— это необходимо для достижения полного лизиса клеток крови.



Ротор должен содержать адаптеры для пробирок, предназначенные для круглодонных пробирок. В случае использования адаптера пробирок другого типа пробирки могут разбиться при центрифугировании.

4. Удалите супернатант декантированием или пипетированием. Добавьте в осадок 4 мл воды, очищенной от РНКаз (RNFW, RNase-Free Water), и закройте пробирку новой вспомогательной крышкой BD Hemogard (входит в комплект поставки набора).

Если супернатант декантируется, соблюдайте осторожность, чтобы не потревожить осадок, и насухо вытрите край пробирки чистой бумажной салфеткой.

5. Перемешивайте содержимое вихревым способом до видимого растворения осадка и центрифугируйте в течение 10 минут при 3000–5000 x g, используя ротор со свободно подвешенными стаканами. Удалите и утилизируйте весь супернатант.

Небольшое количество дебриса, присутствующее в супернатанте после вихревого перемешивания, но до центрифугирования, не влияет на процедуру.



Неполное удаление супернатанта приведет к ингибированию лизиса и разведению лизата и таким образом окажет влияние на условия связывания РНК на мембране PAXgene.

6. Добавьте 350 мкл буфера для ресуспендирования (BR1) и перемешивайте вихревым способом до видимого растворения осадка.
7. Пипеткой перенесите образец в пробирку для обработки (PT, Processing Tube) объемом 2 мл.



Используйте пробирки для обработки (PT, Processing Tube) объемом 2 мл, входящие в комплект поставки PAXgene Blood RNA Kit.

8. Загрузите открытые пробирки для обработки (PT, Processing Tube) с образцами в шейкер QIAcube (см. рис. 17, стр. 43). Для облегчения загрузки позиции образцов пронумерованы. Вставьте соединители штатива для шейкера (входят в комплект поставки QIAcube) в гнезда у края штатива для шейкера рядом с каждой пробиркой для обработки. Это позволит распознавать образцы при проверке загрузки.



Убедитесь, что установлен надлежащий адаптер шейкера (адаптер шейкера, 2 мл, пробирки с безопасным замком, с маркировкой «2», входящие в комплект поставки QIAcube).



При обработке менее 12 образцов обязательно обеспечивайте загрузку штатива шейкера по схеме, показанной на рис. 21, стр. 47. Обработка одного образца или 11 образцов невозможна.

9. Закройте дверцу прибора QIAcube (см. рис. 15, стр. 40).
10. Выберите и запустите протокол «PAXgene Blood RNA Part A» (PAXgene Blood RNA, часть A).

Следуйте инструкциям на сенсорном дисплее QIAcube.



На QIAcube необходимо обязательно установить обе части программы (часть А и часть В) (см. раздел «Установка протоколов на QIAcube», стр. 39).



QIAcube выполнит проверки загрузки образцов, наконечников, адаптеров ротора и флаконов с реагентами.

11. После завершения протокола «PAXgene Blood RNA Part A» (PAXgene Blood RNA, часть А) откройте дверцу прибора QIAcube (см. рис. 15, стр. 40). Извлеките из адаптеров ротора спин-колонки PAXgene RNA spin column (PRC), а пустые пробирки для обработки (PT, Processing Tube) — из шейкера и удалите в отходы.



В ходе цикла спин-колонки переносятся прибором из позиции 1 на адаптере ротора (позиция крышки L1) в позицию 3 на адаптере ротора (позиция крышки L2) (см. рис. 19, стр. 45).

12. Закройте крышки всех микроцентрифужных пробирок (MCT, Microcentrifuge Tube) 1,5 мл с выделенной РНК на адаптерах ротора (позиция 3, позиция крышки L3, см. рис. 19, стр. 45). Перенесите микроцентрифужные пробирки (MCT, Microcentrifuge Tube) 1,5 мл на адаптер шейкера QIAcube (см. рис. 17, стр. 43).

13. Закройте дверцу прибора QIAcube (см. рис. 15, стр. 40).

14. Выберите и запустите протокол «PAXgene Blood RNA Part B» (PAXgene Blood RNA, часть В).

Следуйте инструкциям на сенсорном дисплее QIAcube.



