

Januari 2020

PAXgene[®]

Blood RNA Kit-handbok

Version 2

R3 **MAT** 1120409SE

IVD



50 (katalognr. 762174)

REF 762174



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Producerad av QIAGEN GmbH för PreAnalytiX

 **PreAnalytiX**
A QIAGEN / BD Company

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

PAXgene Blood RNA Kit finns inte i alla länder. Fråga gärna för mer information.

Begränsat licensavtal

Användning av denna produkt innebär att köparen eller användaren av PAXgene Blood RNA Kit godkänner följande villkor:

1. PAXgene Blood RNA Kit får endast användas i enlighet med *PAXgene Blood RNA Kit handbok* och endast med produkter som finns i satsen. PreAnalytiX ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i denna sats med komponenter som inte är inkluderade i denna sats, förutom såsom som beskrivs i *PAXgene Blood RNA Kit-handboken* och ytterligare protokoll som finns på www.preanalytix.com.
2. Förutom de uttryckta licenserna, kan PreAnalytiX inte garantera att denna sats och/eller dess användning inte kränker oberoende tredje parts rättigheter.
3. Kitet och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. PreAnalytiX avsäger sig specifikt alla andra licenser, uttryckta eller underförstådda, förutom de specifikt stipulerade.
5. Inköparen och användaren av detta kit samtycker till att inte vidta eller tillåta att någon annan vidtar några steg som kan leda till eller underlätta några åtgärder som är förbjudna enligt ovan.
6. PreAnalytiX kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol, och skall ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inkluderat advokatskostnad, vid eventuellt försök att upprätthålla detta begränsade licensavtal eller någon av sina immateriella rättigheter avseende satsen och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.preanalytix.com.

Villkortlig försäljning

Den aktuella produkten levereras med en licens under vissa krav i US-7,270,953 och US-7,682,790, såväl som EP-1820793 B1 och utländska motsvarigheter till dessa patentkrav, för att använda produkten för bearbetning av det nukleinsyrakomplex som bildas under provtagning i ett PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-006 BD-8945 1120409 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, med ensamrätt.

PreAnalytiX Company

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Schweiz

www.preanalytix.com

PreAnalytiX-distributörer

PreAnalytiX produkter produceras för PreAnalytiX av QIAGEN eller BD och distribueras för PreAnalytiX av QIAGEN eller BD. Produkterna kan inte beställas av PreAnalytiX GmbH.

Adressen till din lokala PreAnalytiX-distributör finner du på sista sidan.

Innehåll

Kitinnehåll.....	5
Symboler	7
Förvaringsförhållanden.....	9
Avsedd användning	9
Begränsningar för produktanvändning	10
Kvalitetskontroll.....	10
Teknisk hjälp	10
Säkerhetsinformation	11
Inledning	14
Princip och utförande.....	14
Provtagning och stabilisering	14
RNA koncentration och rening	20
Manuell RNA-rening	20
Automatiserad RNA-rening	30
Utrustning och reagenser som ska tillhandahållas av användaren	36
Viktiga anmärkningar.....	38
Användning av QIAcube.....	38
Starta QIAcube	38
Installation av protokoll på QIAcube.....	38
Laddning av QIAcube	39
Protokoll: Manuell rening av total RNA från humant helblod i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	49

Protokoll: Automatisk rening av total RNA från humant helblod i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	56
Felsökningshandbok.....	63
Bilaga A: Allmänna hänvisningar angående RNA-hantering.....	65
Bilaga B: Bestämning av mängd och kvalitet av Total RNA	66
Bilaga C: Handhavandet av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	67
Beställningsinformation	69
Revideringshistorik för handboken	71

Kitinnehåll


PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Katalognr.			762174
Antal beredningar			50
BR1	Resuspension Buffer (Återsuspenderingsbuffert)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Bindningsbuffert) *	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer (Tvättbuffert) 1 *	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) (Tvättbuffert 2 (koncentrat)) [†]	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Elueringsbuffert)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-free Water (bottle) (Vatten, fritt från RNase) (flaska)	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (green lid) (Proteinas K) (grönt lock)	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (PAXgene RNA-kolonner) (röd)	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (2 ml) (Reaktionsrör) (2 ml)	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary Hemogard™ Closures (Sekundära BD Hemogard™- förslutningar)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (1.5 ml) (Mikrocentrifugrör) (1,5 ml)	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNase I, fritt från RNase) (frysorkat)	DNA REM	1500 Kunitz units [‡]

*Får ej komma i kontakt med desinfektionsmedel som innehåller blekmedel. Innehåller guanidinsalt.

Säkerhetsinformation finns på sidan 11.

[†] Tvättbuffert 2 (BR4) levereras med satsen som koncentrat. Tillsätt den fyrfaldiga volymen etanol (96–100 %, renhetsgrad p. a.) till flaskan (som etiketten anger) innan den används första gången för att framställa den bruksfärdiga arbetslösningen.

[‡] Kunitz units är ett brukligt mått för mätning av DNase I; definierad som den mängd DNase I som orsakar en höjning av A_{260} med 0,001 per minut och milliliter vid 25 °C och pH 5,0, varvid högpolymer DNA används som substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 och 363).

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Katalognr.			762174
Antal beredningar			50
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (DNA Digestionsbuffert) (vitt lock)	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (DNase återsuspenderingsbuffert) (rör, lila lock)	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (PAXgene Shredder-kolonner) (lila)	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Handbok	PAXgene Blood RNA Kit-handbok (Version 2)		1

Symboler



Innehåller tillräckligt med reagenser för <N> test



Läs bruksanvisningen innan användning



Utgångsdatum



In vitro-diagnostisk medicinsk produkt



Katalognummer



Lotnummer



Materialnummer



Komponenter



Antal



Sterilisering genom UV-bestrålning



Kunitz units



Tillsätta



Innehåller











Rekonstituerad



Doxyribonukleas I



Etanol

GITC	Guanidinisotiocyanat
RNase-Free DNase Set	RNase-Free DNase Set
GTIN	GS-artikelnnummer
	Får ej återanvändas
	Temperaturbegränsning
	Övre temperaturgräns
	Tillverkare
	Viktig anmärkning
 _____	Skriv ner aktuellt datum efter tillsats av etanol i flaskan
	Vid ankomst
	Leder till

Förvaringsförhållanden

PAXgene RNA-kolonner (PRC), PAXgene Shredder-kolonner (PSC), proteinas K (PK) och alla buffertar (BR1, BR2, BR3, BR4 och BR5) kan förvaras torrt och vid den temperatur som anges på etiketten.

RNase-Free DNase Set, som innehåller DNase I (RNFD), DNA digestionsbuffert (RDD) och DNase återsuspenderingsbuffert (DRB), skickas under omgivningstemperatur. Direkt efter transporten skall alla komponenter som tillhör RNase-Free DNase Set förvaras i den temperatur som anges på etiketten. Vid korrekt förvaring är kitet hållbart fram till utgångsdatumet på kitförpackningen.

Avsedd användning

PAXgene Blood RNA Kit används för att rena intracellulärt RNA ur helblod, som samlats in med PAXgene Blood RNA Tube (BRT). När satsen används med PAXgene Blood RNA Tube (BRT), ger systemet renat intracellulärt RNA ur helblod för RT-PCR som används i molekylärdiagnostiska tester. Se *PAXgene Blood RNA Tube-handboken (PAXgene Blood RNA Tube Handbook)* för information om användningen av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

De i denna handbok angivna prestandaegenskaper för PAXgene Blood RNA System gäller endast för FOS- och IL1B-gentranskriptioner. Användaren är ansvarig för att fastställa lämpliga prestandaegenskaper för PAXgene Blood RNA System för andra måltranskriptioner.

Begränsningar för produktanvändning

PAXgene Blood RNA Kit är avsett som hjälpmedel för rening av intracellulärt RNA ur humant helblod ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocyter/ml) för in vitro-diagnostisk användning. Det är inte avsett för rening av genom-DNA eller virala nukleinsyror ur humant helblod. Prestandaegenskaper kan inte anges för alla transkriptioner, eftersom endast ett begränsat antal RNA-transkriptioner (FOS- och IL1 B-genttranskriptioner) har blivit validerade för de i denna handbok angivna stabiliseringsvillkoren. Laboratoriepersonalen skall kontrollera om egna data eller tillverkarens angivelser kräver en validering för andra transkriptioner än de som har angivits i denna handbok.

Produkten är avsedd att användas av yrkesanvändare, såsom tekniker och läkare, som är utbildade i in vitro-diagnostiska procedurer.

Kvalitetskontroll

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje lot PAXgene Blood RNA Kit med fastlagda testkriterier enligt QIAGEN:s ISO-certifierade kvalitetshanteringssystem.

Teknisk hjälp

Vi på QIAGEN är stolta över vår tekniska supports kvalitet och tillgänglighet. Erfarna vetenskapare på vår tekniska serviceavdelning hjälper gärna vid frågor angående PreAnalytiX produkter. Kontakta oss om du har frågor angående PAXgene Blood RNA Kit.

Även för fördjupad information står den tekniska servicen hos QIAGEN gärna till förfogande.

Säkerhetsinformation

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier.

Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon även vid hantering av biologiskt eller kemiskt material, för att minimera risken för infektion (t.ex. av HIV eller Hepatit-B-virus) eller skada. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS). I vår onlinesamling med säkerhetsdatablad på www.preanalytix.com hittar du för denna sats och för varje satskomponent tillhörande SDS som PDF-fil för granskning och utskrift.

WARNING!



Tillsätt INTE blekmedel eller sura lösningar direkt till provberedningsavfall.

Bindningsbuffert (BR2) och tvättbuffert 1 (BR3) innehåller guanidinisotiocyanat, som kan reagera starkt med blekmedel. Om en vätska som innehåller bindningsbuffert (BR2) och tvättbuffert 1 (BR3) spills ut, skall utsatta ytor tvättas med lämpliga laboratorierengöringsmedel och vatten. Om den utspillda vätskan innehåller potentiellt smittbärande ämnen, skall ytan först rengöras med rengöringsmedel och vatten, och därefter med 1 % (v/v) natriumhypoklorid.

RNA-stabiliseringslösningen och blodvätskan ur PAXgene Blood RNA Tube (BRT) kan desinficeras med 1 volym blekmedelslösning (5 % natriumhypoklorid) till 9 volymer RNA-stabiliseringslösning resp. blodvätska.

Avfall från RNA-preparering, t.ex. supernatanter efter centrifugeringssteg, ska alltid anses som potentiellt smittbärande. För att förstöra smittbärande material ska avfall därför först

autoklaveras eller förbrännas innan det slängs. Beakta i varje fall gällande föreskrifter och riktlinjer angående avfallshantering.

Följande information om risker och försiktighetsåtgärder gäller för komponenter i PAXgene Blood RNA Kit. Se *PAXgene Blood RNA Tube-handboken* för säkerhetsinformation om PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

BR2-buffert



Innehåller: guanidinisotiocyanat. Fara! Farligt vid förtäring. Kan vara skadligt vid hudkontakt eller inandning. Orsakar allvarlig ögonskada. Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer. Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja. Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare.

BR3-buffert



Innehåller: etanol; guanidintiocyanat. Fara! Brandfarlig vätska och ånga. Orsakar allvarlig ögonskada. Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra. Får inte utsättas för värme/gnistor/öppen låga/heta ytor. Rökning förbjuden. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja. Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare.

DNase I



Innehåller: DNase. Fara! Kan orsaka allergisk hudreaktion. Kan orsaka allergi- eller astmasymptom eller andningssvårigheter vid inandning. Inandas inte damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. Använd andningsskydd. Vid exponering eller oro: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare. Flytta personen till frisk luft och se till att han eller hon vilar i en ställning som underlättar andningen.

Proteinas K



Innehåller: proteinas K. Fara! Orsakar lindrig hudirritation. Kan orsaka allergi- eller astmasymptom eller andningssvårigheter vid inandning. Inandas inte damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. Använd andningsskydd. Vid exponering eller oro: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare. Flytta personen till frisk luft och se till att han eller hon vilar i en ställning som underlättar andningen.

Inledning

Hos många molekylärbiologiska undersökningar av cellulärt RNA är blodprovtagning det första steget. Ett stort problem härvid är instabiliteten hos den cellulära RNA-profilen in vitro. Undersökningar hos PreAnalytiX har visat att antalet kopior av enskilda mRNA-varianter i helblod kan variera mer än tusenfalt under transport eller förvaring vid rumstemperatur.* Detta beror på snabb RNA-nedbrytning och inducerat uttryck hos särskilda gener efter att blod tagits. Sådana förändringar av RNA-profilen förhindrar tillförlitliga resultat vid studier av genuttrycket. Detta gör en metod för att bevara RNA-uttrycksprofilen under och efter blodtagning för en noggrann genuttrycksanalys av humant helblod essentiell.

Princip och utförande

PreAnalytiX har utvecklat ett nytt system som möjliggör tagning, stabilisering, lagring och förvaring av mänskligt helblod, tillsammans med ett snabbt och effektivt protokoll för isolering av intracellulärt RNA. Systemet kräver användning av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; amerikanska patent 6,602,718 och 6,617,170) för blodtagning och samtidig RNA-stabilisering, och PAXgene Blood RNA Kit för anslutande manuell eller automatisk RNA-rening. Både manuella och automatiska protokoll erbjuder i stort motsvarande prestanda avseende RNA-kvalitet och -utbyte. Prestandadata för det manuella protokollet (sidorna 23–30) och det automatiska protokollet (sidorna 33–35) är inkluderade i denna handbok.

Provtagning och stabilisering

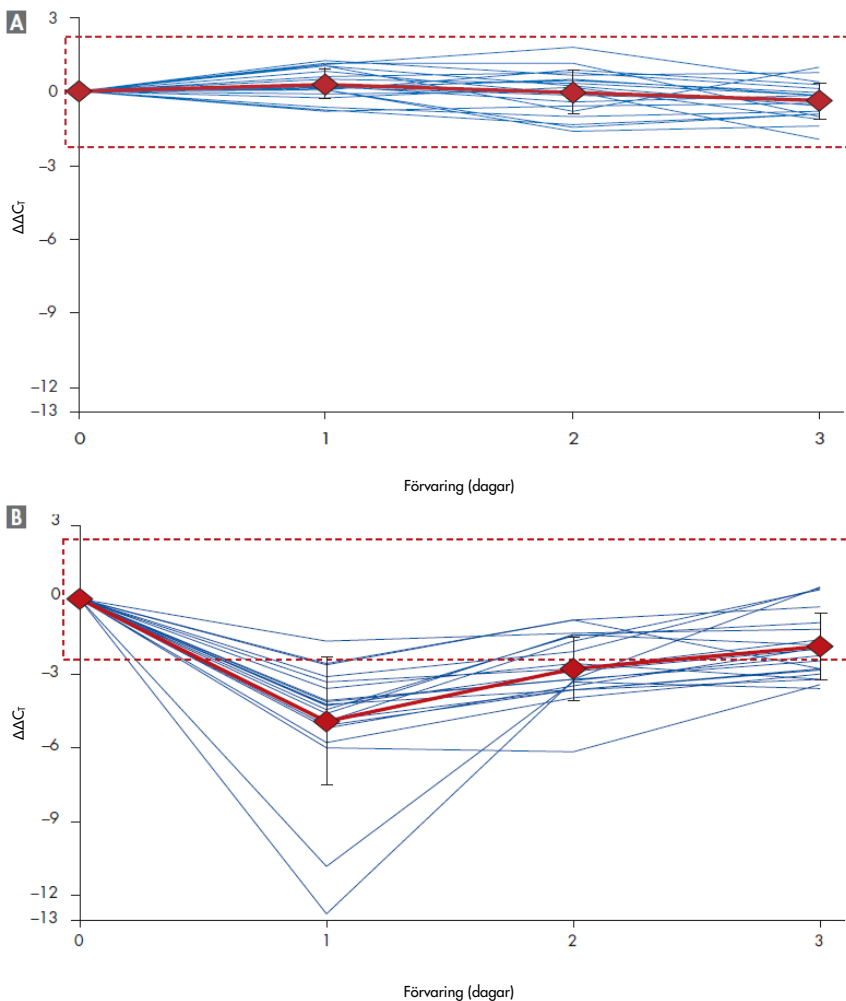
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) innehåller en reagens som baserar på en patenterad RNA-stabiliseringsmetod. Denna reagens skyddar RNA-molekyler mot Rnase orsakad nedbrytning och reducerar ex vivo-förändringar i genuttrycket till ett minimum. PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) är avsedda för tagning av humant helblod och stabiliseringen av cellulära RNA i

