

Січень 2020 року

# РАХgene®

## Довідник з використання комплекту для виділення РНК з крові

Версія 2



50 (номер за каталогом 762174)

**Уповноважений представник в Україні:** ТОВ «КРАТІЯ МЕДТЕХНІКА», вул. Багговутівська, буд.17-21, м. Київ, 04107, Україна., Тел.: 0 800 21-52-32, Електронна пошта: [uaep@cratia.ua](mailto:uaep@cratia.ua)

R3 **MAT** 1120409UA

**REF**

762174



**IVD**

**CE**



ПреАналітіКс ГмбХ  
Фельдбахштрассе, СН-8634 Хомбрехткон  
Виготовлено компанією КАЙДЖЕН ГмбХ для ПреАналітіКс  
КАЙДЖЕН ГмбХ, вул. КАЙДЖЕН 1, 40724, Хільден, Німеччина.

 **PreAnalytiX**

A QIAGEN / BD Company

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

Комплекти для виділення РНК з крові PAXgene можуть не постачатися в деякі країни. З'ясуйте цю інформацію завчасно.

#### Обмежена ліцензійна угода

Використання цього виробу означає надання покупцем або користувачем комплекту для виділення РНК з крові PAXgene згоди на такі умови:

1. Комплект для виділення РНК з крові PAXgene можна використовувати лише відповідно до *Довідника з використання комплекту для виділення РНК з крові PAXgene* та тільки з компонентами, які входять до цього комплекту. Компанія PreAnalytiX не надає жодних ліцензій щодо будь-якої своєї інтелектуальної власності на використання компонентів цього комплекту з будь-якими компонентами, які не входять до цього комплекту (або додавання до них), за винятком описаних у *Довіднику з використання комплекту для виділення РНК з крові PAXgene* й додаткових протоколах, доступних на сайті [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).
2. За винятком чітко визначених ліцензій компанія PreAnalytiX не гарантує, що цей комплект і (або) його використання не порушують права третіх сторін.
3. Цей комплект і його компоненти мають ліцензію на одноразове використання й не підлягають повторному використанню, ремонту або перепродажу.
4. Цим компанія PreAnalytiX відмовляється від будь-яких інших ліцензій, явних або неявних, крім тих, які явно зазначені.
5. Покупець і користувач комплекту погоджуються не виконувати та не дозволяти іншим виконувати будь-які дії, які можуть призвести до порушення наведених вище умов, або сприяти цьому.
6. Компанія PreAnalytiX може застосовувати заборони цієї Обмеженої ліцензійної угоди в будь-якому суді та зобов'язана відшкодовувати всі свої слідчі й судові витрати, включно з витратами на адвоката, на будь-які дії із забезпечення виконання цієї Обмеженої ліцензійної угоди або будь-яких прав інтелектуальної власності, пов'язаних із комплектом і (або) його компонентами.

Оновлені ліцензійні умови див. на сайті [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

#### Умовний продаж

Цей продукт постачається з ліцензією за умови дотримання певних вимог патентних заявок US-7,270,953 і US-7,682,790, а також EP-1820793 B1 і їхніх іноземних еквівалентів на використання продукту для переробки комплексу нуклеїнових кислот, утвореного під час збору зразків у пробірку для виділення РНК з крові PAXgene (PAXgene Blood RNA Tube).

HB-0101-006 BD-8945 1120409 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH. Усі права захищено.

PreAnalytiX Company

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Швейцарія

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

#### Дистриб'ютори PreAnalytiX

Продукти PreAnalytiX виготовляються для компанії PreAnalytiX компанією QIAGEN або BD і розповсюджуються для компанії PreAnalytiX компанією QIAGEN або BD. Продукти не можна замовити в компанії PreAnalytiX GmbH.


Контактні дані місцевого дистриб'ютора PreAnalytiX вказано на останній сторінці.

# Зміст

|  |    |
|--|----|
| Комплектація .....   | 5  |
| Символи .....  | 6  |
| Умови зберігання .....   | 7  |
| Призначення.....   | 8  |
| Обмеження щодо використання продукту .....   | 8  |
| Контроль якості .....  | 9  |
| Технічна підтримка .....   | 9  |
| Техніка безпеки .....  | 9  |
| Вступ.....   | 14 |
| Принцип роботи і процедура .....   | 14 |
| Збір і стабілізація зразків .....  | 15 |
| Концентрування й виділення РНК .....   | 20 |
| Ручне виділення РНК .....  | 20 |
| Автоматизоване виділення РНК.....  | 30 |
| Обладнання й реагенти, які постачає користувач .....   | 36 |
| Важливі примітки.....  | 38 |
| Використання QIAcube .....   | 38 |
| Запуск QIAcube .....   | 38 |
| Установлення протоколів на приладі QIAcube .....   | 38 |
| Завантаження приладу QIAcube.....  | 40 |
| Протокол: Ручне виділення сумарної РНК із цільної крові людини, зібраної<br>у пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT) ..... | 50 |

|   |    |
|---|----|
| Протокол: Автоматизоване виділення сумарної РНК із цільної крові людини, зібраної у пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT)..... | 60 |
| Посібник з усунення несправностей .....   | 69 |
| Додаток А. Загальні зауваження щодо поводження з РНК.....   | 72 |
| Додаток В. Кількісний і якісний аналіз сумарної РНК .....   | 73 |
| Додаток С. Поводження з пробірками для виділення РНК з крові PAXgene (BRT).....   | 75 |
| Інформація про замовлення .....   | 77 |
| Історія редакцій довідника .....  | 80 |

# Комплектація

|  |  |   |                                   |
|--|--|---|-----------------------------------|
| Комплект для виділення РНК з крові PAXgene (PAXgene Blood RNA Kit) |  |   | (50)                              |
| Номер за каталогом   |  |   | 762174                            |
| Кількість препаратів   |  |   | 50                                |
| BR1  | Буферний розчин для ресуспендування  | RES BUF   | 20 мл                             |
| BR2  | Буферний розчин для зв'язування*   | BIND BUF  | 18 мл                             |
| BR3  | Промивний буферний розчин 1*   | WASH BUF 1  | 45 мл                             |
| BR4  | Промивний буферний розчин 2 (концентрат) <sup>†</sup>                          | WASH BUF 2 CONC   | 11 мл                             |
| BR5  | Елюентний буферний розчин  | ELU BUF   | 6 мл                              |
| RNFW   | Вода без вмісту РНКаз (флакон)   | PEL WASH  | 2 × 125 мл                        |
| PK   | Протеїназа К (зелена кришка)   | PROTK   | 2 × 1,4 мл                        |
| PRC  | Центрифужні колонки для виділення РНК PAXgene (червона)                        | PAXgene RNA COL   | 5 × 10                            |
| PT   | Пробірки для обробки (2 мл)  | PROC TUBE   | 6 × 50                            |
| Hemogard   | Додаткові кришки BD Hemogard   | SEC CLOS  | 50                                |
| MCT  | Мікроцентрифужні пробірки (1,5 мл)   | MIC TUBE  | 3 × 50, 1 × 10                    |
| RNFD   | ДНКаза I без вмісту РНКаз (ліофілізована)                                      | DNA REM   | 1500 одиниць Кунітца <sup>‡</sup> |
| RDD  | Буферний розчин для розщеплення ДНК (біла кришка)                              | DNA DIG BUF   | 2 × 2 мл                          |
| DRB  | Буферний розчин для ресуспендування ДНКаз (пробірка, кришка бузкового кольору) | DNase RES BUF   | 2 мл                              |
| PSC  | Центрифужні колонки PAXgene Shredder (бузкового кольору)                       | PAXgene SHRED COL   | 5 × 10                            |
| Довідник   | Довідник з використання комплекту для виділення РНК з крові PAXgene (версія 2) |  | 1                                 |

\* Несумісний із дезінфікувальними реагентами, які містять відбілювач. Містить сіль гуанідину. Правила техніки безпеки наведено на стор. 9.