Эта программа обеспечивает инкубацию образцов при 65 °С и денатурацию РНК для последующих этапов работы. Не пропускайте этот этап, даже если термическая денатурация планируется на последующем этапе работы. Достаточная денатурация РНК необходима для достижения максимальной эффективности на последующих этапах.

15. После завершения программы «PAXgene Blood RNA Part B» (PAXgene Blood RNA, часть В) откройте дверцу прибора QIAcube (см. рис. 15, стр. 40). Немедленно поместите микроцентрифужные пробирки (MCT, Microcentrifuge Tube) с выделенной РНК на лед.



ВНИМАНИЕ! Горячая поверхность. Шейкер может нагреваться до 70 °C. Не прикасайтесь к нему, когда он нагрет.



Не оставляйте выделенную РНК в QIAcube. Если образцы не будут остужены, возможна деградация выделенной РНК. В связи с этим не рекомендуется выполнять циклы обработки образцов ночью без надлежащего контроля.

16. Если образцы РНК не планируется использовать немедленно, поместите их на хранение при температуре –20 °C или –70 °C.

Поскольку РНК остается в денатурированном состоянии после повторного замораживания и оттаивания, в повторении протокола инкубации с нагревом («PAXgene Blood RNA Part B» [PAXgene Blood RNA, часть B]) нет необходимости. Если образцы РНК используются для диагностического анализа, следуйте инструкциям производителя.

Для точного определения количества РНК по оптической плотности при длине волны 260 нм мы рекомендуем разводить образцы 10 ммоль трис-НСl, рН 7,5.* Разведение образца водой, очищенной от РНКаз, может привести к получению заниженных значений.

Обнулите спектрофотометр холостой пробой с тем же соотношением элюирующего буфера (BR5) и буфера трис-НСl, что и в образцах, которые будут исследоваться. Элюирующий буфер (BR5) имеет высокую оптическую плотность при длине волны 220 нм, что может дать высокие фоновые уровни оптической плотности, если спектрофотометр обнулен неправильно.



Для количественного анализа в буфере трис-НСl используйте следующее соотношение:

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ мкг/мл}$. См. приложение В, стр. 73.

* При работе с химическими веществами обязательно надевайте соответствующие халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Подробнее см. в соответствующих паспортах безопасности (ПБ), предоставляемых поставщиком продукции.

17. Уберите штатив для флаконов с реагентами с рабочего стола QIAcube (см. рис. 17, стр. 43) и закройте все флаконы крышками с надлежащей маркировкой. Буфер во флаконах можно хранить при комнатной температуре (15–25 °C) не более 3 месяцев. Удалите и утилизируйте реагенты, оставшиеся в пробирках для обработки (PT, Processing Tube) в гнездах для микроцентрифужных пробирок QIAcube (см. рис. 17, стр. 43). Удалите адаптеры ротора из центрифуги и утилизируйте их (см. рис. 17, стр. 43). Опорожните отсек для отходов QIAcube (см. рис. 15, стр. 40). Закройте дверцу прибора QIAcube и выключите прибор с помощью выключателя питания (см. рис. 15, стр. 40).

Руководство по поиску и устранению неполадок

Данное руководство по устранению неполадок может быть полезным в решении любых проблем, которые могут возникнуть. Подробнее см. на странице «Frequently Asked Questions» (Часто задаваемые вопросы) сайта нашего центра технической поддержки: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Научные специалисты технической службы QIAGEN всегда готовы ответить на любые ваши вопросы, касающиеся как информации, содержащейся в настоящем руководстве, в том числе о протоколах, так и методик обработки образцов и проведения анализа (контактную информацию см. на последней странице или на веб-сайте www.qiagen.com).

Комментарии и рекомендации

Произошла деградация РНК

Загрязнение РНКазми



Соблюдайте осторожность во избежание внесения в реагенты РНКаз во время процедуры или при последующих манипуляциях (см. приложение А, стр. 71).

Малый выход РНК

- а) В PAXgene Blood RNA Tube (BRT) было собрано менее 2,5 мл крови



Необходимо обязательно собрать в PAXgene Blood RNA Tube (BRT; см. *Руководство к PAXgene Blood RNA Tube*) 2,5 мл крови.

- б) Концентрация РНК измерена в воде



Для точного количественного анализа необходимо развести РНК 10 ммоль трис-НCl, pH 7,5* (см. приложение В, стр. 73).