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

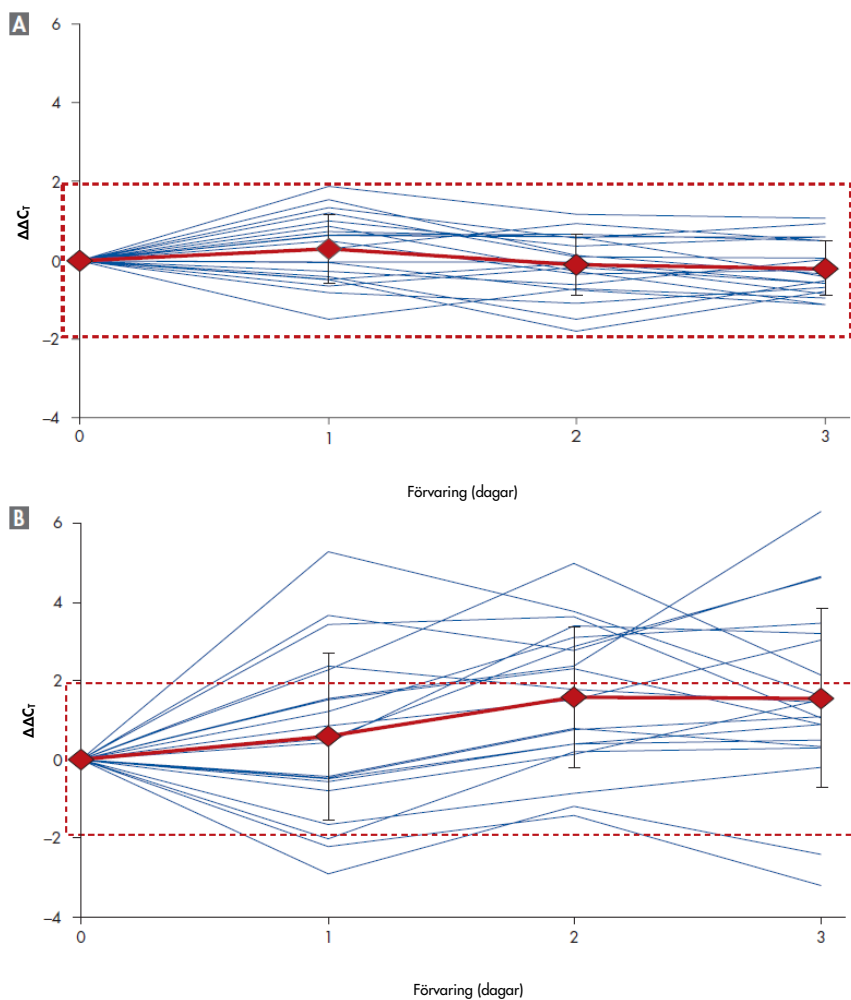
upp till 3 dagar vid 18–25 °C (se Fig. 1 och 2, sidan 16 och 17) eller upp till 5 dagar vid 2–8 °C (se Fig. 3 och 4, sidan 18 och 19). För närvarande visar föreliggande data att cellulärt RNA är stabilt i minst 11 år vid –20 °C eller –70 °C*. Ytterligare information angående studier av stabiliteten efter ännu längre tidsperioder kan erhållas av den tekniska servicen hos QIAGEN.

Den faktiska tiden av RNA-stabiliseringen kan variera beroende på RNA-varianten och den därpå följande applikationen. Prestandaegenskaper kan inte anges för alla transkriptioner, eftersom endast ett begränsat antal RNA-transkriptioner (FOS- och IL1 B-gentranskriptioner) har blivit validerade för de i denna handbok angivna stabiliseringsvillkoren. Laboratoriepersonalen skall kontrollera om egna data eller tillverkarens angivelser kräver en validering för andra transkriptioner än de som har angivits i denna handbok.

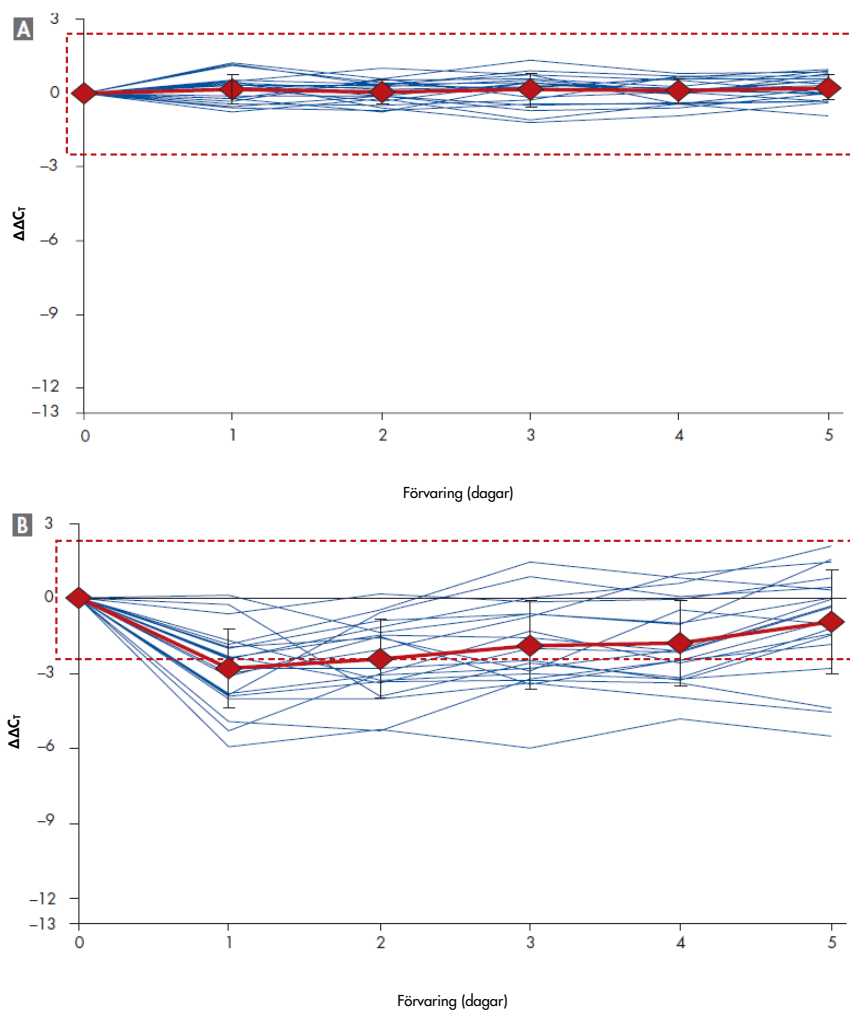
* En långtidsstudie av blodförvaring i PAXgene Blood RNA Tubes pågår.



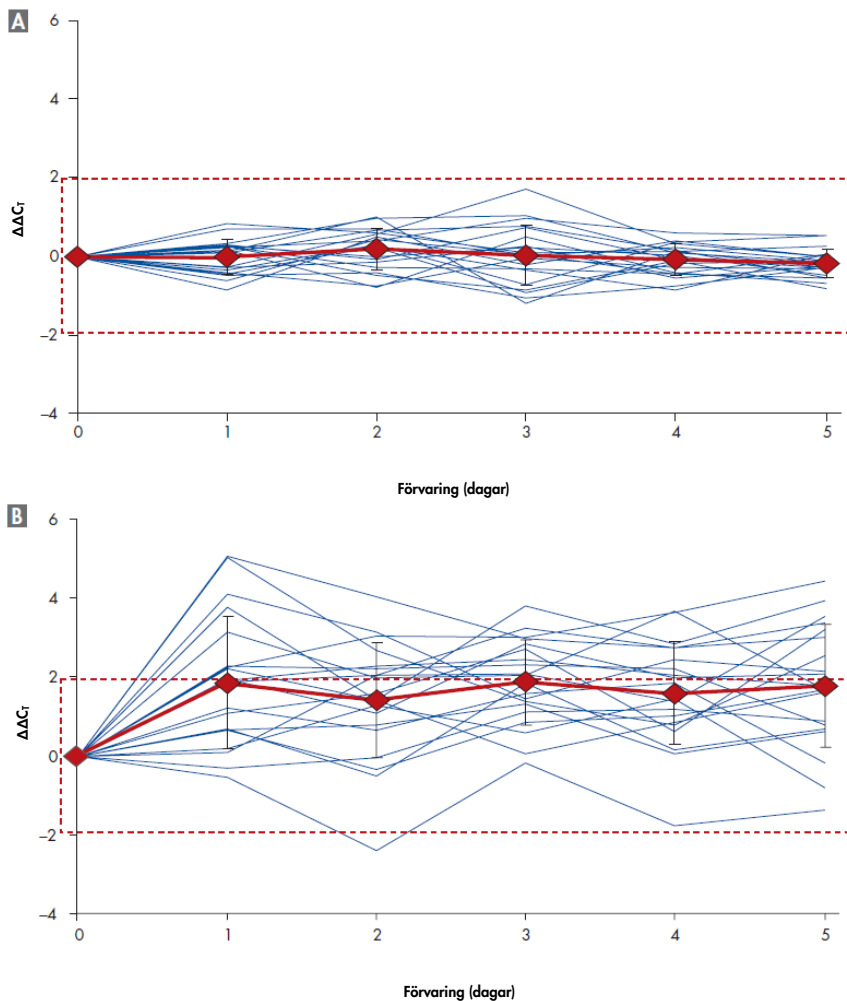
Figur 1. RNA-stabilitet i blodprov vid 18-25 °C: FOS. Blodprov från 10 givare förvarades i angivet antal dagar vid 18-25 °C, innan total RNA renades. Alla prov togs i duplikat. **[A]** Blodtagning och förvaring i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), rening av total RNA med PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Blodtagning och förvaring i standardblodtagningsrör (EDTA som antikoagulant), rening av total RNA med en standardextraktionsmetod (med organiska lösningsmedel) och silica membran-baserad RNA-rening. De relativa koncentrationerna FOS-transkription bestämdes genom realtids duplex RT-PCR, med 18S-rRNA som intern standard. De analyserade provernas värden är angivna med medelvärde och standardavvikelse. Den streckade linjen anger området för metodens mätnoggrannhet $\pm 3 \times$ total precision ($2.34 C_t$).



Figur 2. RNA-stabilitet i blodprov vid 18-25 °C: IL1B. Blodtagning och rening av total RNA efter förvaring vid 18-25 °C genomfördes så som beskrivet i Fig. 1. De relativa koncentrationerna IL1B-transkription bestämdes genom realtids duplex RT-PCR, med 18S-rRNA som intern standard. De analyserade provernas värden är angivna med medelvärde och standardavvikelse. Den streckade linjen anger området för metodens mät noggrannhet $\pm 3 \times$ total precision ($1.93 C_T$).



Figur 3. RNA-stabilitet i blodprov vid 2-8 °C: FOS. Blodprov från 10 givare förvarades i angivet antal dagar vid 2-8 °C, innan total RNA renades. Alla prov togs i duplikat. **[A]** Blodtagning och förvaring i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), rening av total RNA med PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Blodtagning och förvaring i standardblodtagningsrör (EDTA som antikoagulant), rening av total RNA med en standardextraktionsmetod (med organiska lösningsmedel) och silica membran-baserad RNA-rening. De relativa koncentrationerna FOS-transkription bestämdes genom realtids duplex RT-PCR, med 18S-rRNA som intern standard. De analyserade provernas värden är angivna med medelvärde och standardavvikelse. Den streckade linjen anger området för metodens mätnoggrannhet $\pm 3 \times$ total precision (2.34 C_t).



Figur 4. RNA-stabilitet i blodprov vid 2-8 °C: IL1B. Blodtagning och rening av total RNA efter förvaring vid 2-8 °C genomfördes så som beskrivet i Fig. 3. De relativa koncentrationerna IL1B-transkription bestämdes genom realtids duplex RT-PCR, med 18S-rRNA som intern standard. De analyserade provernas värden är angivna med medelvärde och standardavvikelse. Den streckade linjen anger området för metodens mätnoggrannhet $\pm 3 \times$ total precision (1.93 C_t).

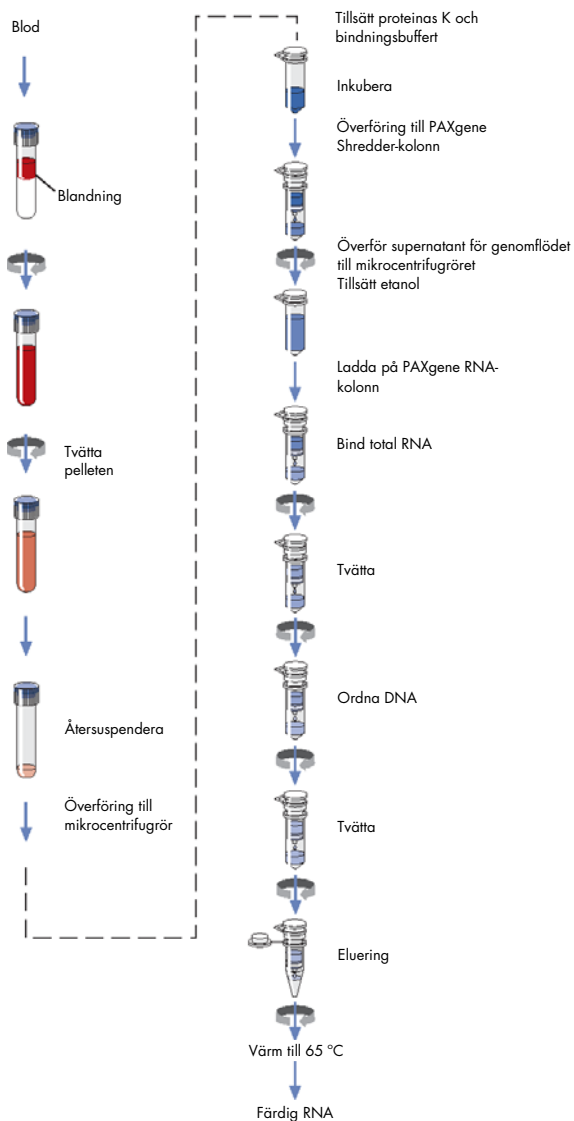
RNA koncentration och rening

PAXgene Blood RNA Kit används för att rena total RNA ur 2,5 ml humant helblod som samlats i PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Proceduren är enkel och kan utföras antingen manuellt eller automatiskt (se figur 5 och 10, sidorna 21 och 31). I båda fallen påbörjas reningen med en centrifugering för att sedimentera nukleinsyror i PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Pelleten blir tvättad och återsuspenderad, följt av manuell eller automatisk RNA-rening. I princip följer båda protokollen samma förfarande med samma satskomponenter.

Manuell RNA-rening

Den återsuspenderade pelleten blir inkuberad i optimerad buffert med proteinas K (PK), för att digestera proteiner. Ytterligare en centrifugering med PAXgene Shredder-kolonnen (PSC) tjänar syftet att homogenisera celllysaten och avlägsna rester av celldebris. Supernatanten av filtratfraktionen förs över till ett nytt mikrocentrifugrör. Etanol tillsätts för att skapa optimala bindningsförhållanden, och lysatet appliceras på en PAXgene RNA-kolonn (PRC). Vid den påföljande korta centrifugeringen binder RNA selektivt på PAXgene-silikonmembranet under pågående kontamination. Resterande kontaminationer avlägsnas genom flera effektiva tvättsteg. Mellan det första och andra tvättsteget inkuberas membranet med DNase I (RNFD), för att avlägsna eventuellt bundna DNA-rester. Efter tvättstegen blir RNA eluerad i elueringsbuffert (BR5) och värmedenaturerad.