<sup>†</sup> Промивний буферний розчин 2 (BR4) постачається у вигляді концентрату. Перед першим використанням додайте 4 частини за об'ємом етанолу (96–100 %, ступінь чистоти: чистий для аналізу), як зазначено на флаконі, щоб отримати робочий розчин.

<sup>‡</sup> Одиниці Кунітца – це найбільш широко вживані одиниці вимірювання активності ДНКаз I, що визначаються як кількість ДНКаз I, яка збільшує поглинання на довжині хвилі A<sub>260</sub> на 0,001 за хвилину в розрахунку на мілілітр за температури 25 °C, рН 5,0, коли субстратом є високополімеризована ДНК (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 and 363).

# СИМВОЛИ



Містить реагенти, достатні для <N> тестів



Див. інструкції з використання



Строк придатності



Медичний прилад для діагностики in vitro



Каталоговий номер



Номер партії



Номер матеріалу



Компоненти



Номер



Метод стерилізації шляхом опромінення



Одиниці Кунітца



Додавання



Містить














Відновлений



Дезоксирибонуклеаза I



Етанол

|   |   |
|---|---|
|   | Гуанідин ізотіоціанат                                   |
|   | Набір ДНКази без вмісту РНКаз                           |
|   | Глобальний ідентифікаційний номер одиниці товару        |
|   | Не використовувати повторно                             |
|   | Обмеження температури                                   |
|   | Верхнє граничне значення температури                    |
|   | Виробник  |
|   | Важлива примітка  |
|   | Після додавання етанолу у флакон занотуйте поточну дату |
|   | Після прибуття  |
|  | Приводить до  |

## Умови зберігання

Зберігайте центрифужні колонки для виділення РНК PAXgene (PRC), центрифужні колонки PAXgene Shredder (PSC), протеїназу K (PK) і буферні розчини (BR1, BR2, BR3, BR4 і BR5) у сухому приміщенні за температури, вказаної на етикетці комплекту.

Набір ДНКази без вмісту РНКаз, який складається з ДНКази I (RNFD), буферного розчину для розщеплення ДНК (RDD) і буферного розчину для ресуспендування ДНКази (DRB), постачається за температури навколишнього середовища. Відразу

після отримання зберігайте всі компоненти набору ДНКази без вмісту РНКази за температури, вказаної на етикетці. За умови належного зберігання комплект зберігає стабільність до дати завершення строку придатності, вказаної на упаковці.

## Призначення

Комплект для виділення РНК з крові PAXgene призначений для виділення внутрішньоклітинної РНК із цільної крові, зібраної в пробірку для виділення РНК з крові PAXgene (BRT). Якщо комплект використовується разом із пробіркою для виділення РНК з крові PAXgene (BRT), система забезпечує виділення внутрішньоклітинної РНК із цільної крові для ЗТ-ПЛР, що застосовується для молекулярно-генетичних аналізів. Для отримання детальнішої інформації про використання пробірок для виділення РНК з крові PAXgene (PAXgene Blood RNA Tubes, BRT) див. *Довідник з використання пробірок для виділення РНК з крові PAXgene*.

**Робочі характеристики для системи виділення РНК з крові PAXgene встановлені лише для транскриптів генів фруктоолігосахаридів (FOS) та інтерлейкіну 1В (IL1B). Користувач несе відповідальність за встановлення відповідних робочих характеристик системи виділення РНК з крові PAXgene для інших цільових транскриптів.**

## Обмеження щодо використання продукту

Комплект для виділення РНК з крові PAXgene призначений для виділення внутрішньоклітинної РНК із цільної крові людини (з кількістю лейкоцитів у межах  $4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$  лейкоцитів/мл) для діагностики *in vitro*. Він не придатний для виділення геномної ДНК або виділення вірусних нуклеїнових кислот із цільної крові людини. Через обмежену кількість транскриптів, підтверджених для характеристик стабілізації (транскрипти генів FOS і IL1B), робочі характеристики встановлено не для



всіх транскриптів. Персонал лабораторії повинен переглянути дані виробника та власні дані, щоб визначити, чи необхідно виконати перевірку інших транскриптів.

Продукт призначений для використання фахівцями, наприклад лаборантами й лікарями, які пройшли необхідну підготовку для проведення діагностики *in vitro*.

## Контроль якості

З метою забезпечення стабільної якості продукції кожна партія комплектів для виділення РНК з крові PAXgene перевіряється на відповідність специфікаціям системи керування якістю QIAGEN, яка пройшла сертифікацію ISO.

## Технічна підтримка

Компанія QIAGEN пишається якістю та доступністю своєї служби технічної підтримки. У наших відділах технічного обслуговування працюють досвідчені вчені з великим практичним і теоретичним досвідом у галузі молекулярної біології та використання продуктів PreAnalytiX. Якщо у вас виникли запитання стосовно комплекту для виділення РНК з крові PAXgene, звертайтеся до нас.

Для отримання технічної підтримки й детальнішої інформації звертайтеся до служби технічної підтримки QIAGEN.

## Техніка безпеки

Під час роботи з хімічними речовинами необхідно носити лабораторний халат, одноразові рукавички та захисні окуляри.

Щоб уникнути ризику інфікування (наприклад, вірусами ВІЛ чи гепатиту В) або травмування під час роботи з біологічними й хімічними матеріалами, необхідно носити лабораторний халат, одноразові рукавички та захисні окуляри. Для отримання детальнішої інформації див. відповідні паспорти безпеки матеріалів. Вони доступні онлайн у зручному й компактному форматі PDF на веб-сайті **www.preanalytix.com**, де можна знайти, переглянути й роздрукувати паспорти безпеки матеріалів для цього комплекту.

#### **ЗАСТЕРЕЖЕННЯ**



НЕ додавайте дезінфікувальні або кислі розчини безпосередньо до відходів, які утворюються під час приготування зразків.

Буферний розчин для зв'язування (BR2) і промивний буферний розчин 1 (BR3) містять гуанідин тіоціанат, який у поєднанні з дезінфікувальним розчином може утворювати високоактивні сполуки. У разі проливання буферного розчину для зв'язування (BR2) або промивного буферного розчину 1 (BR3) очистьте поверхню за допомогою відповідного лабораторного мийного засобу й води. У разі проливання рідини, яка містить потенційні збудники інфекцій, очистьте поверхню спочатку за допомогою лабораторного мийного засобу й води, а потім із використанням розчину гіпохлориту натрію 1 % (об.).

Для дезінфекції суміші розчину для стабілізації РНК і крові із пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT) можна використовувати 1 частину за об'ємом наявного в продажу дезінфікувального розчину (5 % гіпохлориту натрію) на 9 частин за об'ємом суміші розчину для стабілізації РНК і крові.

Відходи, які утворюються під час приготування зразків, зокрема супернатант на етапі центрифугування під час процедури виділення РНК, слід вважати потенційно інфекційними. Перед утилізацією відходи необхідно стерилізувати в автоклаві або спалити, щоб знищити всі інфекційні матеріали. Утилізацію необхідно виконувати відповідно до офіційних приписів.