* При работе с химическими веществами обязательно надевайте соответствующие халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Подробнее см. в соответствующих паспортах безопасности (ПБ), предоставляемых поставщиком продукции.

Комментарии и рекомендации

- с) На этапах 9 и 10 протокола ручной процедуры в спин-колонку PAXgene RNA spin column (PRC) попал клеточный дебрис.



Не допускайте переноса крупных частиц при пипетировании супернатанта на этапе 7 протокола ручной процедуры (перенос небольших частиц дебриса не влияет на результат процедуры).

- д) Супернатант не был удален полностью на этапе 3.



Необходимо удалять супернатант полностью. Если супернатант декантируется, удаляйте капли жидкости с краев PAXgene Blood RNA Tube (BRT), промакивая их бумажной салфеткой. Принимайте надлежащие меры предосторожности во избежание перекрестной контаминации.

- е) После сбора в PAXgene Blood RNA Tube (BRT) кровь инкубируется менее 2 часов



После сбора крови инкубируйте PAXgene Blood RNA Tube (BRT) не менее 2 часов.

Низкое значение A_{260}/A_{280}

- а) Для измерения соотношения A_{260}/A_{280} РНК разводилась водой



Перед измерением чистоты* разведите РНК 10 ммоль трис-HCl, pH 7,5 (см. приложение В, стр. 73).

* 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.

Комментарии и рекомендации

- b) Спектрофотометр
обнулен неправильно



Обнулите спектрофотометр холостой пробой с тем же соотношением элюирующего буфера (BR5) и 10 ммоль трис-HCl, pH 7,5, что и в образцах, которые будут исследоваться. Элюирующий буфер (BR5) имеет высокую оптическую плотность при длине волны 220 нм, что может дать высокие фоновые уровни оптической плотности, если спектрофотометр обнулен неправильно.

Сбой в работе прибора

Работа с QIAcube
осуществляется
неправильно

Ознакомьтесь с *Руководством пользователя QIAcube*, обращая особое внимание на раздел «Поиск и устранение неисправностей». Обеспечьте надлежащее техническое обслуживание QIAcube, как описано в *Руководстве пользователя QIAcube*.

Приложение А: Общие замечания о работе с РНК

Работа с РНК



Рибонуклеазы (РНКазы) — это высокостабильные и высокоактивные ферменты, для функционирования которых обычно не требуются кофакторы. Поскольку рибонуклеазы трудно инактивировать, а для деградации РНК достаточно их ничтожного количества, не используйте никакую пластиковую или стеклянную лабораторную посуду, не устранив предварительно возможные загрязнения рибонуклеазами. Следует соблюдать особую осторожность во избежание непреднамеренного введения рибонуклеаз в образец РНК до или после процедуры очистки. Для создания и поддержания среды, не содержащей РНКаз, необходимо принимать меры предосторожности на подготовительном этапе, а также при использовании одноразовой и многоразовой посуды и растворов во время работы с РНК,

Общие принципы работы



При работе с РНК следует всегда применять надлежащую асептическую микробиологическую методику. Через руки и частицы пыли переносятся бактерии и плесень, и именно они чаще всего являются источниками загрязнения РНКазами. При работе с реагентами и образцами РНК всегда надевайте латексные или виниловые перчатки во избежание занесения РНКаз с поверхности кожи или пыльного лабораторного оборудования. Часто меняйте перчатки и по возможности держите пробирки закрытыми. При пипетировании аликвот для последующих процедур держите выделенную РНК на льду.

Протоколы удаления РНКазных загрязнений со стеклянной посуды и из растворов см. в общих руководствах по молекулярной биологии, например Sambrook, J. и Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Приложение В: Количественный анализ и определение качества тотальной РНК