Total RNA renad med PAXgene Blood RNA System är ren. Med det manuella protokollet är A_{260}/A_{280} -värdena mellan 1,8 och 2,2 och $\leq 1\%$ (w/w) genom-DNA finns i $\geq 95\%$ av alla prover, enligt kvantitativa mätningar och realtids-PCR av en sekvens av beta-aktinogenen. Minst 95 % av proverna visar ingen hämning i RT-PCR, vid användning av upp till 30 % av eluatet.

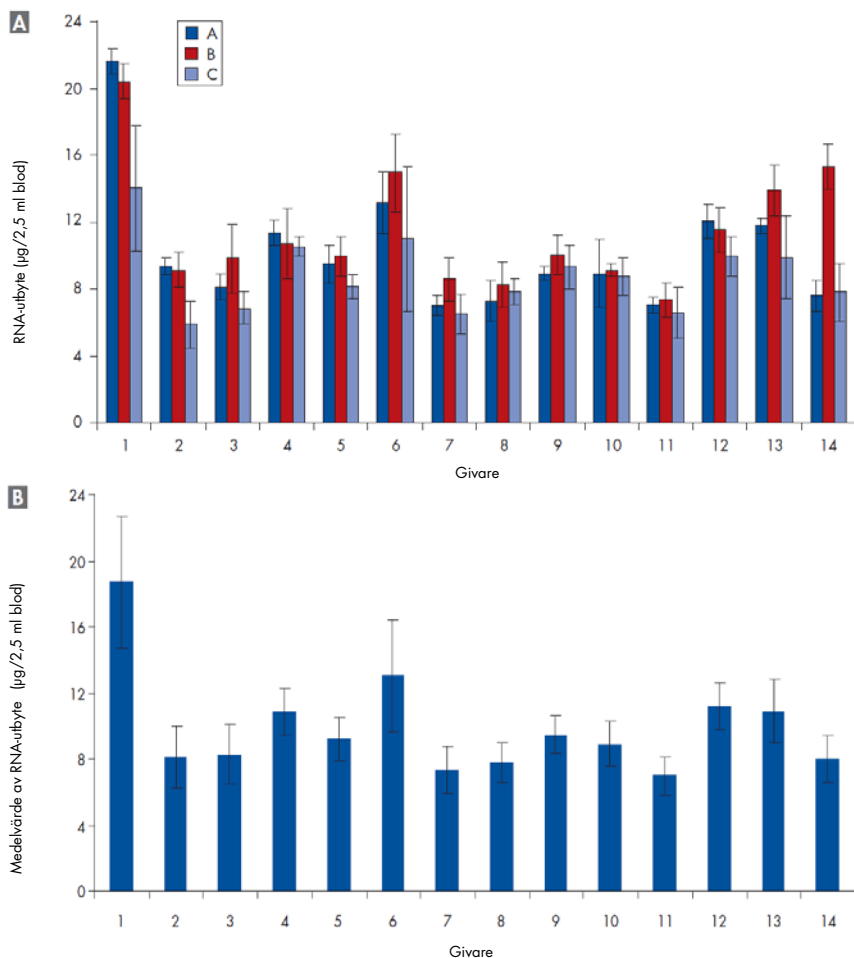


Figur 5. Den manuella PAXgene Blood RNA-proceduren.

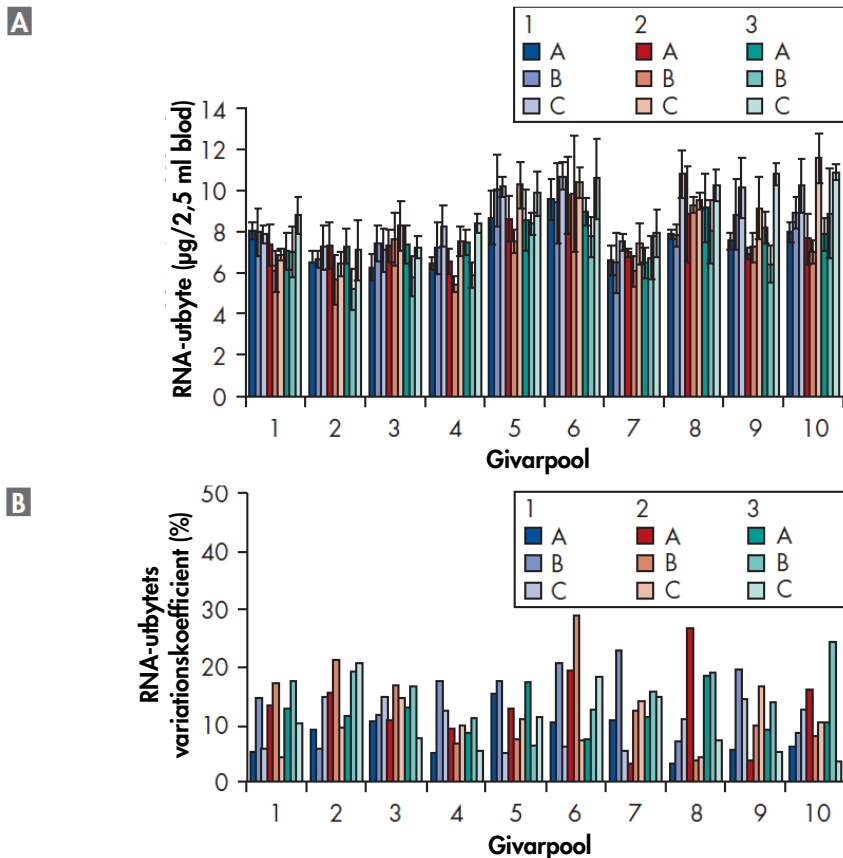
Vid användning av det manuella protokollet är den genomsnittliga tiden för provbearbetning (baserat på 12 genomförda RNA-preparationer) ca 90 minuter*, därav utgör ren hanteringstid ca 40 minuter. Hos mer än 95 % av de bearbetade proven är RNA-utbytet av friska givare $\geq 3 \mu\text{g}$ ur 2,5 ml helblod. Eftersom utbytet till stor del beror på givaren, kan det enskilda RNA-utbytet variera. Vid undersökning av enskilda personer levererar PAXgene Blood RNA System reproducerbara och repeterbara utbyten (se Fig. 6 och 7, sidan 23 och 24) och reproducerbara och repeterbara RT-PCR (se Fig. 8 och 9, sidan 28 och 29), vilket gör det mycket användbart för kliniska undersökningar.

Fig. 6 (sidan 23) visar repeterbarheten och reproducerbarheten hos PAXgene Blood RNA System. I vidare testserier undersöktes olika PAXgene Blood RNA Kit-lotnummer och vilken påverkan laboranten som genomför testet har på reproducerbarheten av RNA-utbytet och realtids-RT-PCR-resultatet. Eftersom poolade blodprov har används istället för prov som tagits individuellt med PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), speglar testets resultat inte hela systemets repeteringsprecision (då detta även tar hänsyn till skillnader i blodtagningen), utan endast RNA-prepareringens repeteringsprecision (se Fig. 7, sidan 24).

* Total protokollkörstid, inklusive initial hantering av PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugeringar, pellettvätt och pelletåtersuspendering).



Figur 6. Reproducerbar och repeterbar RNA-rening. Fyra replikat av blodproven från 14 givare bearbetades manuellt av 3 olika laboranter (A, B, C). Därvid användes tre olika satser laboratorieutrustning, varvid en laborant endast använde en och samma utrustningssats för provbearbetningen. **[A]** Avbildat är medelvärdet av RNA-utbytet (med standardavvikelsen) hos genomförda bestämningar av prov från en och samma givare, utfört av olika laboranter. **[B]** Tolv repeteringar av RNA-reningen av 14 givares blodprov utfördes av 3 laboranter. Avbildat är medelvärdet av RNA-utbytet (med standardavvikelsen) hos genomförda bestämningar av prov av en och samma givare, utfört av alla laboranterna. Hos alla RNA-proven låg A_{260}/A_{280} -absorbansförhållandet mellan 1,8 och 2,2.



Figur 7. Repeterbarhet och reproducerbarhet av RNA-utbyte med olika laboranter och olika lotnummer av PAXgene Blood RNA Kit med poolade blodprov. Blodprov från 30 givare samlades in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) (12 rör per givare, dvs. totalt 360 rör). Innehållet i alla rör av vardera 3 givare blev poolat och i anslutning åter alikvoterat till 36 prov. Dessa 36 proven per pool av tre givare upparbetades manuellt av tre olika laboranter. Varje laborant använde PAXgene Blood RNA Kit ur tre olika lotnummer för RNA-isoleringen och bearbetade fyra replikat ur var och en av de tio givarpoolerna. **[A]** RNA-utbyte och standardavvikelse för varje laborant-lot-kombination. Fyra replikat av blodproven från 10 givare genomfördes av tre olika laboranter (A, B, C), med vars tre satslotnummer (1, 2, 3). Avbildat är det genomsnittliga utbytet (kolonner) och standardavvikelsen (felbalkar) per fyra replikat från en och samma givarpool för olika laboranter och satslotnummer. **[B]** RNA-utbytets variationskoefficient (CV) per givarpool för alla laborant-lotnummer-kombinationer (A, B, C; 1, 2, 3) beräknad med det genomsnittliga utbytet och standardavvikelsen som avbildas i Fig. 7A.

Tabell 1A. Reproducerbarhet inom varje lot och för varje användare för valda givarpooler (1, 6, 9, 10)

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

Tabell 1B. Reproducerbarhet för varje användare och mellan alla lotnummer för valda givarpooler (1, 6, 9, 10)

Kombination av data	Givarpool 1 5,1 x 10 ⁶ celler/ml			Givarpool 6 6,5 x 10 ⁶ celler/ml		
	Medelvärde för utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Medelvärde för utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Användare A, alla lotnummer	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Användare B, alla lotnummer	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Användare C, alla lotnummer	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Kombination av data	Givarpool 9 8,4 x 10 ⁶ celler/ml			Givarpool 10 10,2 x 10 ⁶ celler/ml		
	Medelvärde för utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Medelvärde för utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Användare A, alla lotnummer	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Användare B, alla lotnummer	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Användare C, alla lotnummer	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

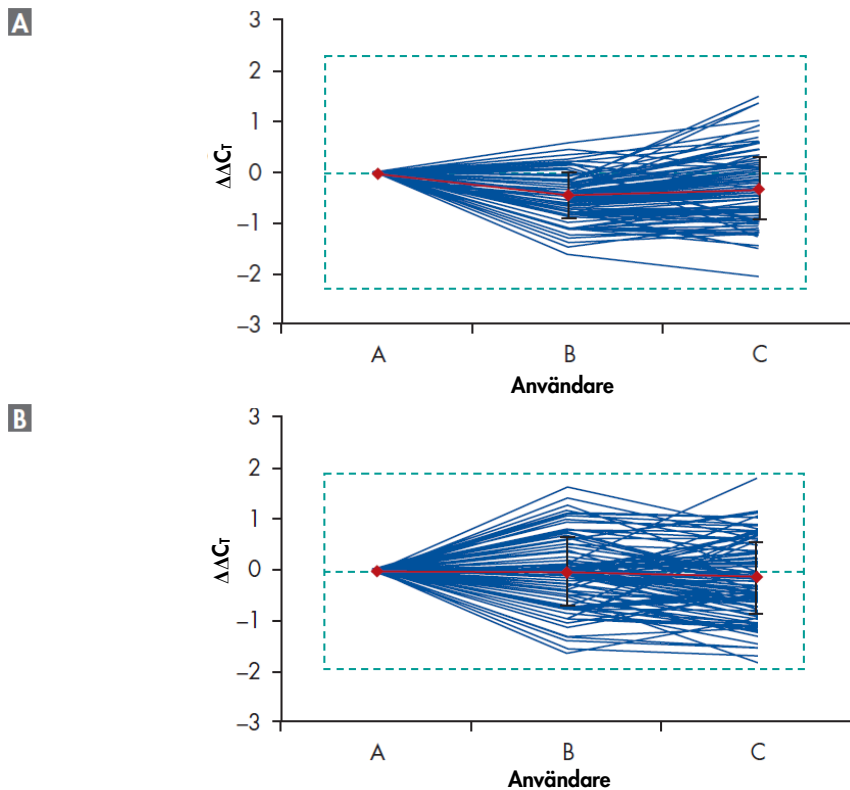
Tabell 1C. Reproducerbarhet inom varje lot och för varje användare för valda givarpooler (1, 6, 9, 10)

Kombination av data	Givarpool 1 5,1 x 10 ⁶ celler/ml			Givarpool 6 6,5 x 10 ⁶ celler/ml		
	Medelvärde för utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Medelvärde för utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Lot 1, alla användare	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Lot 2, alla användare	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Lot 3, alla användare	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Kombination av data	Givarpool 9 8,4 x 10 ⁶ celler/ml			Givarpool 10 10,2 x 10 ⁶ celler/ml		
	Medelvärde för utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Medelvärde för utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Lot 1, alla användare	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Lot 2, alla användare	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Lot 3, alla användare	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

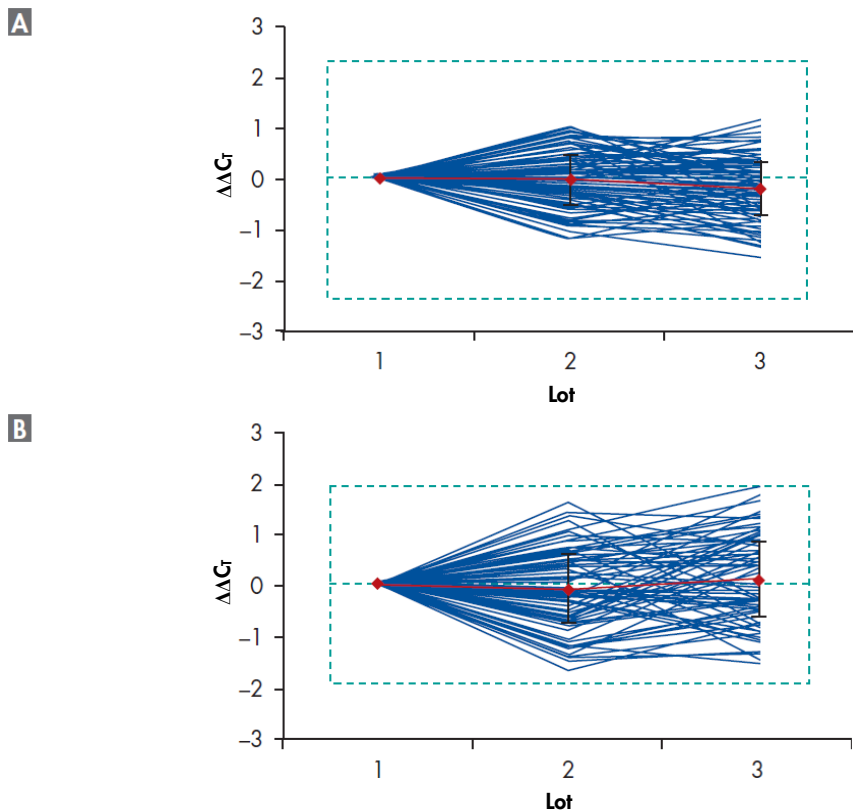
Tabell 1D. Reproducerbarhet mellan alla lotnummer och alla användare för valda givarpooler (1, 6, 9, 10)

Kombination av data	Givarpool 1 5,1 x 10 ⁶ celler/ml			Givarpool 6 6,5 x 10 ⁶ celler/ml		
	Medelvärde för utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Medelvärde för utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Lot 1, alla användare	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
Kombination av data	Givarpool 9 8,4 x 10 ⁶ celler/ml			Givarpool 10 10,2 x 10 ⁶ celler/ml		
	Medelvärde för utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)	Medelvärde för utbyte (µg)	SD (µg)	CV (%)
Lot 1, alla användare	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Detaljerad analys av 4 representativa givarpooler. Poolerna valdes i enlighet med antalet vita blodkroppar och reflekterar de övre, mellersta och lägre värdena av det normala antalet vita blodceller ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leukocyter/ml). Antalet vita celler representerar medelvärdet av de tre vita blodcellsvärdena från 3 givare per givarpool.