Наведені далі заяви про небезпеку й запобіжні заходи стосуються компонентів комплекту для виділення РНК з крові PAXgene. Для отримання детальнішої інформації про правила техніки безпеки під час роботи з пробірками для виділення РНК з крові PAXgene (BRT) див. *Довідник з використання пробірок для виділення РНК з крові PAXgene.*

### **Буферний розчин BR2**



Містить: гуанідин тіоціанат. Небезпечно! Шкідливий при потрапленні в організм. Може бути шкідливим у разі контакту зі шкірою. Призводить до серйозного ураження очей. Шкідливий для морської флори та фауни з довготривалими наслідками. При контакті з кислотами виділяє дуже токсичний газ. Одягайте захисні рукавиці / захисний одяг / захисні окуляри / маску. У РАЗІ ПОТРАПЛЯННЯ В ОЧІ: обережно промийте водою протягом кількох хвилин. Зніміть контактні лінзи (за наявності), якщо це легко зробити. Продовжуйте промивання. Негайно зверніться до ЦЕНТРУ ТОКСИКОЛОГІЇ або до лікаря.

### Буферний розчин BR3



Містить: етанол; гуанідин тіоціанат. Небезпечно! Легкозаймисті рідина й пара. Призводить до серйозного ураження очей. При контакті з кислотами виділяє дуже токсичний газ. Тримайте подалі від джерел тепла / іскор / відкритого полум'я / гарячих поверхонь. Не курити. Одягайте захисні рукавиці / захисний одяг / захисні окуляри / маску. У РАЗІ ПОТРАПЛЕННЯ В ОЧІ: обережно промийте водою протягом кількох хвилин. Зніміть контактні лінзи (за наявності), якщо це легко зробити. Продовжуйте промивання. Негайно зверніться до ЦЕНТРУ ТОКСИКОЛОГІЇ або до лікаря.

### ДНКаза І



Містить: ДНКазу. Небезпечно! Може викликати алергічну шкірну реакцію. У разі вдихання може викликати алергію, симптоми астми або утруднене дихання. Уникайте вдихання пилу / диму / газу / туману / пари / аерозолі. Одягайте захисні рукавиці / захисний одяг / захисні окуляри / маску. Використовуйте засоби захисту органів дихання. У ВИПАДКУ впливу або контакту: зверніться до ЦЕНТРУ ТОКСИКОЛОГІЇ або до лікаря. Виведіть постраждалу особу на свіже повітря, забезпечте повний спокій у зручному для дихання положенні.

## Протеїназа К



Містить: протеїназу К. Небезпечно! Викликає незначне подразнення шкіри. У разі вдихання може викликати алергію, симптоми астми або утруднене дихання. Уникайте вдихання пилу / диму / газу / туману / пари / аерозолю. Одягайте захисні рукавиці / захисний одяг / захисні окуляри / маску. Використовуйте засоби захисту органів дихання. У ВИПАДКУ впливу або контакту: зверніться до ЦЕНТРУ ТОКСИКОЛОГІЇ або до лікаря. Виведіть постраждалу особу на свіже повітря, забезпечте повний спокій у зручному для дихання положенні.

# Вступ

Взяття цільної крові – це перший етап багатьох молекулярних аналізів, які застосовуються для дослідження клітинної РНК. Основною проблемою під час таких аналізів є нестабільність клітинної РНК в умовах *in vitro*. Результати досліджень компанії PreAnalytiX показують, що кількість окремих видів мРНК у цільній крові може збільшуватись у 1000 разів під час транспортування або зберігання при кімнатній температурі.\* Це викликано як швидким руйнуванням РНК, так і експресією певних генів після забору крові. Такі зміни у профілі експресії РНК унеможливають проведення надійних досліджень експресії генів. Тому наявність методу, який дає змогу зберегти профіль експресії РНК під час і після флеботомії, має першочергове значення для точного аналізу експресії генів у цільній крові людини.

## Принцип роботи і процедура

Компанія PreAnalytiX розробила нову систему, яка дає змогу збирати, стабілізувати, зберігати та транспортувати зразки цільної крові людини завдяки використанню швидкого й ефективного протоколу виділення внутрішньоклітинної РНК. Система потребує використання пробірок для виділення РНК з крові PAXgene (BRT; патенти США 6,602,718 і 6,617,170) для забору крові та стабілізації РНК з подальшим ручним або автоматизованим виділенням РНК за допомогою комплекту для виділення РНК з крові PAXgene. І ручний, і автоматизований протоколи забезпечують отримання практично рівноцінних показників якості та виходу РНК. У цьому довіднику наведено дані щодо ефективності ручного (стор. 23–30) й автоматизованого протоколів (стор. 33–35).

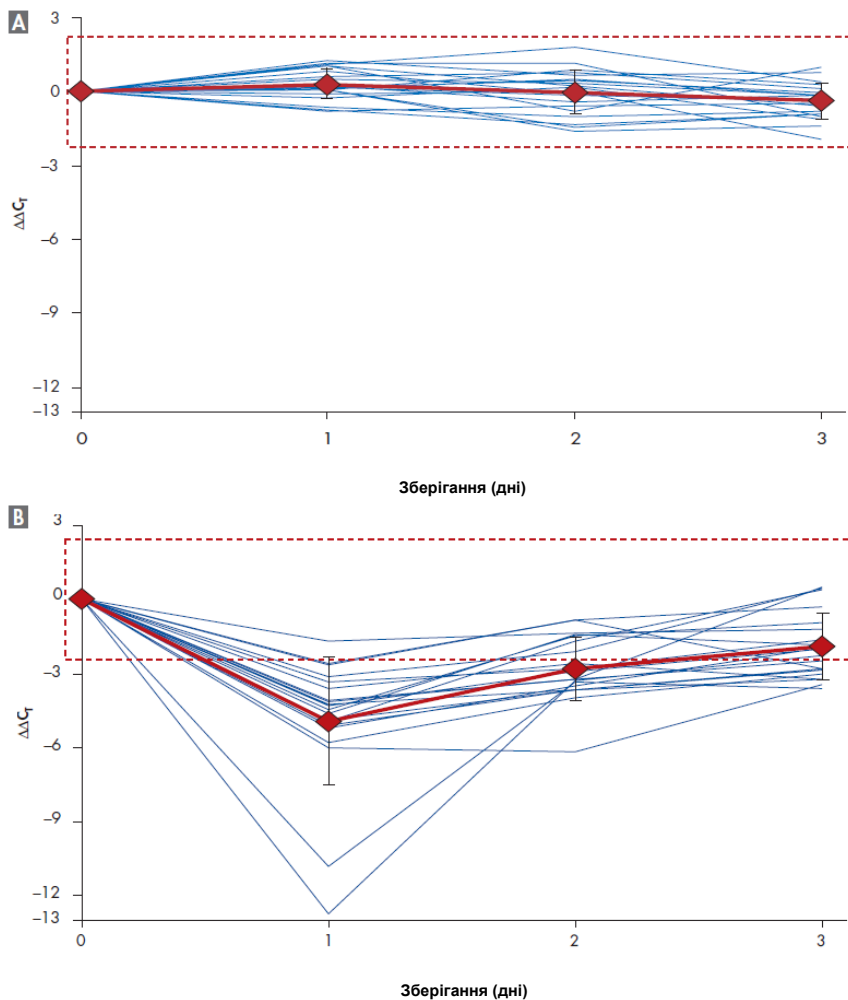
\* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

## Збір і стабілізація зразків

Пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT) містять запатентовану композицію реагентів на основі запатентованої технології стабілізації РНК. Ця композиція реагентів забезпечує захист молекул РНК від руйнування РНКазами та зменшує зміни *ex vivo* під час експресії генів. Пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT) призначені для збору цільної крові людини та стабілізації клітинної РНК протягом щонайбільше 3 днів за температури 18–25 °C (рис. 1 і 2, стор. 16 і 17) або 5 днів за температури 2–8 °C (рис. 3 і 4, стор. 18 і 19). Наявні наразі дані демонструють стабілізацію клітинної РНК протягом принаймні 11 років за температури –20 °C або –70 °C\*. Для отримання детальнішої інформації щодо поточних досліджень з оцінювання стабільності протягом довгих періодів часу зверніться до служби технічної підтримки QIAGEN.