Количественный анализ РНК

Концентрацию РНК определяют путем измерения оптической плотности при длине волны 260 нм (A_{260}) на спектрофотометре. Для обеспечения значимости результатов показания должны находиться в линейном диапазоне спектрофотометра. 1 единица оптической плотности при длине волны 260 нм соответствует концентрации РНК 44 мкг на мл ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44$ мкг/мл). Это соотношение действительно только для измерений в 10 ммоль трис-НСI,* рН 7,5. Поэтому образец РНК необходимо развести, причем именно 10 ммоль трис-НСI. Как указывается ниже (см. раздел «Чистота РНК», стр. 74), соотношение значений оптической плотности при длине волны 260 и 280 нм дает приблизительное значение чистоты РНК. При исследовании образцов РНК необходимо обеспечить отсутствие РНКаз в кюветах. Обнулите спектрофотометр холостой пробой с тем же соотношением элюирующего буфера (BR5) и буфера трис-НСI, что и в образцах, которые будут исследоваться. Элюирующий буфер (BR5) имеет высокую оптическую плотность при длине волны 220 нм, что может дать высокие фоновые уровни оптической плотности, если спектрофотометр обнулен неправильно. Ниже показан пример расчета при количественном анализе РНК.

| | | |
|--|---|--|
| Объем образца РНК | = | 80 мкл |
| Разведение (1/15) | = | 10 мкл образца РНК + 140 мкл 10 ммоль трис-НСI, рН 7.5 |
| Измерьте оптическую плотность разведенного образца в кювете (не содержащей РНКаз). | | |
| A_{260} | = | 0,3 |
| Концентрация образца | = | $44 \times A_{260} \times \text{коэффициент разведения}$ |
| | = | $44 \times 0,3 \times 15$ |
| | = | 198 мкг/мл |
| Общий выход | = | концентрация \times объем образца в миллилитрах |
| | = | $198 \text{ мкг/мл} \times 0,08 \text{ мл}$ |
| | = | 15,8 мкг РНК |

* При работе с химическими веществами обязательно надевайте соответствующие халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Подробнее см. в соответствующих паспортах безопасности (ПБ), предоставляемых поставщиком продукции.

Чистота РНК

Соотношение показаний при длине волны 260 нм и 280 нм (A_{260}/A_{280}) дает приблизительное значение чистоты РНК в отношении присутствия примесей, поглощающих УФ-излучение, таких как белок. Однако значительное влияние на соотношение A_{260}/A_{280} оказывает уровень pH. Снижение уровня pH ведет к снижению соотношения A_{260}/A_{280} и снижению чувствительности к белковым загрязнениям.* Для получения точных значений мы рекомендуем измерять оптическую плотность в 10 ммоль трис-HCl, pH 7,5. У чистой РНК в 10 ммоль трис-HCl, pH 7,5, соотношение A_{260}/A_{280} составляет 1,8–2,2. Обнулите спектрофотометр холостой пробой с тем же соотношением элюирующего буфера (BR5) и буфера трис-HCl, что и в образцах, которые будут исследоваться. Элюирующий буфер (BR5) имеет высокую оптическую плотность при длине волны 220 нм, что может дать высокие фоновые уровни оптической плотности, если спектрофотометр обнулен неправильно.

* 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.

Приложение С: Обращение с PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Следующие рекомендации компании BD могут быть полезны при работе с PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Подробнее о PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) см. в *Руководстве к PAXgene Blood RNA Tube*.

Инструкции по удалению крышки BD Hemogard

1. Возьмите PAXgene Blood RNA Tube (BRT) одной рукой, поместив большой палец под крышку BD Hemogard. (Для устойчивости поместите руку на твердую поверхность.) Другой рукой поворачивайте крышку BD Hemogard, одновременно толкая ее вверх большим пальцем **ТОЛЬКО ДО ОСВОБОЖДЕНИЯ ПРОБКИ ПРОБИРКИ**.
2. Отведите большой палец, прежде чем снимать крышку. **НЕ** снимайте крышку с PAXgene Blood RNA Tube (BRT) большим пальцем. Внимание! Если PAXgene Blood RNA Tube (BRT) содержит кровь, имеется опасность контакта с ней. Во избежание травм при снятии крышки важно убирать большой палец, которым вы толкаете крышку вверх, от PAXgene Blood RNA Tube (BRT), как только освобождается крышка BD Hemogard.
3. Снимите крышку с PAXgene Blood RNA Tube (BRT). В случае отделения пластикового покрытия от резиновой пробки (маловероятно) **НЕ СОБИРАЙТЕ КРЫШКУ**. Осторожно снимите с PAXgene Blood RNA Tube (BRT) резиновую пробку.