Figur 8. Reproducerbarheten för RT-PCR — mellan användare. De RNA-prov som isolerades i experimentet som beskrivs i Fig. 7 användes i realtids-RT-PCR-experimentet. Relativa transkriptioner av **[A]** FOS och **[B]** IL1B bestämdes genom realtids duplex RT-PCR, med 18S-rRNA som intern standard. Avbildat är alla provernas värden relativt till värdena för användare 1 (10 givarpooler x 3 satslotnummer x 4 repetitioner = 120 datauppsättningar för varje gen) med medelvärde (röd linje) och standardavvikelse (svart balk). Den streckade linjen anger $\pm 3 \times$ total precision för metoderna (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).



Figur 9. Reproducerbarheten hos RT-PCR – mellan kit-loter. De RNA-prov som isolerades i experimentet som beskrivs i Fig. 7 användes i realtids-RT-PCR-experimentet. Relativa transkriptioner av **[A]** FOS och **[B]** IL1B bestämdes genom realtids duplex RT-PCR, med 18S-rRNA som intern standard. Avbildat är alla provernas värden relativt till värdena av satslot 1 (10 givarpooler x 3 användare x 4 repetitioner = 120 datauppsättningar för varje gen) med medelvärde (röd linje) och standardavvikelse (svart balk). Den streckade linjen anger $\pm 3 \times$ total precision för metoderna (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

Tabell 2. Sammanfattning av RT-PCR-resultaten från Fig. 8 och 9

Testsystem	FOS/ 18S rRNA-metod		IL1B/18S rRNA-metod	
	Medelvärde ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)	Medelvärde ($\Delta\Delta C_T$)	\pm SD ($\Delta\Delta C_T$)
Reproducerbarheten mellan alla lotnummer för varje laborant				
Alla laboranter, lot 1–lot 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Alla laboranter, lot 1–lot 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Alla laboranter, lot 1–lot 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Reproducerbarheten mellan alla lotnummer för varje laborant				
Alla lotnummer, laborant A–laborant A	0,00	0,00	0,00	0,00
Alla lotnummer, laborant A–laborant B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Alla lotnummer, laborant A–laborant C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Användare: Teknisk assistent som genomförde experimenten.

Lot: Satsens lotnummer.

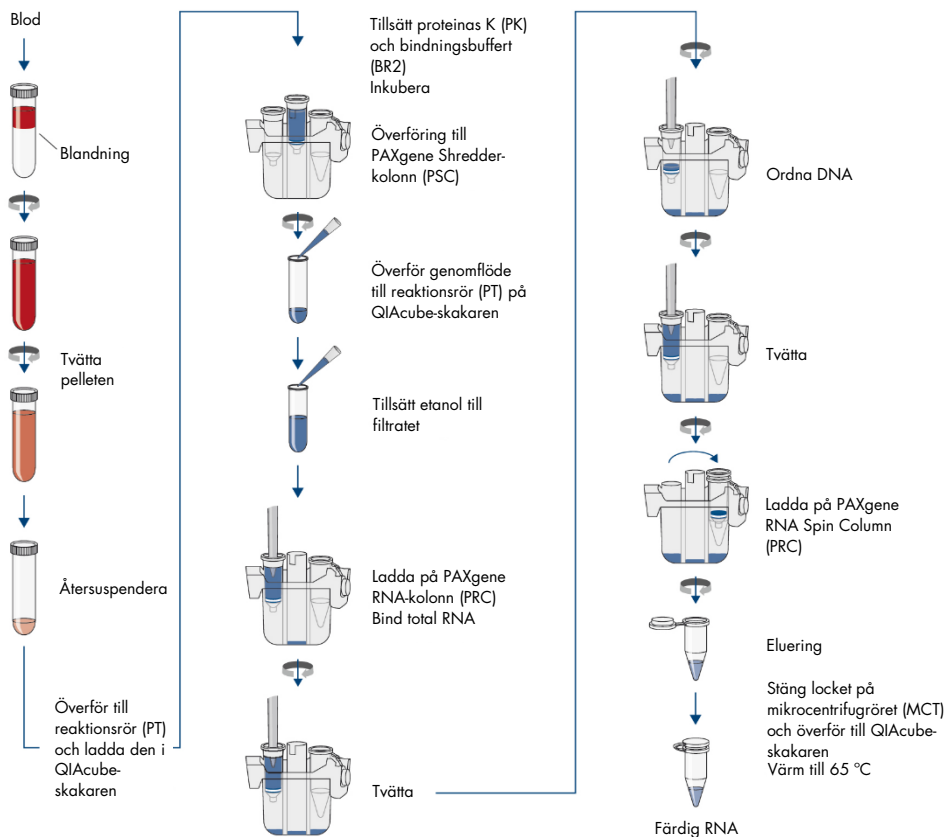
SD: Standardavvikelse.

Medelvärdet för $\Delta\Delta C_T$ (N = 120) och standardavvikelse hos de data som visas i Fig. 8 och 9.

Automatiserad RNA-rening

Provberedningen automatiseras med QIAcube®-standardinstrumentet (kat.nr. 9001882 [110 V], kat.nr. 9001293 [230 V]; ej inklusive QIAcube Connect) och följer samma steg som den manuella proceduren, så att du kan fortsätta att använda PAXgene Blood RNA Kit för rening av högkvalitativt RNA. Se *QIAcube-användarmanualen (QIAcube User Manual)* och www.qiagen.com/MyQIAcube för mer information om QIAcube.

Det automatiska RNA-reningsprotokollet består av 2 delar (eller protokoll), "PAXgene Blood RNA Part A" och "PAXgene Blood RNA Part B", med ett mindre manuellt ingripande mellan de 2 delarna (se Fig. 10, sidan 31).



Figur 10. Den automatiska PAXgene Blood RNA-proceduren.

Den centrifugerade, tvättade och återsuspenderade nukleinsyrapelletten (se "RNA koncentration och rening", sidan 20) överförs från PAXgene Blood RNA Tube (BRT) till reaktionsrör (PT), vilka placeras i termoskakarenheten på QIAcubes arbetsbänk. Laboranten väljer och startar protokoll "PAXgene Blood RNA Part A" från menyn. QIAcube utför stegen i protokollet genom eluering av RNA i elueringsbuffert (BR5). Laboranten överför mikrocentrifugrören (MCT), som

innehåller renad RNA till termoskakarenheten på QIAcube. Laboranten väljer och startar protokollet "PAXgene Blood RNA Part B" från menyn, och värmedenaturering utförs av QIAcube.

Genomsnittlig provberedningstid (baserad på data från 12 provberedningskörningar) är 151 minuter*, med betydligt mindre ren hanteringstid jämfört med det manuella protokollet.

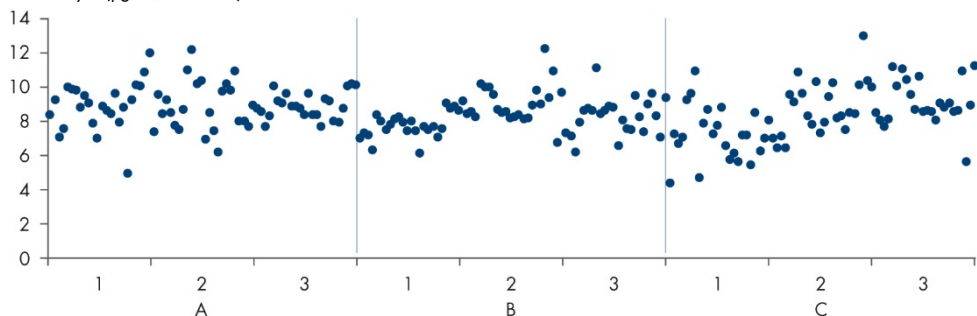
Hos mer än 95 % av de bearbetade proven är RNA-utbytet av friska givare $\geq 3 \mu\text{g}$ ur 2,5 ml helblod. Figur 11 (sidan 33) indikerar RNA-utbytet från totalt 216 prover preparerade med det automatiska protokollet med 3 satslotnummer av 3 laboranter. Eftersom poolade blodprover har använts istället för prov som tagits individuellt med PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) återspeglar testens resultat inte det förväntade RNA-utbytet från enstaka prover av individuella blodtagningar. Eftersom utbytet till stor del beror på givaren, kan det enskilda RNA-utbytet variera (se Fig. 11, sidan 33).

Minst 95 % av proverna visar ingen hämning i RT-PCR, vid användning av upp till 30 % av eluatet. Med det automatiska protokollet är korskontamination mellan proverna oupptäckbar, om mätta som kvantitativa, realtids RT-PCR av sekvenser av ABL1- och FOS-transkriptioner i RNA-negativa prover (vatten) jämfört med RNA-positiva prover (humant helblod) i samma körning.

RNA renat med PAXgene Blood RNA System och det automatiska protokollet är rent, vilket visas genom bristen på RT-PCR-inhibition (se Fig. 11, sidan 33) och A_{260}/A_{280} -värden mellan 1,8 och 2,2. Genom-DNA finns till $\leq 1 \%$ (w/w) i $\geq 95 \%$ av alla prover, mätt som kvantitativa, realtids-PCR av en sekvens av beta-aktinogenen. Figur 12 och 13 (sidorna 33 och 34) visar A_{260}/A_{280} -värden och relativ genom-DNA från totalt 216 prover preparerade med det automatiska protokollet med 3 satslotnummer av 3 laboranter.

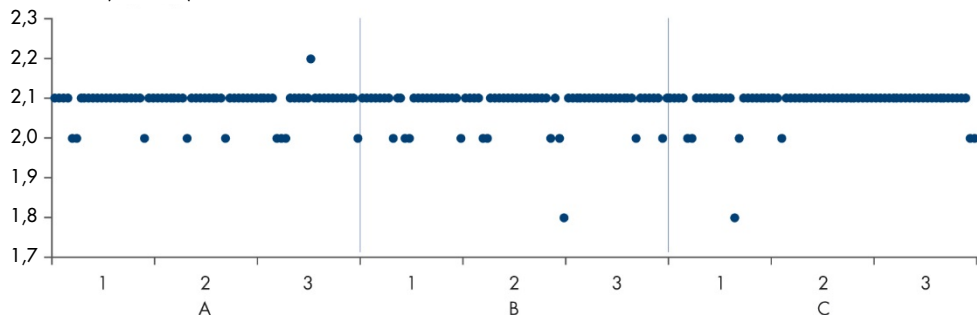
* Total protokollkörstid, inklusive initial hantering av PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugeringar, pellettvätt och pelletåtersuspendering).

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

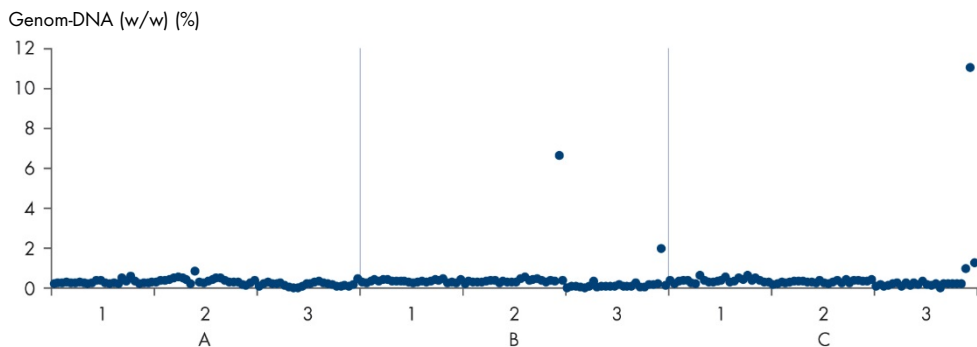


Figur 11. RNA-utbyte – automatisk bearbetning. Blodprov från 36 givare samlades i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) (6 rör per givare, dvs. totalt 216 rör). Innehållet i alla rör av vardera 6 givare blev poolat och i anslutning åter alikvoterat till 36 prov. Dessa 36 proven per pool av 6 givare upparbetades manuellt av tre olika laboranter (A, B, C). Varje laborant använde PAXgene Blood RNA Kit ur tre olika lotnummer (1,2,3) för RNA-isoleringen och bearbetade fyra replikat ur var och en av de 6 poolerna. RNA-utbytet för alla de individuella proven visas för varje laborant-lotnummer-kombination.

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

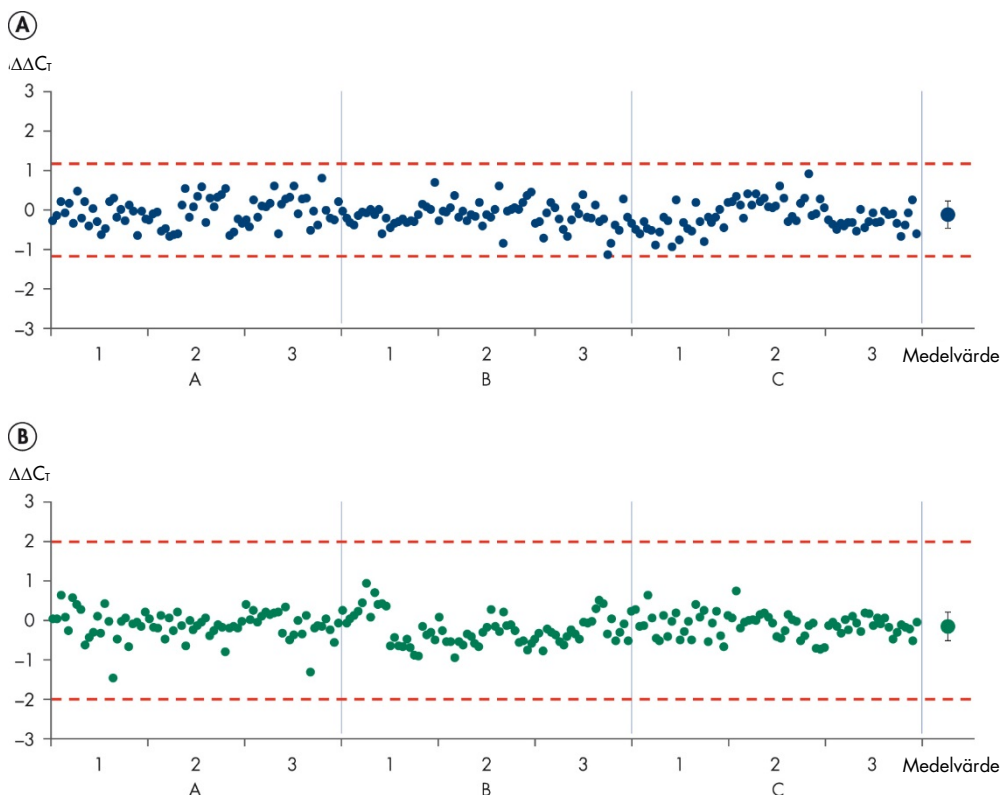


Figur 12. RNA-renhet (A_{260}/A_{280} -värden) – automatisk bearbetning. RNA renades av 3 olika laboranter (A, B, C) med 3 olika lotnummer (1, 2, 3) av PAXgene Blood RNA Kit i experimentet som beskrivs i Fig 11. A_{260}/A_{280} -värden för alla de individuella proven visas för varje laborant-lotnummer-kombination.