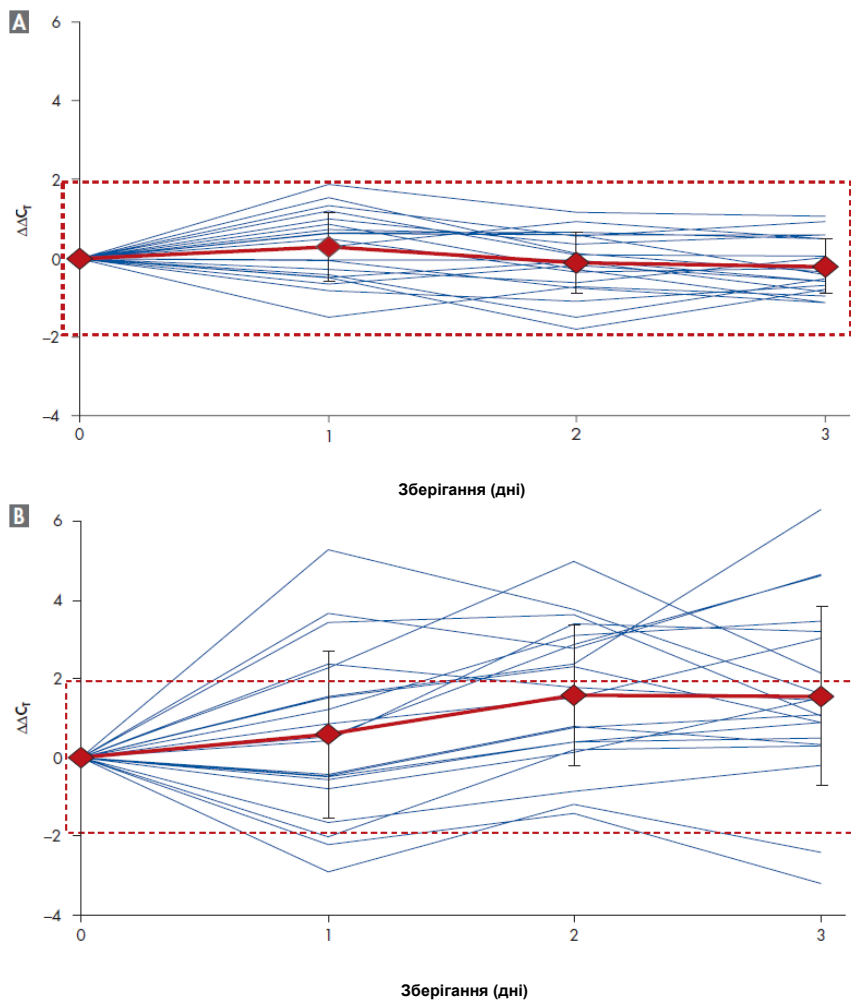
Фактична тривалість стабілізації РНК може змінюватися залежно від виду клітинної РНК та цільового застосування. Через обмежену кількість транскриптів, підтверджених для характеристик стабілізації (транскрипти генів FOS і IL1B), робочі характеристики встановлено не для всіх транскриптів. Персонал лабораторії повинен переглянути дані виробника та власні дані, щоб визначити, чи необхідно виконати перевірку інших транскриптів.

\* Зараз проводиться довгострокове дослідження зберігання крові у пробірках для виділення РНК з крові PAXgene.

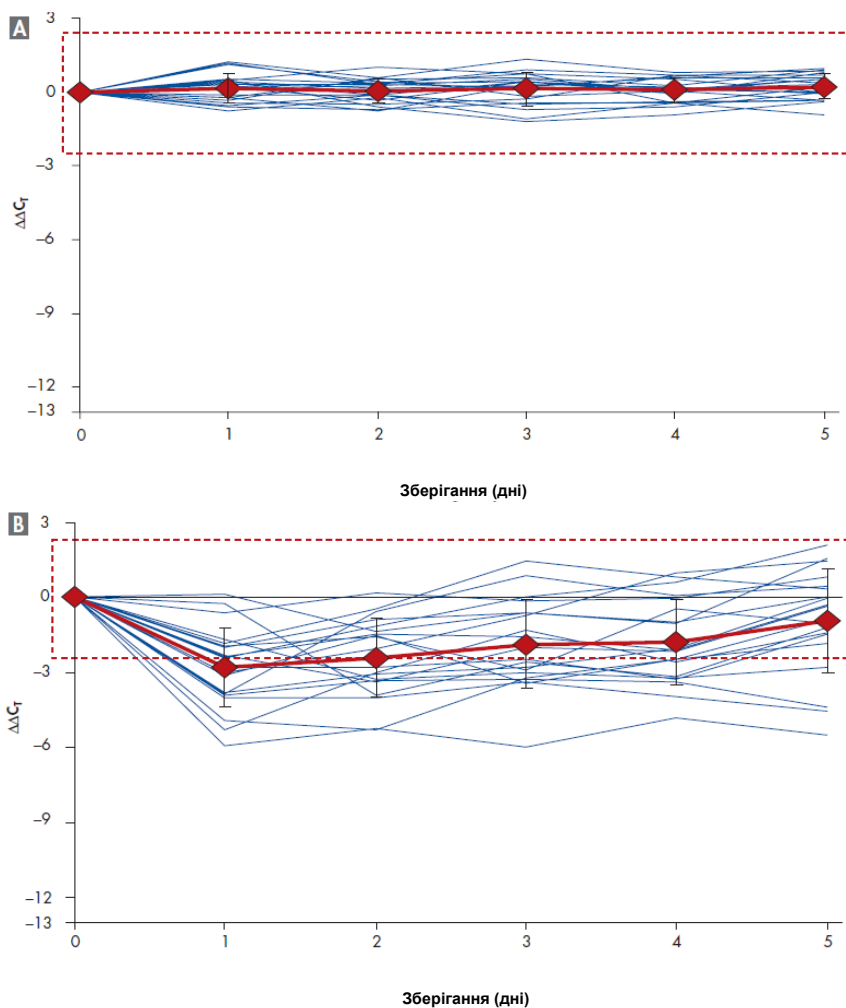


**Рис. 1. Стабільність РНК у зразках крові за температури 18–25 °С: FOS.** Кров взято в 10 донорів. Разом із повторними зразками вона зберігається за температури 18–25 °С протягом зазначеної кількості днів із подальшим виділенням сумарної РНК. **[А]** Після взяття кров зберігалась у пробірках для виділення РНК з крові PAXgene (BRT), а для виділення сумарної РНК було застосовано комплект для виділення РНК з крові PAXgene. **[В]** Після взяття кров зберігалась у звичайних пробірках для забору крові з антикоагулянтом ЕДТК, а для виділення сумарної РНК використовувався звичайний метод виділення з очищенням РНК за допомогою технології використання силікатної мембрани. Відносні рівні транскриптів FOS визначалися дуплексною полімеразною ланцюговою реакцією зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) у реальному часі з використанням 18S рРНК як внутрішнього стандарту. Значення для всіх зразків показано з зазначенням середніх значень і стандартних відхилень. Пунктирні лінії вказують на загальну точність аналізу  $\pm 3x$  (2,34  $C_t$ ).