Инструкции по установке вспомогательной крышки BD Hemograd

1. Поместите крышку на PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Поверните ее, а затем сильно надавите на нее, пока пробка не будет вставлена полностью. Пробку необходимо вставить до конца, для того чтобы PAXgene Blood RNA Tube (BRT) всегда оставалась плотно закрытой во время последующих манипуляций.

Информация для заказа

| Продукт | Комплектация | № по каталогу |
|---|--|---------------|
| PAXgene Blood RNA Kit (50) | 50 спин-колонок PAXgene Spin Column; 50 спин-колонок Shredder Spin Column; пробирки для обработки; ДНКазы I, свободная от РНКаз; свободные от РНКаз реагенты и буферы. Для использования в сочетании с PAXgene Blood RNA Tubes | 762174 |
| PAXgene Blood RNA Tubes (100) | 100 пробирок для забора крови | 762165 |
| Сопутствующие продукты, которые можно заказать у компании QIAGEN | | |
| Starter Pack, QIAcube | В упаковке: штативы для флаконов с реагентами (3); полоски для маркировки штативов (8); наконечники с фильтром 200 мкл (1024); наконечники с фильтром 1000 мкл (1024); наконечники с фильтром 1000 мкл, с широким просветом (1024); флаконы для реагентов 30 мл (18); адаптеры ротора (240); держатель адаптера ротора | 990395 |
| Filter-Tips, 1000 µl (1024) | Стерильные одноразовые наконечники с фильтром, на штативе | 990352 |
| Reagent Bottles, 30 ml (6) | Флаконы для реагентов (30 мл) с крышками, 6 шт. в упаковке, для использования в сочетании со штативом для флаконов с реагентами QIAcube | 990393 |

| | | |
|--|--|--------|
| Rotor Adapters (10 x 24) | Для 240 препаратов: 240 одноразовых адаптеров ротора, для использования с QIAcube | 990394 |
| Reagent Bottle Rack | Штатив для 6 x 30 мл флаконов для реагентов, помещаемый на рабочий стол QIAcube | 990390 |
| Rotor Adapter Holder | Держатель для 12 одноразовых адаптеров ротора, для использования с QIAcube | 990392 |
| Сопутствующие продукты, которые можно заказать у компании BD* | | |
| Blood Collection Set | BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: игла 21G, 0,75 дюйма (0,8 x 19 мм); трубка 12 дюймов (305 мм) с наконечником Люэра, 50 шт. в коробке, 200 шт. в футляре | 367286 |
| BD Vacutainer One-Use Holder | Футляр только для диаметров 13 мм и 16 мм, 1000 шт./футляр | 364815 |
| BD Vacutainer Plus Serum Tubes | 13 x 75 мм 4,0 мл пробирка для забора крови с красной крышкой BD HemoGuard и бумажной этикеткой, 100 шт./коробка, 1000 шт./футляр | 368975 |

* Эти дополнительные принадлежности для забора крови являются стандартными изделиями, которые можно использовать с PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Подробнее об этих дополнительных принадлежностях, в том числе информацию о заказе, см. на веб-сайте по адресу: www.preanalytix.com.

Актуальную информацию о лицензиях, а также заявления об отказе об ответственности применительно к конкретным продуктам см. в соответствующем руководстве к набору PreAnalytiX либо QIAGEN или в руководстве пользователя. Руководства к наборам PreAnalytiX и QIAGEN, а также руководства пользователя см. на веб-сайтах www.preanalytix.com и www.qiagen.com. Их также можно заказать у технической службы PreAnalytiX.

История изменения руководства

| Документ и редакция | Изменения | Дата |
|---------------------|--|-----------------|
| HB-0101-004, R2 | Изменения для приведения текста в соответствие с директивами GHS по всему документу | Июнь 2015 г. |
| HB-0101-005, R3 | Новый шаблон; изменения в протоколе автоматизированной процедуры и данных о рабочих характеристиках; обновление информации по технике безопасности в соответствии с директивами GHS; изменения в информации о приборе и заявлении об ограничениях на использование продукта. | Февраль 2019 г. |
| HB-0101-006, R3 | Исправлено название набора в таблице комплектации набора на стр. 5. | Январь 2020 г. |

PreAnalytiX по всему миру

Продукция PreAnalytiX распространяется компаниями QIAGEN и 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