Figur 13. RNA-renhet (% Genom-DNA-kontamination) – automatisk bearbetning. RNA renades av 3 olika laboranter (A, B, C) med 3 olika lotnummer (1, 2, 3) av PAXgene Blood RNA Kit i experimentet som beskrivs i Fig 11. Genom-DNA-mängden (w/w) för alla de individuella proverna visas för varje laborant-lotnummer-kombination.

Det automatiska protokollet för RNA-rening med PAXgene Blood RNA-systemet levererar reproducerbara och repeterbara RT-PCR-resultat, som visas i Fig. 14 (sidan 35), vilket gör det mycket användbart för kliniska undersökningar.



Figur 14. Reproducerbarheten hos RT-PCR – mellan automatiska och manuella protokoll. RNA renades av 3 olika laboranter (A, B, C) med 3 olika lotnummer (1, 2, 3) av PAXgene Blood RNA Kit med det automatiska protokollet i experimentet som beskrivs i Fig 11. Samtidigt renades RNA från motsvarande repetitionsrör med det manuella protokollet. Relativa transkriptioner av **[A]** FOS och **[B]** IL1B bestämdes genom realtids duplex RT-PCR, med 18S-rRNA som intern standard. Möjliga skillnader i transkription mellan RNA preparerat från parade blodprover med båda isoleringsprotokollen (automatiska och manuella protokoll) beräknades med $\Delta\Delta C_T$ -metoden. Individuella $\Delta\Delta C_T$ -värden för alla provpar (4 repetitioner x 6 givarpooler x 3 satslotnummer x 3 laboranter = 216 par för varje gen) är angivna som enskilda punkter med medelvärden (större punkter) och standardavvikelse (svarta balkar) för alla prover som visas. Den streckade linjen anger $\pm 3\times$ total precision för metoderna (FOS: 1,16 C_T ; IL1B: 1,98 C_T ; skiftande metodprecision jämfört med Fig. 1–4, 8 och 9 på grund av olika metodversioner).

Utrustning och reagenser som ska tillhandahållas av användaren

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS) som kan erhållas av respektive tillverkare.

För alla protokoll

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, kat.nr. 762165)
- Etanol (96–100 %, renhetsgrad p. a.)
- Pipetter* (10 µl till 4 ml)
- Sterila RNase-fria pipettspetsar med aerosolbarriär†
- Mätcylinder‡
- Centrifug* (med swing-out-rotor och passande centrifugbägare (hållare) för PAXgene Blood RNA Tubes, BRT) med variabel hastighet på 3000-5000 x g
- Vortexblandare*
- Krossad is
- Permanent penna för märkning

* Säkerställ att du har kontrollerat, underhållit och kalibrerat instrumenten regelbundet enligt tillverkarens rekommendationer.

† Se till att du känner till instruktionerna för hantering av RNA (Bilaga A, sidan 64).

‡ För att mäta den etanolmängd som skall tillsättas till buffert BR4-koncentratet.

För det manuella protokollet

- Mikrocentrifug* med variabel hastighet på minst 1000–8000 x g, även om lägre och högre g-krafter kan användas (se protokollstegen för detaljer), och utrustad med en rotor för 2 ml mikrocentrifugrör
- Skakinkubator* som kan inkubera vid 55 °C och 65 °C och skaka med ≥ 400 rpm, inte överstigande 1400 rpm (t.ex. Eppendorf® Thermomixer Compact eller liknande)

För det automatiska protokollet

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

QIAcube-konsumtionsprodukter

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

QIAcube-tillbehör

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

* Säkerställ att du har kontrollerat, underhållit och kalibrerat instrumenten regelbundet enligt tillverkarens rekommendationer.

[†] Även inkluderat i Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, kat.nr. 990395)

Viktiga anmärkningar

Användning av QIAcube

Se till att du känner till hur man använder QIAcube. Läs *QIAcube User Manual* och annan information som medföljer QIAcube, och lägg särskilt märke till säkerhetsinformationen, innan du påbörjar de automatiska PAXgene Blood RNA-protokollen.

Starta QIAcube

Stäng QIAcube-luckan och slå på QIAcube med strömbrytaren (se Fig. 15, sidan 39).

Ett pipande ljud hörs och startskärmen visas. Instrumentet utför själv initialiseringstestet.

Installation av protokoll på QIAcube

Det är nödvändigt att installera protokollet innan den första RNA-prepareringskörningen kan göras på QIAcube. Installera de båda protokollen "PAXgene Blood RNA Part A" och "PAXgene Blood RNA Part B".

Protokollen finns på **www.qiagen.com/MyQIAcube** och måste laddas ner till USB-minnet (som medföljer QIAcube) och överförs till QIAcube via USB-porten.

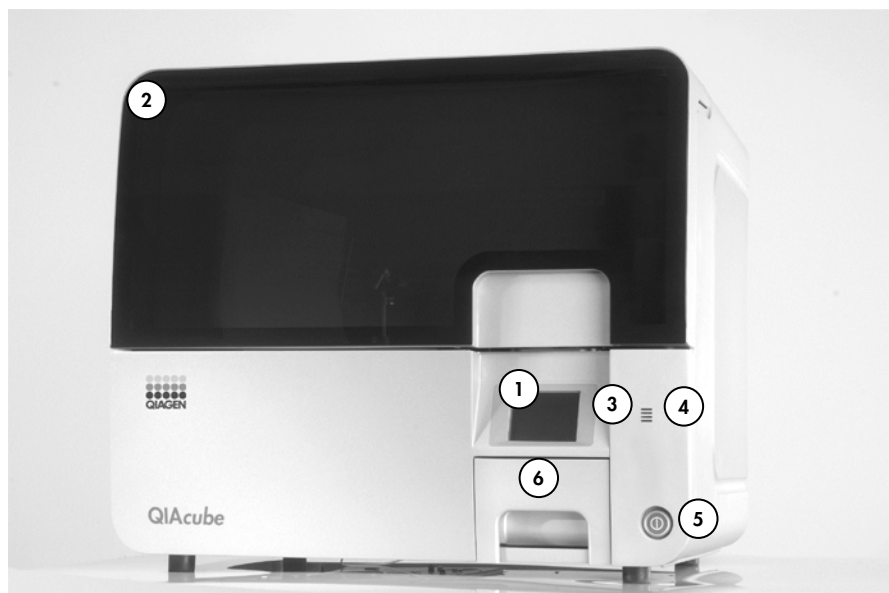
USB-porten, som finns bakom skyddsluckan (se Fig. 15, sidan 39), ansluter QIAcube till ett USB-minne (medföljer QIAcube). Datafiler, såsom loggfiler och rapportfiler, kan också flyttas via USB-porten från QIAcube till USB-minnet.



USB-porten är endast avsedd för användning med QIAGEN:s USB-minne. Anslut inte andra enheter till denna port.



Ta inte bort USB-minnet när du laddar ner protokoll eller överför filer, eller under en protokollkörning.



Figur 15. QIAcube framifrån.

- | | | | |
|---|---|---|-----------------------------|
| 1 | Pekskärm | 4 | USB-port bakom skyddsluckan |
| 2 | Lucka | 5 | Strömbrytare |
| 3 | RS232 serieport bakom skyddsluckan (endast avsedd för QIAGEN:s instrumentservicespecialister) | 6 | Avfallslåda |

Laddning av QIAcube

För att spara tid kan laddningen göras under en (eller båda) av de två 10-minuters centrifugeringsstegen (steg 3 och 5) i "Protokoll: Automatisk rening av total RNA från humant helblod i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)", sidan 56.

Reagensflaskor

Innan varje körning på QIAcube, fyll 4 reagensflaskor med de reagenser som beskrivs i tabell 3 upp till den maximala indikatornivån eller, om det inte är möjligt, till den nivå som tillåts av buffertvolymerna i PAXgene Blood RNA Kit. Märk flaskor och lock tydligt med buffertnamn och placera de fyllda reagensflaskorna på lämpliga positioner i stället för reagensflaskor. Ladda stället på QIAcubes arbetsbänk så som visas (Fig. 16 och 17, sidorna 41 och 42).



Den medföljande volymen BR2-buffert fyller inte en reagensflaska till indikatornivån. BR3- och BR4-buffertar kanske inte fyller flaskan till indikatornivån efter bearbetning av flera prover i tidigare körningar.



Ta bort locken innan de placeras på arbetsbänken.

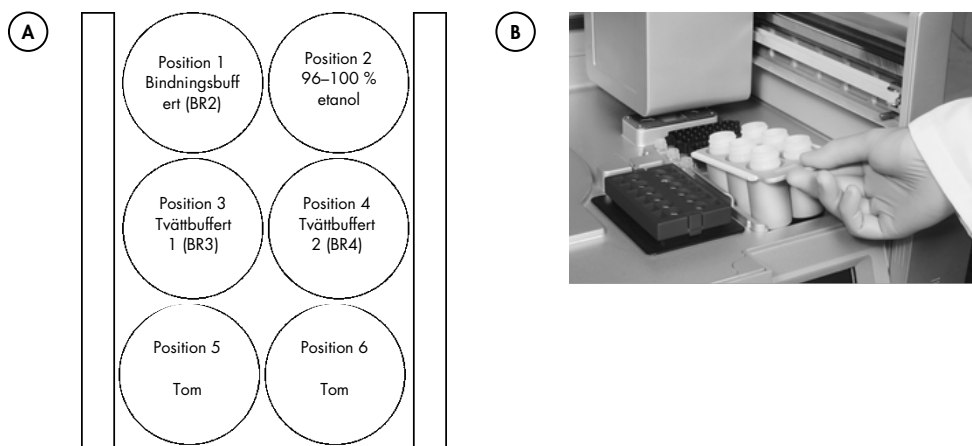


Buffertvolymerna i PAXgene Blood RNA Kit (50) är tillräckliga för maximalt 7 RNA-prepareringskörningar på QIAcube, med 2 till 12 provnummer per körning. I allmänhet bör körningar med lägre provantal undvikas för att bearbeta totalt 50 prov per sats med högst 7 RNA-beredningskörningar. Mer än 7 RNA-beredningskörningar kan leda till otillräckliga buffertvolym för bearbetning av de sista proven.

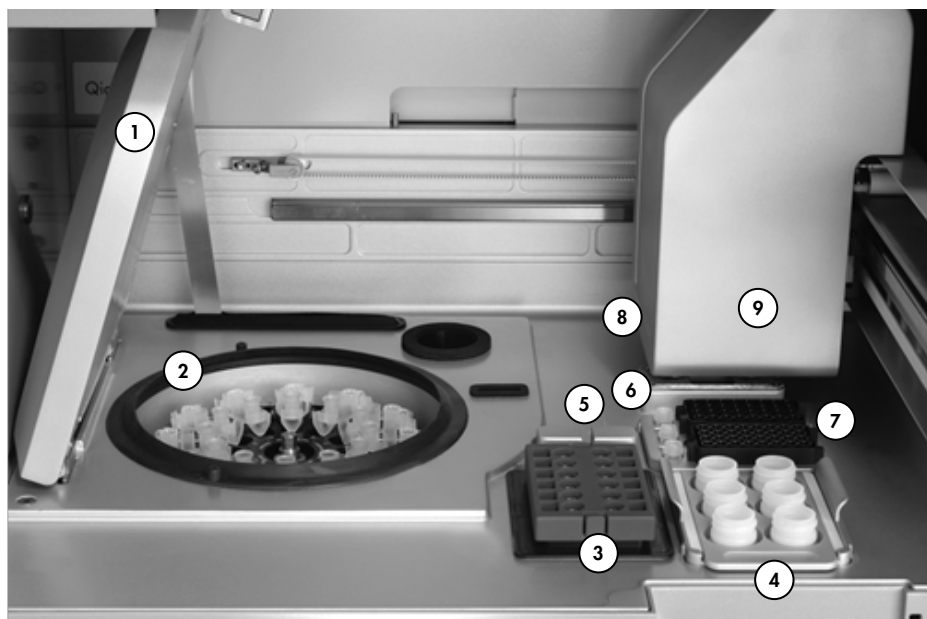
Tabell 3. Positioner i reagensstället

Position	Reagens
1	Bindningsbuffert (BR2)
2	96–100 % etanol
3	Tvättbuffert 1 (BR3)
4	Tvättbuffert 2 (BR4) *
5	– (lämna tom)
6	– (lämna tom)

* Tvättbuffert 2 (BR4) levereras med satsen som koncentrat. Tillsätt den fyrfaldiga volymen etanol (96–100 %, renhetsgrad p. a.) till flaskan (som etiketten anger) innan den används första gången för att framställa den bruksfärdiga arbetslösningen.



Figur 16. Laddning av stället för reagensflaskor. A) Schema för positioner och innehåll i flaskorna i stället för reagensflaskor. **B)** Laddning av stället på QIAcube.



Figur 17. QIAcube inifrån.

- | | |
|----------------------------|---|
| ① Centrifuglock | ⑥ Fack för mikrocentrifugrör |
| ② Centrifug | ⑦ Spetshållare |
| ③ Skakare | ⑧ Kasseringsfack för spetsar och kolonner |
| ④ Ställ för reagensflaskor | ⑨ Robotarm |
| ⑤ Spetssensor | |

Kolonner (PRC, PSC), mikrocentrifugrör (MCT) och QIAcube laboratoriematerial i plast

Placera 2 spetshållare fyllda med Filterspetsar 1000 µl på QIAcube (se Fig. 17, sidan 42). Fyll vid behov på ställen med spetsar.



Använd bara 1000 µl filterspetsar avsedda för användning med QIAcube.

Märk rotoradapterar och mikrocentrifugrör (MCT) för varje prov med en permanent märkpena. Öppna PAXgene Shredder-kolonnerna (PSC) som skall användas och klipp av locken helt med en sax (se Fig. 18, sidan 44).



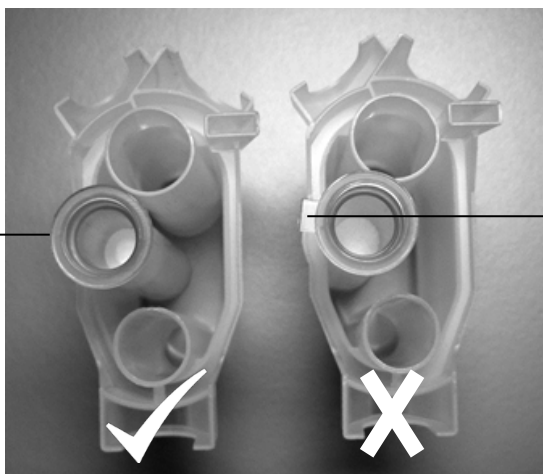
För korrekt användning av QIAcubes robotgripare, ta bort (klipp av) locket och alla plastdelar som går till locket på PAXgene Shredder-kolonnen helt (PSC; se Fig. 16). Annars kan robotgriparen inte greppa kolonnerna (PSC, PRC) ordentligt.

Ladda PAXgene RNA-kolonnen (PRC), PAXgene Shredder-kolonnen (PSC, utan lock), och det märkta mikrocentrifugröret (MCT) i korrekta positioner i varje märkt rotoradapter enligt illustrationen i tabell 4 och Fig. 19 (sidan 44).



Se till att kolonnens (PRC) och mikrocentrifugrörets (MCT) lock är helt nedtryckta i facken på rotoradapterns kant, annars kommer locken att lossna vid centrifugering.

Kolonnlock
korrekt
borttaget



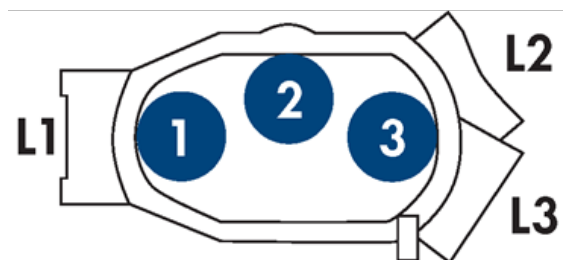
Kolonnlock
felaktigt
borttaget;
delar av lock
finns kvar

Figur 18. Laddning av PAXgene Shredder-kolonnen (PSC). PAXgene Shredder-kolonnen (PSC) laddas i mellanpositionen på rotoradaptorn. Klipp av locket innan kolonnen laddas (PSC).