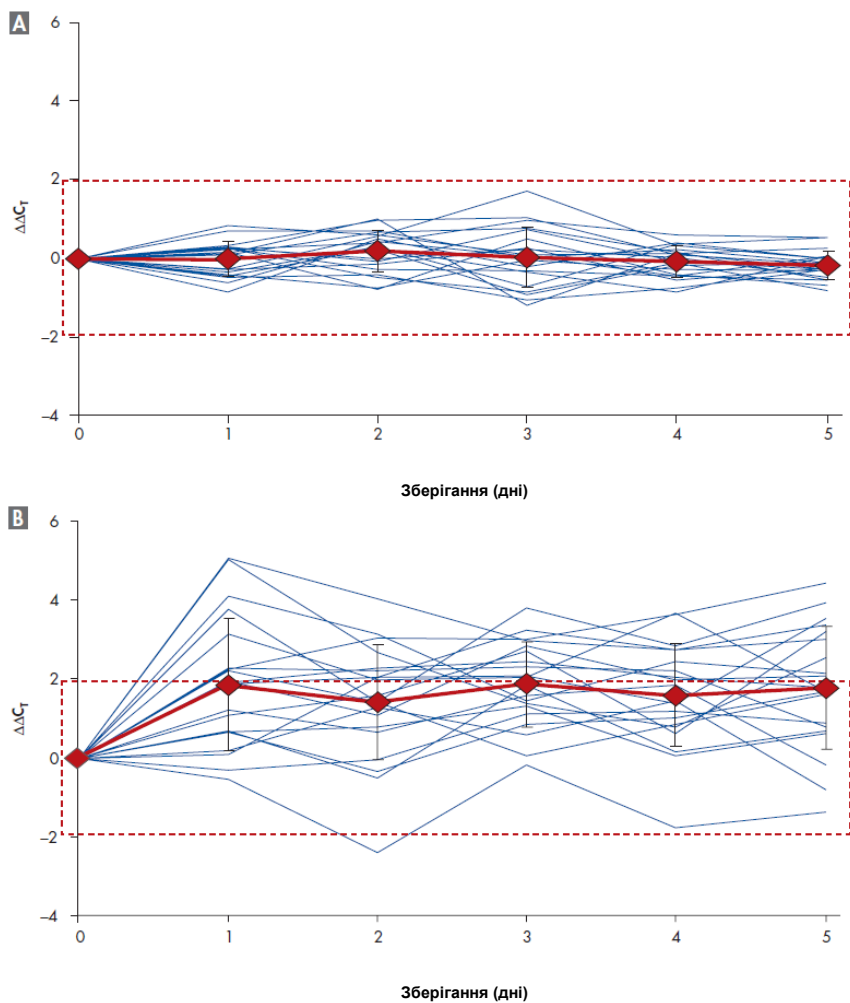




**Рис. 2. Стабільність РНК у зразках крові за температури 18–25 °С: IL1B.** Було взято кров, і після зберігання за температури 18–25 °С виділено сумарну РНК, як показано на рис. 1. Відносні рівні транскриптів IL1B визначалися дуплексною полімеразною ланцюговою реакцією зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) у реальному часі з використанням 18S рРНК як внутрішнього стандарту. Значення для всіх зразків показано з зазначенням середніх значень і стандартних відхилень. Пунктирні лінії вказують на загальну точність аналізу  $\pm 3x$  (1,93 Ct).



**Рис. 3. Стабільність РНК у зразках крові за температури 2–8 °С: FOS.** Кров взято в 10 донорів. Разом із повторними зразками вона зберігається за температури 2–8 °С протягом зазначеної кількості днів із подальшим виділенням сумарної РНК. **[А]** Після взяття кров зберігалась у пробірках для виділення РНК з крові PAXgene (BRT), а для виділення сумарної РНК було застосовано комплект для виділення РНК з крові PAXgene. **[В]** Після взяття кров зберігалась у звичайних пробірках для забору крові з антикоагулянтом ЕДТК, а для виділення сумарної РНК використовувався звичайний метод виділення з очищенням РНК за допомогою технології використання силікатної мембрани. Відносні рівні транскриптів FOS визначалися дуплексною полімеразною ланцюговою реакцією зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) у реальному часі з використанням 18S рРНК як внутрішнього стандарту. Значення для всіх зразків показано з зазначенням середніх значень і стандартних відхилень. Пунктирні лінії вказують на загальну точність аналізу  $\pm 3\sigma$  (2,34  $C_t$ ).



**Рис. 4. Стабільність РНК у зразках крові за температури 2–8 °С: IL1B.** Було взято кров, і після зберігання за температури 2–8 °С виділено сумарну РНК, як показано на рис. 3. Відносні рівні транскриптів IL1B визначалися дуплексною полімеразною ланцюговою реакцією зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) у реальному часі з використанням 18S рРНК як внутрішнього стандарту. Значення для всіх зразків показано з зазначенням середніх значень і стандартних відхилень. Пунктирні лінії вказують на загальну точність аналізу  $\pm 3\sigma$  (1,93  $C_t$ ).

## Концентрування й виділення РНК

Комплект для виділення РНК з крові PAXgene призначений для виділення сумарної РНК із 2,5 мл цільної крові людини, зібраної в пробірку для виділення РНК з крові PAXgene (BRT). Процедура дуже проста й може виконуватися із використанням протоколу ручного або автоматизованого виділення РНК (див. рис. 5 і 10, стор. 21 і 31). В обох протоколах процедура виділення РНК починається з етапу центрифугування для утворення осаду нуклеїнових кислот у пробірці для виділення РНК з крові PAXgene (BRT). Після промивання й ресуспендування осаду здійснюється ручне або автоматизоване виділення РНК. Теоретично обидва протоколи передбачають виконання однакових етапів із використанням таких же компонентів комплекту.

## Ручне виділення РНК

Ресуспендований осад інкубується в оптимізованих буферних розчинах із протеїназою K з метою забезпечення розщеплення білків. Додаткове центрифугування в центрифужній колонці PAXgene Shredder (PSC) здійснюється для гомогенізації клітинного лізату й видалення залишків зруйнованих клітин, а супернатант проточної фракції переноситься в нову мікроцентрифужну пробірку. Етанол додається для регулювання умов зв'язування, і лізат переноситься до центрифужної колонки для виділення РНК PAXgene (PRC). Під час короткого центрифугування РНК селективно зв'язується із силікатною мембраною PAXgene під час проходження через неї забруднюючих речовин. Для видалення решти забруднюючих речовин необхідно виконати кілька ефективних етапів промивання. Між першим і другим етапом промивання мембрана обробляється ДНКазою I (RNFD) з метою видалення слідів зв'язаної ДНК. Після промивання РНК елюється в елюєнтному буферному розчині (BR5) і піддається термічній денатурації.

Сумарна РНК, виділена за допомогою системи для виділення РНК з крові PAXgene, є чистою. У разі застосування ручного протоколу значення  $A_{260}/A_{280}$  коливаються в діапазоні від 1,8 до 2,2, і в  $\geq 95$  % усіх зразків виявлено  $\leq 1$  % (ваг.) геномної ДНК відповідно до вимірювання методом кількісної ПЛР у реальному часі послідовності гену бета-актину. Щонайменше 95 % зразків не демонструють інгібування ЗТ-ПЛР у разі використання до 30 % елюату.