Tabell 4. Labbprodukter i rotoradaptorn

Position	Reagens	Lockposition
1	PAXgene RNA-kolonn (röd, PRC)	L1
2	PAXgene Shredder-kolonn (lila, PSC) (klipp av lock före placering i rotoradapter)	–
3	Mikrocentrifugrör (MCT)*	L3

* Använd de mikrocentrifugrör (1,5 ml) som medföljer PAXgene Blood RNA Kit.



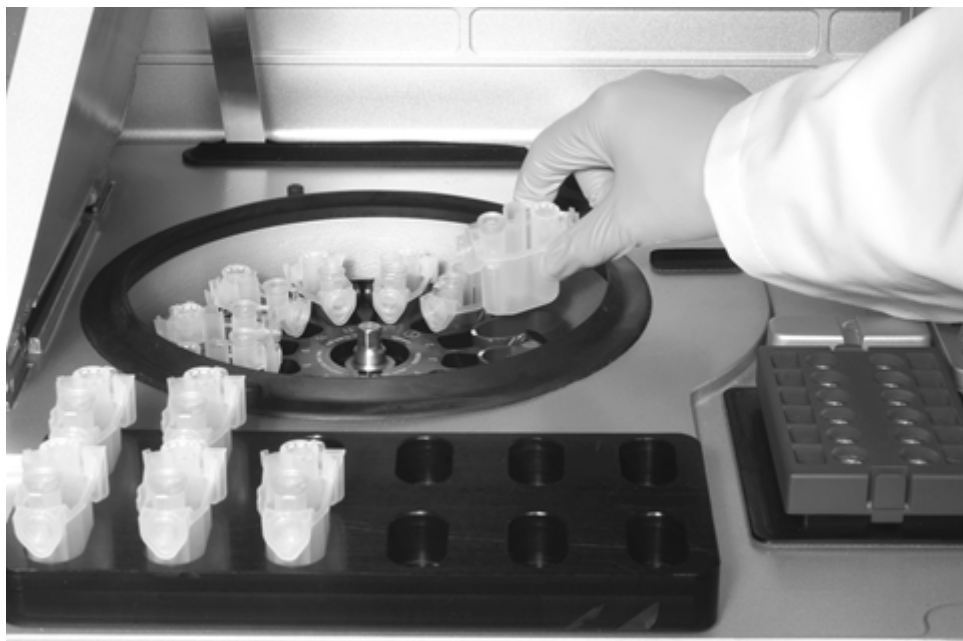
Figur 19. Positioner i rotoradaptorn. Rotoradaptorn har tre rörpositioner (1–3) och tre lockpositioner (L1–L3).

Laddning av centrifugen

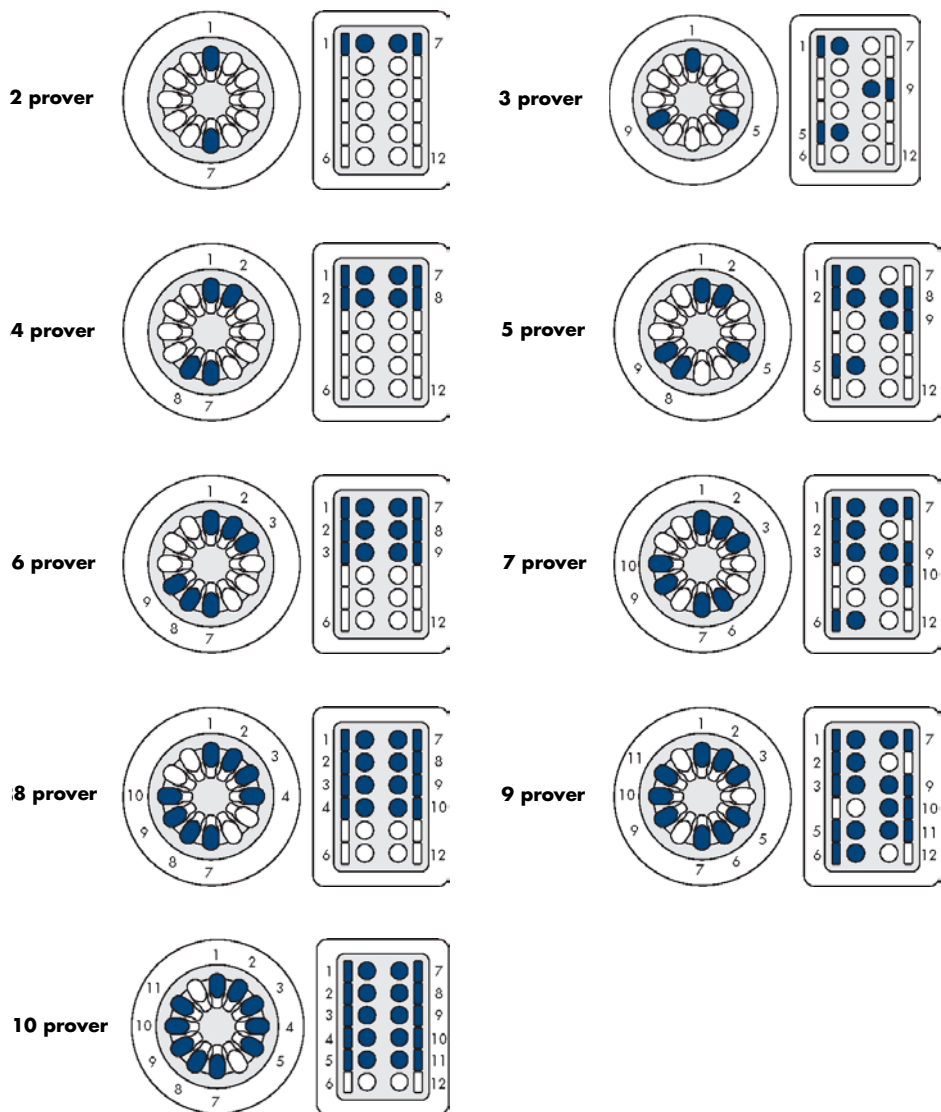
Ladda de monterade rotoradaptrarna i centrifugbägarna enligt illustrationen i Fig. 20 nedan.



Vid bearbetning av färre än 12 prover, se till att ladda centrifugrotorn så att den är radialt balanserad (se Fig. 21, sidan 46). Alla centrifugbägare måste fästas före protokollkörningen, även om färre än 12 prover skall bearbetas. Ett enda prov eller 11 prover kan inte bearbetas.



Figur 20. Laddning av centrifugen. Ladda de monterade rotoradaptrarna i centrifugbägarna.




Figur 21. Laddning av centrifug och skakare. Centrifug- och skakarpositioner visas för bearbetning från två (2 prover) till tio (10 prover) prover. Ett enda prov eller 11 prover kan inte bearbetas.

Reaktionsrör (PT)

Ta bort alla reaktionsrör (PT) som finns kvar i facken för mikrocentrifugrören från tidigare körningar (se Fig. 17, sidan 42). Fyll 3 reaktionsrör (PT) med den mängd reagens som angivits i tabell 5, i enlighet med antalet prover i körningen.

För DNase I-inkubationsblandning, pipettera den angivna mängden DNA-digestionsbuffert (RDD) i ett reaktionsrör (PT), och tillsätt den angivna mängden av DNase I (RNFD)-stamlösningen. Blanda försiktigt genom att pipettera den färdiga blandningen upp och ner 3 gånger med en 1000 µl pipettspets.

Använd reaktionsrör (PT) på 2 ml som medföljer PAXgene Blood  RNA Kit. Märk rören (PT) tydligt med reagensnamn och placera dem på lämplig position i facken för mikrocentrifugrör, så som anges i tabell 6 (sidan 48).



DNase I (RNFD) är mycket känslig för fysikalisk denaturering. Blanda endast genom pipettering, använd pipettspetsar med bred cylinder för att minska skjuvning. En vortex bör inte användas för att blanda.



Se till att endast pipettera den erforderliga mängden som angivits i tabell 5.

Tabell 5. Mängden reagens som behövs i reaktionsrören för mikrocentrifugrörsfacken

Number of samples (Antal prover)	Reagensvolym för det angivna antalet prover (µl)		
	Proteinas K (PK)	DNase I inkubationsblandning	Elueringsbuffert (BR5)
2	126	187 (23 DNase I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNase I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNase I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNase I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNase I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNase I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNase I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNase I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNase I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNase I + 806 Buffer RDD)	1177

Tabell 6. Fack för mikrocentrifugrör

	Position		
	A	B	C
Innehåll	Proteinas K (PK)	DNase I inkubationsblandning	Elueringsbuffert (BR5)
Behållare	Reaktionsrör (PT) *	Reaktionsrör (PT) *	Reaktionsrör (PT) *

* Använd reaktionsrör (PT) på 2 ml som medföljer PAXgene Blood RNA Kit.

Protokoll: Manuell rening av total RNA från humant helblod i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Viktigt att tänka på före start

- Kontrollera att satsen är intakt och oskadat och att buffertbehållarna inte läcker. Använd inga satser med synliga skador.
- Kontrollera att korrekt volym är inställd och att all vätska har sugits upp ordentligt och åter avgivits hos de använda pipetterna.
- För att förhindra att ett prov hamnar i fel reaktionsrör eller i fel kolonn, bör alla reaktionsrör och kolonner namnges noggrant och alla lock markeras med en permanent märkpenna. Markera locken och varje behållare (PT, MCT). Namnge även kolonnernas reaktionsrör (PT). Förslut alltid reaktionsrören och kolonnerna när vätska har tillsatts.
- Om prov- eller buffertvätska spills ut under preparationen kan RNA-utbytet och -renheten påverkas.
- Om inget annat anges, skall alla protokollsteg (inklusive centrifugeringarna) genomföras vid rumstemperatur (15–25 °C).

På grund av den höga sensitiviteten hos nukleinsyra-amplifikationsmetoder skall följande försiktighetsåtgärder följas för att förhindra korskontamination:

- Var försiktig vid pipettering av proven i kolonnerna (PRC, PSC) utan att fukta randen.
- Byt alltid pipettspetsar mellan vätskeöverföringar. Använd pipettspetsar med aerosolbarriärer.
- Se till att membranet i kolonnen (PRC, PSC) inte kommer i kontakt med pipettspetsen vid pipetteringen.

- Efter blandning (vortex) eller upphettning av mikrocentrifugröret (MCT), centrifugera försiktigt för att få bort dropparna från lockets insida.
- Använd laboratoriehandskar under hela processen. Om handskarna kommer i kontakt med provet skall de genast bytas ut.
- Förslut alltid kolonnerna (PRC, PSC) innan de sätts in i mikrocentrifugen. Centrifugera enligt protokollets anviselser.
- Öppna försiktigt endast en kolonn (PRC, PSC) åt gången och undvik aerosolbildning.
- För en effektiv parallellbearbetning av flera prov rekommenderas att ett rack med reaktionsrör (Processing Tubes) förbereds, i vilket kolonnerna kan placeras efter centrifugeringen. Kassera det använda reaktionsröret (PT) tillsammans med filtratet och ställ genast in nya reaktionsrör (PT) med kolonner (PRC, PSC) i mikrocentrifugen.

Saker som ska göras före start

- Genomför blodtagningen i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) enligt anvisningarna i *PAXgene Blood RNA Tube-handboken*. I Bilaga C (på sidan 67) finns en kort handledning om hur PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) används.
- Efter blodtagningen ska PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkuberas i minst 2 timmar vid rumstemperatur för att garantera att blodcellerna har lyserats fullständigt. En inkubation av PAXgene Blood RNA Tube (BRT) över natten kan leda till ett högre utbyte. Om PAXgene Blood RNA Tube (BRT) har förvarats vid 2–8 °C, –20 °C eller –70 °C efter blodtagningen, skall röret först ekvilibreras till rumstemperatur och inkuberas i två timmar före start av protokollet.
- Läs säkerhetsinformationen på sidan 11.
- Läs även "Allmänna hänvisningar angående RNA-hantering" (Bilaga A, sidan 65).
- Se till att alla instrument som används, t.ex. pipetter och skakinkubatorn, kontrolleras och kalibreras regelbundet enligt tillverkarens anviselser.
- En skakinkubator krävs för steg 5 och 20. Ställ in temperaturen för skakinkubatorn på 55 °C.

- I bindningsbufferten (BR2) kan en fällning bildas vid förvaring. Vid behov kan denna lösas upp genom uppvärmning till 37 °C.
- Tvättbuffert 2 (BR4) levereras med satsen som koncentrat. Tillsätt den fyrfaldiga volymen etanol (96–100 %, renhetsgrad p. a.) till flaskan (som etiketten anger) innan den används första gången för att framställa den bruksfärdiga arbetslösningen.
- Innan RNase-Free DNase Set används för första gången skall en DNase I-stamlösning tillredas. Lös upp DNase I (RNFD; 1500 Kunitz-units) * i 550 µl DNase återsuspenderingsbuffert (DRB), som levereras med satsen. Se till att ingen DNase I (RNFD) går förlorad när behållaren öppnas. Rekonstituerad DNase I (RNFD) får inte blandas genom vortexblandning. DNase I är mycket känslig för fysikalisk denaturering. Blanda endast genom att försiktigt vända på röret.
- För närvarande visar föreliggande data att rekonstituerad DNase I (RNFD) som förvaras vid 2-8 °C är stabilt i upp till 6 veckor. Om DNase I (RNFD) skall förvaras en längre tid rekommenderas att dela upp stamlösningen i mindre alikvoter för enstaka bruk (använd medföljande 1,5 ml mikrocentrifugrör [MCT] som räcker för 5 alikvoter) och förvara vid –20 °C i upp till 9 månader. Tinade alikvoter kan förvaras i 2–8 °C i upp till 6 veckor. Frys inte ner upptinade alikvoter.
- Se till att följa "Allmänna hänvisningar angående RNA hantering" (Bilaga A, sidan 65) vid framställning och alikvotering av DNase I-lösningen (RNFD).

* Kunitz units är ett brukligt mått för mätning av DNase I; definierad som den mängd DNase I som orsakar en höjning av A_{260} med 0,001 per minut och milliliter vid 25 °C och pH 5,0, varvid högpolymer DNA används som substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 och 363).

Procedur

1. Centrifugera PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i 10 minuter vid 3 000-5 000 x g med en swing-out-rotor.



Se till att blodprovet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) har inkuberats i minst 2 timmar vid rumstemperatur (15-25 °C) för att garantera att blodcellerna har lyserats fullständigt.



Rotorn skall vara utrustad med adaptrar för rör med rund botten. Om andra typer av adaptrar används kan rören skadas under centrifugeringen.

2. Aspirera försiktigt supernatanten genom att dekantera eller pipettera. Tillsätt 4 ml RNase-fritt vatten (RNFW) på pelletten och stäng röret med en ny BD Hemogard-säkerhetsförslutning (medföljer satsen).

Se till att pelletten inte störs om supernatanten dekanteras, och torka rörets rand med en ren pappershandduk.

3. Vortexa pelletten tills den har återsuspenderats och centrifugera i 10 minuter vid 3 000-5 000 x g med en swing-out-rotor. Ta därefter bort och kasta hela supernatanten.

Mindre celldebris som är kvar i supernatanten, efter skakningen men före centrifugeringen, stör inte den fortsatta proceduren.



Däremot kan lyseringen hämmas och lysatet spädas om supernatanten inte aspireras fullständigt, och på så vis påverka förutsättningarna för RNA att binda på PAXgene-membranet.

4. Tillsätt 350 µl återsuspenderingsbuffert (BR1) och vortexblanda tills pelletten är fullständigt återsuspenderad.
5. För över provet till ett 1,5 ml mikrocentrifugrör (MCT) med en pipett. Tillsätt 300 µl bindningsbuffert (BR2) och 40 µl proteinas K (PK). Blanda i ca 5 sekunder (vortexa) och inkubera i 10 minuter vid 55 °C i en skakinkubator med en hastighet på 400-1400 rpm. Höj temperaturen hos skakinkubatorn till 65 °C (för steg 20) efter inkubationen.



Blanda inte bindningsbuffert (BR2) och proteinas K (PK) innan de tillsätts till provet.

6. Pipettera lysatet direkt i en PAXgene Shredder-kolonn (PSC, lila), som ställts i ett 2 ml reaktionsrör (PT), och centrifugera i 3 minuter med maximalt varvtal (max. 20 000 x g).



För försiktigt över hela lysatet med en pipett till kolonnen (PSC) och kontrollera visuellt att lysatet är helt överförd till kolonnen (PSC).

För att undvika att kolonnerna (PSC) eller rören (PT) skadas skall man inte centrifugera med mer än 20 000 x g.



Vissa prover kan flöda igenom PAXgene Shredder-kolonnen (PSC) utan centrifugering. Detta beror på den låga viskositeten hos vissa prover och ska inte anses som ett tecken på produktfel.

7. För därefter över hela supernatanten, utan att virvla upp pelletten i reaktionsröret, till ett nytt 1,5 ml mikrocentrifugrör (MCT).

8. Pipettera därtill 350 µl etanol (96-100 %, renhetsgrad p. a.). Blanda (vortexa) och centrifugera kort (1-2 sekunder vid 500-1 000 x g), för att avlägsna provvätska på insidan av locket.



Man skall inte centrifugera längre än 1-2 sekunder, då detta eventuellt kan leda till sedimentering av nukleinsyror och därmed till ett reducerat utbyte av total RNA.

9. Pipettera 700 µl av provet i en PAXgene RNA-kolonn (PRC, röd), som placerats i ett 2 ml reaktionsrör (PT), och centrifugera i 1 minut vid 8 000–20 000 x g. För över kolonnen (PRC) till ett nytt 2 ml reaktionsrör (PT) och kasta det använda reaktionsröret (PT) samt filtratet.

10. Pipettera resten av provet i en PAXgene RNA-kolonn (PRC) och centrifugera igen i 1 minut vid 8 000–20 000 x g. För över kolonnen (PRC) till ett nytt 2 ml reaktionsrör (PT) och kasta det använda reaktionsröret (PT) samt filtratet.



För försiktigt över provet med en pipett till kolonnen (PSC) och kontrollera visuellt att provet är helt överfört till kolonnen (PSC).

11. Tillsätt 350 µl tvättbuffert 1 (BR3) i PAXgene RNA-kolonnen (PRC). Centrifugera i 1 minut vid 8 000-20 000 x g. För över kolonnen (PRC) till ett nytt 2 ml reaktionsrör (PT) och kasta det använda reaktionsröret (PT) samt filtratet.

12. Pipettera 10 µl DNase-I (RNFD) stamlösning till 70 µl DNA digestionsbuffert (RDD) i ett 1,5 ml mikrocentrifugrör (MCT). Blanda genom att försiktigt "snäppa" med fingrarna på röret och centrifugera kort för att samla vätskeresterna från rörets sidor.

För att bearbeta t.ex. 10 prov, pipetteras 100 µl DNase-I (RNFD) stamlösning till 700 µl DNA digestionsbuffert (RDD). Använd 1,5 ml mikrocentrifugrör (MCT) som levereras med satsen.



DNase I (RNFD) är mycket känslig för fysikalisk denaturering. Blanda lösningen genom att försiktigt "snäppa" med fingrarna på röret. En vortex bör inte användas för att blanda.

13. Pipettera DNase-I (RNFD)-inkubationsblandningen (80 µl) direkt på membranet i PAXgene RNA-kolonnen (PRC) och inkubera i 15 minuter vid 20–30 °C.



Se till att DNase-I (RNFD) inkubationsblandningen hamnar direkt på membranet. Digestionen med DNase kan förlöpa ofullständigt om en del av blandningen sitter fast på innerväggen eller på O-ringen av kolonnen (PRC).

14. Pipettera 350 µl tvättbuffert 1 (BR3) i PAXgene RNA-kolonnen (PRC), och centrifugera i 1 minut vid 8 000-20 000 x g. För över kolonnen (PRC) till ett nytt 2 ml reaktionsrör (PT) och kasta det använda reaktionsröret (PT) samt filtratet.

15. Pipettera 500 µl tvättbuffert 2 (BR4) i PAXgene RNA-kolonnen (PRC), och centrifugera i 1 minut vid 8 000-20 000 x g. För över kolonnen (PRC) till ett nytt 2 ml reaktionsrör (PT) och kasta det använda reaktionsröret (PT) samt filtratet.



Tvättbuffert 2 (BR4) levereras med satsen som koncentrat. Se till att etanol tillsätts till tvättbuffert 2 (BR4) innan den används första gången (se "Saker som bör göras före start" på sidan 50).

16. Tillsätt ytterligare 500 µl tvättbuffert 2 (BR4) i PAXgene RNA-kolonnen (PRC). Centrifugera i 3 minuter vid 8 000-20 000 x g.

17. För över PAXgene RNA-kolonnen (PRC) till ett nytt 2 ml reaktionsrör (PT) och kasta det använda reaktionsröret (PT) samt filtratet. Centrifugera i 1 minut vid 8 000-20 000 x g.

18. Kasta reaktionsröret (PT) samt filtratet. För över PAXgene RNA-kolonnen (PRC) till ett 1,5 ml mikrocentrifugrör (MCT) och pipettera 40 µl elueringsbuffert (BR5) direkt på membranet i PAXgene RNA-kolonnen (PRC). Centrifugera i 1 minut vid 8 000-20 000 x g för att eluera RNA.

För att uppnå maximal eluerungseffektivitet är det viktigt att hela membranet fuktas med elueringsbuffert (BR5).

19. Upprepa eleringssteget (steg 18) enligt beskrivning, med 40 µl elueringsbuffert (BR5) och med samma mikrocentrifugrör (MCT).

20. Inkubera eluatet i 5 minuter vid 65 °C i en skakinkubator (se steg 5), dock utan att skaka. Kyl därefter proven på is.

Genom inkubationen vid 65 °C denatureras RNA för påföljande applikationer. Överskrid varken inkubationstiden eller -temperaturen.

21. Om RNA-proverna inte används direkt, skall de förvaras vid –20 °C eller –70 °C.

Eftersom RNA även efter upprepad nedfrysning och upptining förblir denaturerat, är det inte nödvändigt att upprepa inkubationen vid 65 °C. Om RNA-proven skall användas för en diagnostisk metod skall tillverkarens angivelser följas.

Vi rekommenderar spädning av prover med 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 för korrekt kvantifiering av RNA genom absorbans vid 260 nm.* Spädning av provet i RNase-fritt vatten kan leda till felaktigt låga värden.

För att ställa in spektrofotometerens nollpunkt skall ett blankprov (blank) användas, vars sammansättning av elueringsbuffert (BR5) och Tris-HCl-buffert motsvarar proven som skall mätas. Elueringsbufferten (BR5) absorberar kraftigt vid 220 nm, vilket kan leda till höga bakgrundsabsorbansvärden om spektrofotometerens nollpunkt inte har ställts in korrekt.

OBS! För att bestämma koncentrationen i Tris-HCl-buffert, använd förhållandet

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$. Se Bilaga B, sidan 66.

* Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS) som kan erhållas av respektive tillverkare.

Protokoll: Automatisk rening av total RNA från humant helblod i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Viktigt att tänka på före start

- Kontrollera att satsen är intakt och oskadat och att buffertbehållarna inte läcker. Använd inga satser med synliga skador.
- Kontrollera att korrekt volym är inställd och att all vätska har sugits upp ordentligt och åter avgivits hos de använda pipetterna.
- För att förhindra att ett prov hamnar i fel rör eller i fel plastbehållare, bör alla reaktionsrör (PT), mikrocentrifugrör (MCT) och rotoradapterar namnges noggrant med en permanent penna. Markera locken samt varje del av varje mikrocentrifugrör (MCT), kolonnernas reaktionsrör (PT) samt utsidan av varje rotoradapter.
- Om prov- eller buffertvätska spills ut under preparationen kan RNA-utbytet och -renheten påverkas.
- Om inget annat anges, skall alla protokollsteg (inklusive centrifugeringarna) genomföras vid rumstemperatur (15–25 °C).

På grund av den höga sensitiviteten hos nukleinsyra-amplifikationsmetoder skall följande försiktighetsåtgärder följas för att förhindra korskontamination:

- Pipettera försiktigt över provet till reaktionsröret (PT), på botten av varje rör utan att fukta kanten på röret.
- Byt alltid pipettspetsar mellan vätskeöverföringar. Använd pipettspetsar med aerosolbarriärer.

- Se till att membranet i kolonnen (PRC, PSC) inte kommer i kontakt med pipettspetsen vid pipetteringen.
- Efter blandning (vortex) eller upphettning av mikrocentrifugröret (MCT), centrifugera försiktigt för att få bort dropparna från lockets insida.
- Använd laboratoriehandskar under hela processen. Om handskarna kommer i kontakt med provet skall de genast bytas ut.

Saker som ska göras före start

- Genomför blodtagningen i PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) enligt anvisningarna i *PAXgene Blood RNA Tube-handboken*. I Bilaga C (på sidan 67) finns en kort handledning om hur PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) används.
- Efter blodtagningen ska PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) inkuberas i minst 2 timmar vid rumstemperatur för att garantera att blodcellerna har lyserats fullständigt. En inkubation av PAXgene Blood RNA Tube (BRT) över natten kan leda till ett högre utbyte. Om PAXgene Blood RNA Tube (BRT) har förvarats vid 2–8 °C, –20 °C eller –70 °C efter blodtagningen, skall röret först ekvibreras till rumstemperatur och inkuberas i två timmar före start av protokollet.
- Läs säkerhetsinformationen på sidan 11.
- Läs "Viktiga anmärkningar", sidan 38.
- Läs även "Allmänna hänvisningar angående RNA-hantering" (Bilaga A, sidan 65).
- Läs *QIAcube User Manual* och annan information som medföljer QIAcube, och lägg särskilt märke till säkerhetsinformationen.
- Se till att alla instrument som används, såsom t.ex. pipetter och QIAcube, kontrolleras och kalibreras regelbundet enligt tillverkarens anviselser.
- I bindningsbufferten (BR2) kan en fällning bildas vid förvaring. Vid behov kan denna lösas upp genom uppvärmning till 37 °C.

- Tvättbuffert 2 (BR4) levereras med satsen som koncentrat. Tillsätt den fyrfaldiga volymen etanol (96–100 %, renhetsgrad p. a.) till flaskan (som etiketten anger) innan den används första gången för att framställa den bruksfärdiga arbetslösningen.
- Innan RNase-Free DNase Set används för första gången skall en DNase I-stamlösning tillredas. Lös upp DNase I (RNFD; 1500 Kunitz-units)* i 550 µl DNase återsuspenderingsbuffert (DRB), som levereras med satsen. Se till att ingen DNase I (RNFD) går förlorad när behållaren öppnas. Rekonstituerad DNase I (RNFD) får inte blandas genom vortexblandning. DNase I (RNFD) är mycket känslig för fysikalisk denaturering. Blanda endast genom att försiktigt vända på röret.
- För närvarande visar föreliggande data att rekonstituerad DNase I (RNFD) som förvaras vid 2-8 °C är stabilt i upp till 6 veckor. Om DNase I (RNFD) skall förvaras en längre tid rekommenderas att dela upp stamlösningen i mindre aliquoter för enstaka bruk (använd medföljande 1,5 ml mikrocentrifugrör [MCT] som räcker för 5 aliquoter) och förvara vid –20 °C i upp till 9 månader. Tinade aliquoter kan förvaras i 2–8 °C i upp till 6 veckor. Frys inte ner upptinade aliquoter.
- Se till att följa "Allmänna hänvisningar angående RNA hantering" (Bilaga A, sidan 65) vid framställning och aliquotering av DNase I-lösningen (RNFD).
- Installera korrekt skakadapter (medföljer QIAcube, använd adaptern för 2 ml säkerhetslocskrör, märkta med "2") och placera skakstället ovanpå adaptern.
- Kontrollera avfallsbrickan och töm vid behov.
- Installera protokollen om detta inte gjorts vid tidigare körningar. Installera de båda protokollen "PAXgene Blood RNA Part A" och "PAXgene Blood RNA Part B". Se "Installation av protokoll på QIAcube", sidan 38.

* Kunitz units är ett brukligt mått för mätning av DNase I; definierad som den mängd DNase I som orsakar en höjning av A_{260} med 0,001 per minut och milliliter vid 25 °C och pH 5,0, varvid högpolymer DNA används som substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 och 363).

Procedur

1. Stäng QIAcube-luckan och slå på QIAcube med strömbrytaren (se Fig. 15, sidan 39).
Ett pipande ljud hörs och startskärmen visas. Instrumentet utför själv initialiseringstestet.
2. Öppna QIAcube-luckan, ladda de nödvändiga reagenserna och plastdelarna i QIAcube.
Se "Laddning av QIAcube", sidan 39.

För att spara tid kan laddningen göras under en av eller bägge de följande 10-minuters centrifugeringsstegen (steg 3 och 5).

3. Centrifugera PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i 10 minuter vid 3 000-5 000 x g med en swing-out-rotor.



Se till att blodprovet i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) har inkuberats i minst 2 timmar vid rumstemperatur (15-25 °C) för att garantera att blodcellerna har lyserats fullständigt.



Rotorn skall vara utrustad med adaptrar för rör med rund botten. Om andra typer av adaptrar används kan rören skadas under centrifugeringen.

4. Aspirera försiktigt supernatanten genom att dekantera eller pipettera. Tillsätt 4 ml RNase-fritt vatten (RNFW) på pelletten och stäng röret med en ny BD Hemogard-säkerhetsförslutning (medföljer satsen).

Se till att pelletten inte störs om supernatanten dekanteras, och torka rörets rand med en ren pappershandduk.

5. Vortexa pelletten tills den har återsuspenderats och centrifugera i 10 minuter vid 3 000-5 000 x g med en swing-out-rotor. Ta därefter bort och kasta hela supernatanten.

Mindre celldebris som är kvar i supernatanten, efter skakningen men före centrifugeringen, stör inte den fortsatta proceduren.



Däremot kan lyseringen hämmas och lysatet spädas om supernatanten inte aspireras fullständigt, och på så vis påverka förutsättningarna för RNA att binda på PAXgene-membranet.

6. Tillsätt 350 µl återsuspenderingsbuffert (BR1) och vortexblanda tills pelletten är fullständigt återsuspenderad.

7. För över provet till ett 2 ml reaktionsrör (PT) med en pipett.



Använd reaktionsrör (PT) på 2 ml som medföljer PAXgene Blood ¹¹_{SEP} RNA Kit.

8. Ladda de öppna reaktionsrören (PT) med prover i QIAcube-skakaren (se Fig. 17, sidan 42). Provmpositionerna är numrerade för enkel laddning. Sätt fast skakställets pluggar (medföljer QIAcube) i facken på kanten av skakstället bredvid varje reaktionsrör. Detta möjliggör upptäckt av prover under laddningskontrollen.



Se till att korrekt skakadapter (Skakadapter, 2 ml, säkerhetslocks rör, märkta med "2", medföljer QIAcube) är installerad.



Vid bearbetning av färre än 12 prover, se till att ladda skakstället enligt Fig. 21, sidan 46. Ett enda prov eller 11 prover kan inte bearbetas.

9. Stäng QIAcube-instrumentluckan (se Fig. 15, sidan 39).

10. Välj protokoll "PAXgene Blood RNA Part A" och starta protokollet.

Följ instruktionerna som visas på QIAcubes pekskärm.