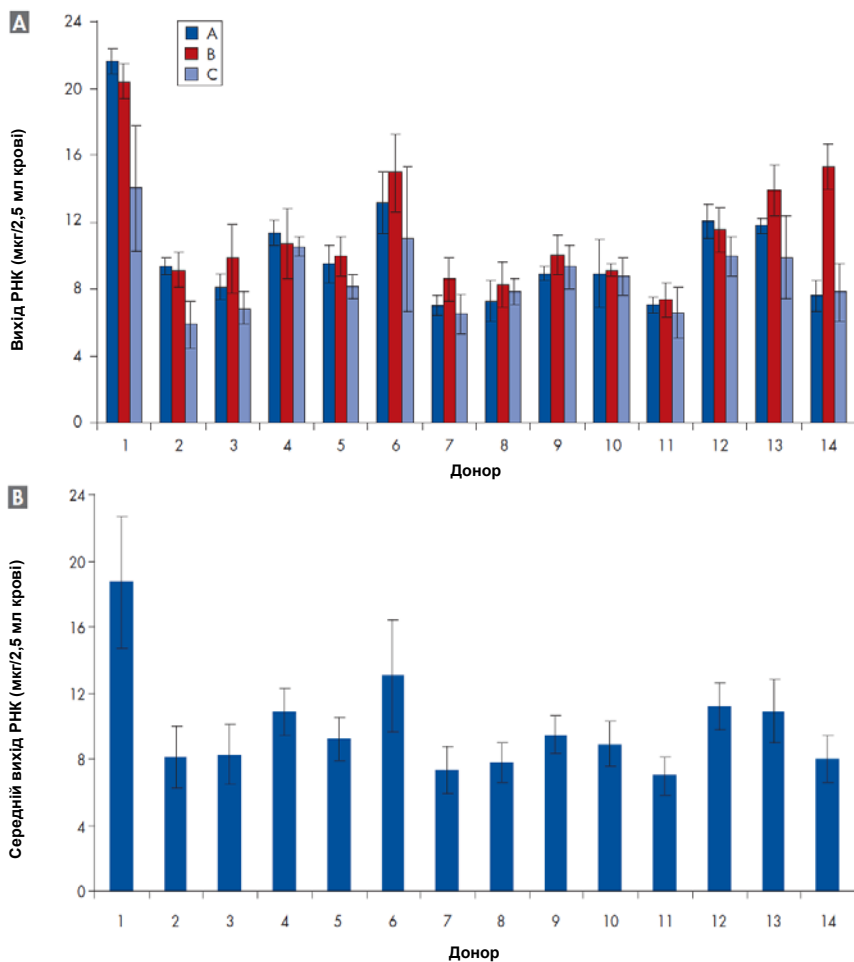


Рис. 5. Процедура ручного виділення РНК з крові PAXgene.

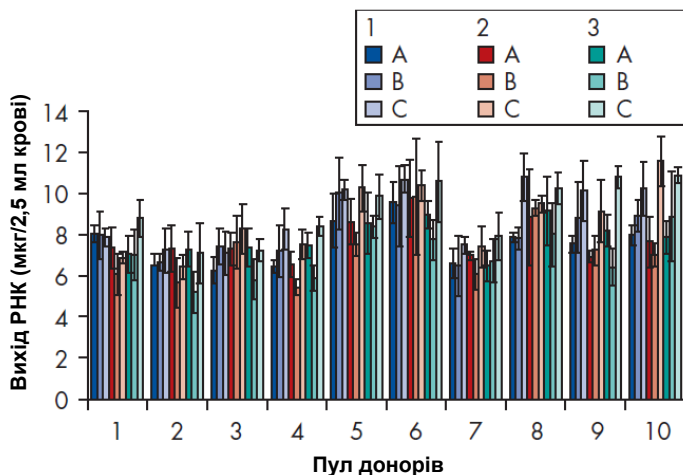
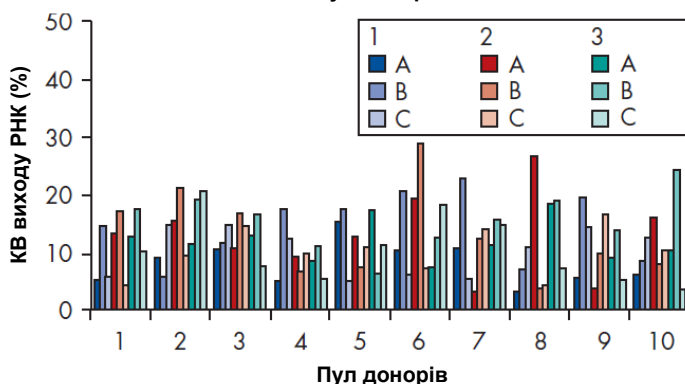
У разі використання ручного протоколу середній час приготування зразків (на основі даних про приготування 12 зразків) становить прибіл. 90 хвилин\*, з яких практична частина займає лише 40 хвилин. Вихід РНК у 2,5 мл цільної крові людини становить  $\geq 3$  мкг для  $\geq 95$  % оброблених зразків. Оскільки вихід значно залежить від донорів, окремі значення виходу можуть відрізнятись. Для окремих донорів система виділення РНК з крові PAXgene забезпечує значення виходу з високою відтворюваністю (рис. 6 і 7, стор. 23 і 24) та відтворювану й повторювану ЗТ-ПЛР (рис. 8 і 9, стор. 28 і 29), що робить її дуже надійним засобом для клінічних діагностичних тестів.

На рис. 6 (стор. 23) показано загальну повторюваність і відтворюваність системи виділення РНК з крові PAXgene. Було проведено додаткові дослідження, які показали вплив різних партій комплекту для виділення РНК з крові PAXgene і різних операторів на відтворюваність виходу РНК та ефективність ЗТ-ПЛР у реальному часі. Оскільки для цих досліджень використовувалися змішані зразки крові від пулу донорів замість окремих пробірок для виділення РНК з крові PAXgene, результати відображатимуть не повторюваність системи, зокрема відхилення між результатами окремих процесів взяття крові, а лише повторюваність приготування зразків (див. рис. 7, стор. 24).

\* Загальна тривалість виконання протоколу, включно з оперативною обробкою пробірок для виділення РНК з крові PAXgene (центрифугування, промивання осаду та ресуспендування осаду).



**Рис. 6. Відтворюване й повторюване виділення РНК.** Чотири паралельні зразки крові, взяті у кожного з 14 донорів, було вручну оброблено кожним із 3 лаборантів (А, В, С). Було використано три комплекти обладнання, і всі зразки, підготовлені одним лаборантом, було оброблено з застосуванням одного й того ж обладнання. **[А]** Наведено середні значення та стандартні відхилення виходу РНК для паралельних зразків, отриманих від одних і тих самих донорів, але оброблених різними лаборантами. **[В]** Дванадцять паралельних зразків крові від кожного з 14 донорів було оброблено 3 різними лаборантами. Наведено середні значення та стандартні відхилення виходу РНК для зразків, отриманих від одних і тих самих донорів і оброблених усіма лаборантами. Для всіх зразків РНК співвідношення  $A_{260}/A_{280}$  коливається в діапазоні від 1,8 до 2,2.

**A****B**

**Рис. 7. Повторюваність і відтворюваність виходу РНК для різних операторів і партій комплектів для виділення РНК з крові PAXgene з використанням змішаних зразків крові від пулу донорів.** У 30 різних донорів було взято зразки крові в пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT; 12 пробірок на кожного донора, разом 360 пробірок). Вміст пробірок 3 донорів було об'єднано й розділено на аліквоти для отримання 36 зразків. Ці 36 зразків для кожного пулу з 3 донорів було вручну оброблено 3 різними операторами. Кожен оператор використовував 3 різні партії комплекту для виділення РНК з крові PAXgene для виділення й обробив чотири паралельні зразки для кожного пулу з 10 донорів. **[A]** Вихід РНК і стандартні відхилення для кожної комбінації «оператор – партія». Чотири паралельні зразки крові, взяті у 10 донорів, було оброблено 3 різними операторами (А, В, С) з використанням кожної з 3 партій комплектів (1, 2, 3). Наведено середні значення (у стовпцях) і стандартні відхилення (планки похибок) для чотирьох зразків з одного й того ж пулу донорів, оброблених різними операторами з використанням різних партій комплектів. **[B]** На рис. 7А показано коефіцієнт варіації (КВ) виходу РНК для кожного пулу донорів для всіх комбінацій «оператор – партія» (А, В, С; 1, 2, 3), який розраховано на основі середнього значення та стандартного відхилення (СВ) виходу РНК.