Se till att båda programdelarna (del A och del B) är installerade på QIAcube-instrumentet (se "Installation av protokoll på QIAcube", sidan 38).



QIAcube kommer att utföra laddningskontroller för prover, spetsar, rotoradapterar och reagensflaskor.

11. När "PAXgene Blood RNA Part A"-protokollet är klart, kan QIAcube-instrumentluckan öppnas (se Fig. 15, sidan 39). Ta bort och kassera PAXgene RNA-kolonnerna (PRC) från rotoradapterarna och de tomma reaktionsrören (PT) från skakaren.



Under körningen överförs kolonnerna från rotoradapterposition 1 (lockposition L1) till rotoradapterposition 3 (lockposition L2) av instrumentet (se Fig. 19, sidan 44).

12. Stäng locken på alla 1,5 ml mikrocentrifugrör (MCT) som innehåller renad RNA i rotoradapterarna (position 3, lockposition L3, se Fig. 19, sidan 44). Överför mikrocentrifugrören (MCT) på 1,5 ml till QIAcube-skakadaptern (se Fig. 17, sidan 42).

13. Stäng QIAcube-instrumentluckan (se Fig. 15, sidan 39).

14. Välj protokoll "PAXgene Blood RNA Part B" och starta protokollet.

Följ instruktionerna som visas på QIAcubes pekskärm.



Detta program inkuberar proverna vid 65 °C och denaturerar RNA för påföljande applikationer. Även om följande applikation inkluderar ett värmedenatureringssteg, skall detta steg inte utlämnas. Tillräcklig RNA-denaturering är nödvändig för maximal effektivitet i efterföljande applikationer.

15. När "PAXgene Blood RNA Part B"-protokollet är klart kan QIAcube-instrumentluckan öppnas (se Fig. 15, sidan 39). Placera omedelbart mikrocentrifugrören (MCT) med renad RNA på is.



WARNING: Mycket varm yta. Skakaren kan uppnå temperaturer på upp till 70 °C (158 °F). Undvik att vidröra ytan när den är het.



Låt inte renad RNA vara kvar i QIAcube. Om proverna inte kyls, kan renad RNA brytas ner. Övervakade körningar under natten rekommenderas därför inte.

16. Om RNA-proverna inte används direkt, skall de förvaras vid –20 °C eller –70 °C.

Om RNA, även efter upprepad nedfrysning och upptining förblir denaturerat, är det inte nödvändigt att upprepa inkubationen ("PAXgene Blood RNA Part B"). Om RNA-proven skall användas för en diagnostisk metod skall tillverkarens anvisningar följas.

Vi rekommenderar spädning av provet i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, för korrekt kvantifiering av RNA genom absorbans vid 260 nm. * Spädning av provet i RNase-fritt vatten kan leda till felaktigt låga värden.

För att ställa in spektrofotometerens nollpunkt skall ett blankprov (blank) användas, vars sammansättning av elueringsbuffert (BR5) och Tris-HCl-buffert motsvarar proven som skall mätas. Elueringsbufferten (BR5) absorberar kraftigt vid 220 nm, vilket kan leda till höga bakgrundsabsorbansvärden om spektrofotometerens nollpunkt inte har ställts in korrekt.

* Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS) som kan erhållas av respektive tillverkare.



För att bestämma koncentrationen i Tris-HCl-buffert, använd förhållandet

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Se Bilaga B, sidan 66.

17. Ta bort reagensflaskstället från QIAcubes arbetsbänk (se Fig. 17, sidan 42), och stäng alla flaskor med korrekt märkta lock. Buffert i flaskor kan förvaras i rumstemperatur (15–25 °C) i upp till 3 månader. Ta bort och kassera återstående reagenser i reaktionsrören (PT) i QIAcubes mikrocentrifugrörsfack (se Fig. 17, sidan 42). Ta bort och kassera alla rotoradaptar från centrifugen (se Fig. 17, sidan 42). Töm QIAcube-avfallslådan (se Fig. 15, sidan 39). Stäng QIAcube-instrumentluckan och slå på QIAcube med strömbrytaren (se Fig. 15, sidan 39).

Felsökningshandbok

Den här felsökningsguiden kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som kan uppstå. Mer information finns på sidan Frequently Asked Questions (Vanliga frågor) på vårt tekniska supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Dessutom svarar teamet för QIAGENs tekniska service gärna på frågor om informationen och protokollen i denna handbok eller prov- och analysmetoder (för kontaktinformation, se sista sidan eller besök www.qiagen.com).

Kommentarer och förslag på åtgärd

RNA är nedbrutet

RNase-kontaminering



Se till att inget RNase tillkommer i reagenserna under hela preparationen eller under påföljande analyser (se Bilaga A, sidan 65).

Lågt RNA-utbyte

- a) Mindre än 2,5 ml blod har samlats i PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



Se till att det samlas 2,5 ml blod vid blodtagningen i PAXgene Blood RNA Tube (BRT, se *PAXgene Blood RNA Tube-handboken*).

- b) RNA-koncentration uppmätt i vatten



RNA måste spädas i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* för korrekt koncentration (se Bilaga B, sidan 66).



- c) Celldebris förs över till PAXgene RNA-kolonnen (PRC) i steg 9 och 10 av det manuella protokollet





Undvik att föra över större partiklar när supernatanten pipetteras efter steg 7 av det manuella protokollet (små celledbris påverkar inte preparationen).

* Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS) som kan erhållas av respektive tillverkare.

Kommentarer och förslag på åtgärd

- | | | |
|---|---|--|
| d) Supernatanten aspireras inte fullständigt efter steg 3 |  | Se till att supernatanten aspireras fullständigt. Om den dekanteras, skall droppar på randen till PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tas bort med en pappershandduk. Genomför rimliga försiktighetsåtgärder för att undvika korskontamination. |
| e) Efter blodtagning i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) inkuberas blodet i högst 2 timmar |  | Inkubera blod i PAXgene Blood RNA Tube (BRT) i minst 2 timmar efter provtagning. |

Lågt A_{260}/A_{280} -värde

- | | | |
|--|---|---|
| a) Vatten används för att späda RNA för A_{260}/A_{280} -mätning |  | Använd 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 för spädning av RNA innan renheten mäts* (se Bilaga B, sidan 66). |
| b) Spektrofotometern är inte nollställd |  | För att ställa in spektrofotometerns nollpunkt skall ett blankprov (blank) användas, vars sammansättning av elueringsbuffert (BR5) och 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, motsvarar proven som skall mätas. Elueringsbufferten (BR5) absorberar kraftigt vid 220 nm, vilket kan leda till höga bakgrundsabsorptionsvärden om spektrofotometerns nollpunkt inte har ställts in korrekt. |

Instrumentfel

- | | |
|----------------------------|---|
| QIAcube felaktigt hanterad | Läs <i>QIAcube User Manual</i> och lägg särskilt märke till avsnittet Felsökning. Se till att QIAcube är korrekt underhållen, enligt beskrivningen i <i>QIAcube User Manual</i> . |
|----------------------------|---|

* 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.

Bilaga A: Allmänna hänvisningar angående

RNA-hantering

Arbete med RNA



Ribonukleaser (RNase) är mycket motståndskraftiga och aktiva enzymer, som normalt inte behöver kofaktorer för att vara aktiva. RNaser är svåra att inaktivera och endast en liten mängd räcker för att bryta ner RNA. Därför skall inga laboriematerial av glas eller plast användas, där RNase-kontaminationer inte eliminerats först. Se till att inga RNase-kontaminationer kan tillkomma på RNA-proven under eller efter reningsproceduren. För att skapa och bevara en RNase-fri omgivning bör de påföljande försiktighetsåtgärderna följas vid förbehandling och bruk av engångs- och flergångsbehållare och lösningar vid arbete med RNA.

Allmän hantering



Arbetet med RNA skall alltid följa principerna för ordentliga mikrobiologiska och aseptiska arbetstekniker. Händer och dammpartiklar kan bära på bakterier och mögelsvampar, vilket är de vanligaste orsakerna för RNase-föroreningar. Bär därför alltid latex- eller vinylhandskar vid hantering av reagenser eller RNA-prov för att undvika en RNase-kontamination via huden eller genom dammiga laborieinstrument. Byt laboriehandskarna ofta och stäng alltid alla behållare direkt efter användning. Låt renad RNA ligga kvar på is, om alikvoter pipetteras för vidare applikationer.

Protokoll för att ta bort RNase-kontaminationer från glasmaterial och ur lösningar finns i allmänna molekylärbio-logiska metodböcker som t.ex. Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Bilaga B: Bestämning av mängd och kvalitet av Total RNA

Bestämma mängden RNA

Koncentrationen av RNA ska bestämmas genom mätning av absorbansen vid 260 nm (A_{260}) i en spektrofotometer. Absorbansvärdena skall ligga i spektrofotometerens linjära område för att ge en så noggrann mätning som möjligt. En absorbans på 1 enhet vid 260 nm motsvarar 44 µg RNA per ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$). Detta förhållande är endast giltigt för mätningar i 10 mM Tris-HCl, * pH 7,5. Om det är nödvändigt att späda RNA-provet skall det därför göras i 10 mM Tris-HCl. Så som det beskrivs nedan (se avsnittet "RNA-renhet", sidan 67), är förhållandet av absorbansvärdena från 260 nm till 280 nm ett mått på RNA-renheten. Se till att kyvetterna, som används för mätningen av RNA-proven, är fria från RNase. För att ställa in spektrofotometerens nollpunkt skall ett blankprov (blank) användas, vars sammansättning av elueringsbuffert (BR5) och Tris-HCl-buffert motsvarar proven som skall mätas. Elueringsbufferten (BR5) absorberar kraftigt vid 220 nm, vilket kan leda till höga bakgrundsabsorbansvärden om spektrofotometerens nollpunkt inte har ställts in korrekt. Nedan finns ett exempel på hur RNA-koncentrationen beräknas.

RNA-provets volym	=	80 µl
Spädning (1/15)	=	10 µl av RNA-prov + 140 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Absorbansmätning av det utspädda provet i en RNase-fri kyvett.		
A_{260}	=	0,3
Koncentration av prov	=	$44 \times A_{260} \times \text{spädningsfaktor}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 µg/ml
Totalt utbyte	=	koncentration x volym av prov i milliliter
	=	$198 \text{ µg/ml} \times 0,08 \text{ ml}$
	=	15,8 µg RNA

* Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS) som kan erhållas av respektive tillverkare.

RNA-renhet

Förhållandet av absorptionsvärdena från 260 nm till 280 nm (A_{260}/A_{280}) är ett mått på RNA renheten avseende kontaminanter som absorberar UV, som t.ex. protein. A_{260}/A_{280} -förhållandet beror dock till stor del på pH-värdet. Lägre pH-värde resulterar i ett lägre A_{260}/A_{280} -förhållande och minskad känslighet för proteinkontaminering.* För korrekta värden rekommenderar vi absorptionsmätningar i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Ren RNA har ett A_{260}/A_{280} -förhållande på 1,8–2,2 i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. För att ställa in spektrofotometerens nollpunkt skall ett blankprov (blank) användas, vars sammansättning av elueringsbuffert (BR5) och Tris-HCl-buffert motsvarar proven som skall mätas. Elueringsbufferten (BR5) absorberar kraftigt vid 220 nm, vilket kan leda till höga bakgrundsabsorptionsvärden om spektrofotometerens nollpunkt inte har ställts in korrekt.

Bilaga C: Handhavandet av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Följande korta handledning från BD ger hänvisningar angående handhavandet av PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Se *PAXgene Blood RNA Tube-handboken* för mer information om PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Kort beskrivning om hur BD Hemogard-säkerhetsförslutning tas bort

1. Greppa PAXgene Blood RNA Tube (BRT) med ena handen och placera tummen direkt under BD Hemogard-säkerhetsförslutningen. (Ytterligare stabilitet kan uppnås om underarmen stöds mot en fast yta.) Skruva av BD Hemogard-förslutningen med ena handen, samtidigt som du med den andra handens tumme trycker uppåt ENDAST TILLS PROPPEN I RÖRET LOSSNAR.

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

2. Ta bort tummen innan förslutningen tas av. Använd INTE tummen för att trycka av förslutningen från PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Varning! Om PAXgene Blood RNA Tube (BRT) innehåller blod, utgör detta en potentiell infektionsrisk. För att undvika att skada sig när förslutningen tas bort, är det viktigt att ta bort tummen (med vilken förslutningen trycks upp) från PAXgene Blood RNA Tube (BRT), så snart BD Hemogard-förslutningen lossnar.
3. Lyft av förslutningen från PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Om det mycket osannolika inträffar att plasthöljet lossnar från gummiproppen, FÖRSÖK INTE ATT SÄTTA IHOP FÖRSLUTNINGEN IGEN. Avlägsna försiktigt gummiproppen från PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Beskrivning om återförslutning med en sekundär BD Hemogard-säkerhetsförslutning

1. Sätt en ny förslutning på PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Skruva och tryck samtidigt ned proppen på röret tills det sitter ordentligt. Proppen skall tryckas in fullständigt så att förslutningen sitter säkert på PAXgene Blood RNA Tube (BRT) vid hantering.

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat. nr
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene-kolonner, 50 Shredder-kolonner, Reaktionsrör (Processing Tubes), RNase-fri DNase I, RNase-fria reagenser och buffertar. För att användas tillsammans med PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 blodtagningsrör	762165
Relaterade produkter som kan beställas från QIAGEN		
Starter Pack, QIAcube	Förpackningen innehåller: reagensflaskställ (3); etikettremсор (8); 200 µl-filterspetsar (1024); 1000 µl filterspetsar (1024); 1000 µl filterspetsar, bred cylinder (1024); 30 ml reagensflaskor (18); rotoradaptar (240); rotoradapterhållare	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Sterila engångsfilterspetsar, i ställ	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Reagensflaskor (30 ml) med lock; 6-pack; för användning med QIAcube reagensflaskställ	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	För 240 prepareringar: 240 engångsrotoradaptar, för användning med QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Ställ med plats för 6 x 30 ml reagensflaskor på QIAcube-arbetsbänk	990390
Rotor Adapter Holder	Hållare för 12 engångsrotoradaptar; för användning med QIAcube	990392

Relaterade produkter som kan beställas från BD*

Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: 0,75 tums-kanyler (0,8 x 19 mm, 21 G), 12 tums-slang (305 mm) med Luer-adapter; 50 per box, 200 per förpackningsenhet	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Behållare enbart för 13 mm och 16 mm diameter; 1000/behållare	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	Rörstorlek 13 x 75 mm, med 4,0 ml vakuumsug, med röd BD Hemogard-säkerhetsförlutning och pappersetikett; 100 per box, 1000 per förpackningsenhet	368975

* De produkter som anges här är typiska tillbehörsartiklar, vilka kan användas tillsammans med PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) för blodtagning. Mer information (inklusive beställningsinformation) för dessa tillbehörsartiklar finns på www.preanalytix.com.

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler finns i respektive PreAnalytiX- eller QIAGEN-kithandbok eller -bruksanvisning. PreAnalytiX- och QIAGEN-kithandböcker och bruksanvisningar finns tillgängliga på www.preanalytix.com och www.qiagen.com eller kan beställas från PreAnalytiX tekniska service.

Revideringshistorik för handboken

Dokument och revision	Ändringar	Datum
HB-0101-004, R2	Ändringar för överensstämmelse med GHS-föreskrifter i hela dokumentet	Juni 2015
HB-0101-005, R3	Ny mall; revideringar av automatiserat protokoll och prestandadata; uppdatering av säkerhetsinformation för överensstämmelse med GHS-föreskrifter; ändringar av instrumentdetaljer och dokumentet Begränsningar för produktanvändning.	Februari 2019
HB-0101-006, R3	Rättelse av kitets namn i kitets innehållstabell, sidan 5.	Januari 2020

PreAnalytiX Worldwide

PreAnalytiX produkter säljs av QIAGEN och BD företag

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 8000 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