**Таблиця 1А. Відтворюваність у межах кожної партії та для кожного користувача для вибраних пулів донорів (1, 6, 9, 10)**

| Комбінація даних       | Пул донорів 1<br>5,1 x 10 <sup>6</sup> клітин/мл |          |        | Пул донорів 6<br>6,5 x 10 <sup>6</sup> клітин/мл   |          |        |
|------------------------|--|----------|--------|--|----------|--------|
|                        | Середній вихід (мкг)                             | СВ (мкг) | КВ (%) | Середній вихід (мкг)                               | СВ (мкг) | КВ (%) |
| Партія 1, користувач А | 8,03   | 0,42     | 5      | 9,55   | 0,99     | 10     |
| Партія 1, користувач В | 7,98   | 1,17     | 15     | 9,38   | 1,94     | 21     |
| Партія 1, користувач С | 7,87   | 0,45     | 6      | 10,71  | 0,65     | 6      |
| Партія 2, користувач А | 7,32   | 0,98     | 13     | 9,78   | 1,89     | 19     |
| Партія 2, користувач В | 6,09   | 1,04     | 17     | 9,82   | 2,83     | 29     |
| Партія 2, користувач С | 6,87   | 0,31     | 4      | 10,37  | 0,74     | 7      |
| Партія 3, користувач А | 7,04   | 0,90     | 13     | 8,96   | 0,68     | 8      |
| Партія 3, користувач В | 6,98   | 1,22     | 17     | 7,73   | 0,97     | 13     |
| Партія 3, користувач С | 8,78   | 0,89     | 10     | 10,59  | 1,94     | 18     |
| Комбінація даних       | Пул донорів 9<br>8,4 x 10 <sup>6</sup> клітин/мл |          |        | Пул донорів 10<br>10,2 x 10 <sup>6</sup> клітин/мл |          |        |
|                        | Середній вихід (мкг)                             | СВ (мкг) | КВ (%) | Середній вихід (мкг)                               | СВ (мкг) | КВ (%) |
| Партія 1, користувач А | 7,52   | 0,41     | 6      | 7,96   | 0,49     | 6      |
| Партія 1, користувач В | 8,82   | 1,72     | 19     | 8,90   | 0,76     | 9      |
| Партія 1, користувач С | 10,14  | 1,46     | 14     | 10,22  | 1,29     | 13     |
| Партія 2, користувач А | 6,92   | 0,27     | 4      | 7,63   | 1,23     | 16     |
| Партія 2, користувач В | 7,20   | 0,71     | 10     | 7,00   | 0,56     | 8      |
| Партія 2, користувач С | 9,14   | 1,52     | 17     | 11,56  | 1,21     | 10     |
| Партія 3, користувач А | 8,18   | 0,76     | 9      | 7,85   | 0,82     | 10     |
| Партія 3, користувач В | 6,41   | 0,88     | 14     | 8,88   | 2,17     | 24     |
| Партія 3, користувач С | 10,78  | 0,56     | 5      | 10,88  | 0,37     | 3      |

Таблиця 1В. Відтворюваність для кожного користувача та всіх партій для вибраних пулів донорів (1, 6, 9, 10)

| Комбінація даних         | Пул донорів 1<br>5,1 x 10 <sup>6</sup> клітин/мл |          |        | Пул донорів 6<br>6,5 x 10 <sup>6</sup> клітин/мл   |          |        |
|--------------------------|--|----------|--------|--|----------|--------|
|                          | Середній вихід (мкг)                             | СВ (мкг) | КВ (%) | Середній вихід (мкг)                               | СВ (мкг) | КВ (%) |
| Користувач А, усі партії | 7,46   | 0,85     | 11     | 9,43   | 1,22     | 13     |
| Користувач В, усі партії | 7,02   | 1,31     | 19     | 8,98   | 2,09     | 23     |
| Користувач С, усі партії | 7,84   | 0,98     | 13     | 10,56  | 1,15     | 11     |
| Комбінація даних         | Пул донорів 9<br>8,4 x 10 <sup>6</sup> клітин/мл |          |        | Пул донорів 10<br>10,2 x 10 <sup>6</sup> клітин/мл |          |        |
|                          | Середній вихід (мкг)                             | СВ (мкг) | КВ (%) | Середній вихід (мкг)                               | СВ (мкг) | КВ (%) |
| Користувач А, усі партії | 7,54   | 0,72     | 10     | 7,81   | 0,82     | 11     |
| Користувач В, усі партії | 7,48   | 1,50     | 20     | 8,26   | 1,54     | 19     |
| Користувач С, усі партії | 10,02  | 1,34     | 13     | 10,89  | 1,10     | 10     |

Таблиця 1С. Відтворюваність у межах кожної партії та для всіх користувачів для вибраних пулів донорів (1, 6, 9, 10)

| Комбінація даних          | Пул донорів 1<br>5,1 x 10 <sup>6</sup> клітин/мл |          |        | Пул донорів 6<br>6,5 x 10 <sup>6</sup> клітин/мл   |          |        |
|---------------------------|--|----------|--------|--|----------|--------|
|                           | Середній вихід (мкг)                             | СВ (мкг) | КВ (%) | Середній вихід (мкг)                               | СВ (мкг) | КВ (%) |
|                           | Партія 1, усі користувачі                        | 7,96     | 0,69   | 9  | 9,88     | 1,34   |
| Партія 2, усі користувачі | 6,76   | 0,93     | 14     | 9,99   | 1,84     | 18     |
| Партія 3, усі користувачі | 7,60   | 1,27     | 17     | 9,09   | 1,71     | 19     |
| Комбінація даних          | Пул донорів 9<br>8,4 x 10 <sup>6</sup> клітин/мл |          |        | Пул донорів 10<br>10,2 x 10 <sup>6</sup> клітин/мл |          |        |
|                           | Середній вихід (мкг)                             | СВ (мкг) | КВ (%) | Середній вихід (мкг)                               | СВ (мкг) | КВ (%) |
|                           | Партія 1, усі користувачі                        | 8,83     | 1,63   | 19   | 9,02     | 1,27   |
| Партія 2, усі користувачі | 7,75   | 1,36     | 18     | 8,73   | 2,31     | 26     |
| Партія 3, усі користувачі | 8,46   | 1,99     | 24     | 9,20   | 1,80     | 20     |

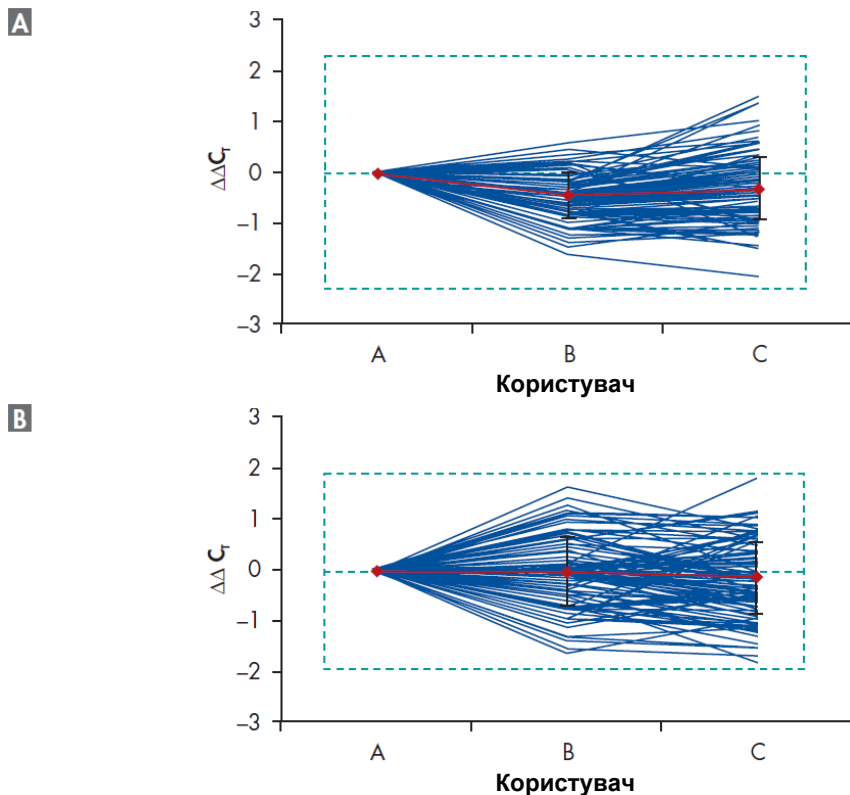
Таблиця 1D. Відтворюваність для всіх партій і всіх користувачів для вибраних списків донорів (1, 6, 9, 10)

| Комбінація даних          | Пул донорів 1<br>5,1 x 10 <sup>6</sup> клітин/мл |          |        | Пул донорів 6<br>6,5 x 10 <sup>6</sup> клітин/мл |          |        |
|---------------------------|--|----------|--------|--|----------|--------|
|                           | Середній вихід (мкг)                             | СВ (мкг) | КВ (%) | Середній вихід (мкг)                             | СВ (мкг) | КВ (%) |
| Партія 1, усі користувачі | 7,44   | 1,09     | 15     | 9,66   | 1,65     | 17     |

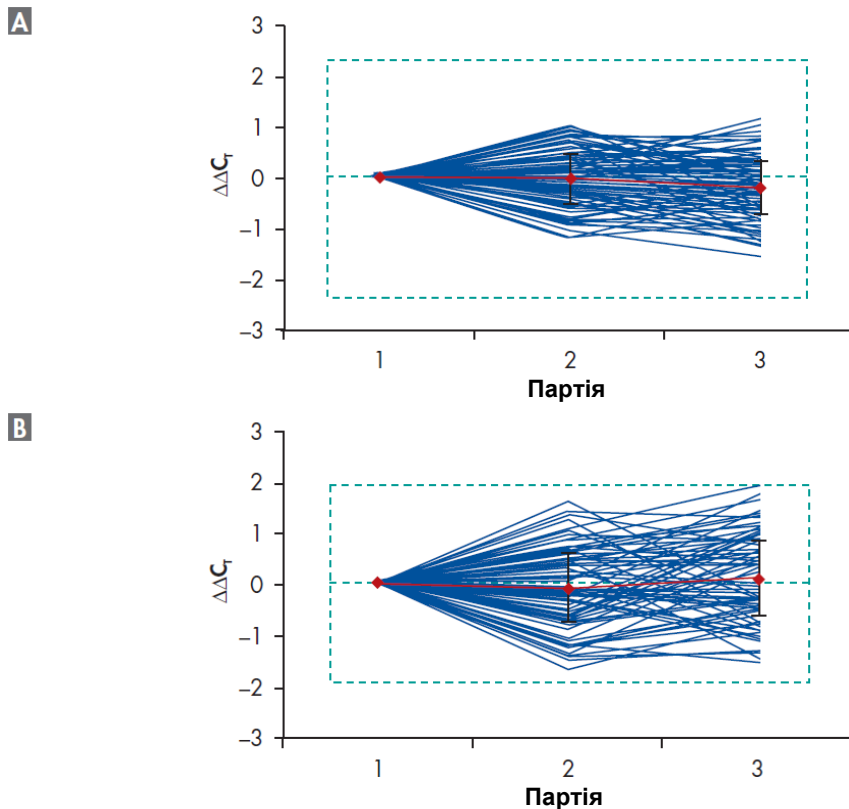
  

| Комбінація даних          | Пул донорів 9<br>8,4 x 10 <sup>6</sup> клітин/мл |          |        | Пул донорів 10<br>10,2 x 10 <sup>6</sup> клітин/мл |          |        |
|---------------------------|--|----------|--------|--|----------|--------|
|                           | Середній вихід (мкг)                             | СВ (мкг) | КВ (%) | Середній вихід (мкг)                               | СВ (мкг) | КВ (%) |
| Партія 1, усі користувачі | 8,35   | 1,70     | 20     | 8,99   | 1,80     | 20     |

Детальний аналіз 4 репрезентативних пулів донорів. У пулах, які вибрано на основі кількості лейкоцитів, відображаються максимальне, середнє й мінімальне значення з діапазону кількості лейкоцитів ( $4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$  лейкоцитів/мл). Кількість лейкоцитів відповідає середньому з 3 значень кількості лейкоцитів у 3 донорів із кожного пулу донорів.



**Рис. 8. Відтворюваність ЗТ-ПЛР – для всіх користувачів.** РНК, виділена під час виконання аналізу, показаного на рис. 7, використовувалась для ЗТ-ПЛР у реальному часі. Відносні рівні транскриптів **[A]** FOS і **[B]** IL1B визначалися дуплексною полімеразною ланцюговою реакцією зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) у реальному часі з використанням 18S рРНК як внутрішнього стандарту. На графіку показано значення для всіх зразків відносно значень для користувача 1 (10 пулів донорів x 3 партії комплектів x 4 паралельні аналізи = 120 наборів даних для кожного гену) із середніми значеннями (червоні лінії) і стандартними відхиленнями (чорні планки) для всіх відображених зразків. Пунктирні лінії вказують на загальну точність аналізів  $\pm 3\sigma$  (FOS: 2,34  $C_t$ ; IL1B: 1,93  $C_t$ ).



**Рис. 9. Відтворюваність ЗТ-ПЛР – для всіх партій комплексів.** РНК, виділена під час виконання аналізу, показаного на рис. 7, використовувалась для ЗТ-ПЛР у реальному часі. Відносні рівні транскриптів [A] FOS і [B] IL1B визначалися дуплексною полімеразною ланцюговою реакцією зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) у реальному часі з використанням 18S рРНК як внутрішнього стандарту. На графіку показано значення для всіх зразків відносно значень для партії комплексів 1 (10 пулів донорів x 3 користувача x 4 паралельні аналізи = 120 наборів даних для кожного гену) із середніми значеннями (червоні лінії) і стандартними відхиленнями (чорні планки) для всіх відображених зразків. Пунктирні лінії вказують на загальну точність аналізів  $\pm 3x$  (FOS: 2,34  $C_T$ ; IL1B: 1,93  $C_T$ ).

Таблиця 2. Підсумки даних ЗТ-ПЛР на рис. 8 і 9

| Система тестів  | Аналіз рРНК FOS/18S           |                                | Аналіз рРНК IL1B/18S          |                                |
|---|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
|   | Середнє ( $\Delta\Delta Ct$ ) | $\pm$ СВ ( $\Delta\Delta Ct$ ) | Середнє ( $\Delta\Delta Ct$ ) | $\pm$ СВ ( $\Delta\Delta Ct$ ) |
| <b>Відтворюваність для кожного користувача та всіх партій</b> |                               |                                |                               |                                |
| Усі користувачі, партія 1 – партія 1                          | 0,00                          | 0,00                           | 0,00                          | 0,00                           |
| Усі користувачі, партія 1 – партія 2                          | -0,03                         | 0,48                           | -0,07                         | 0,66                           |
| Усі користувачі, партія 1 – партія 3                          | -0,21                         | 0,52                           | 0,11                          | 0,71                           |
| <b>Відтворюваність для кожного користувача та всіх партій</b> |                               |                                |                               |                                |
| Усі партії, користувач А – користувач А                       | 0,00                          | 0,00                           | 0,00                          | 0,00                           |
| Усі партії, користувач А – користувач В                       | -0,46                         | 0,44                           | -0,06                         | 0,69                           |
| Усі партії, користувач А – користувач С                       | -0,31                         | 0,60                           | -0,15                         | 0,71                           |

Користувач – лаборант, який проводив дослідження.

Партія – номер партії комплектів, яка використовувалась у цьому дослідженні.

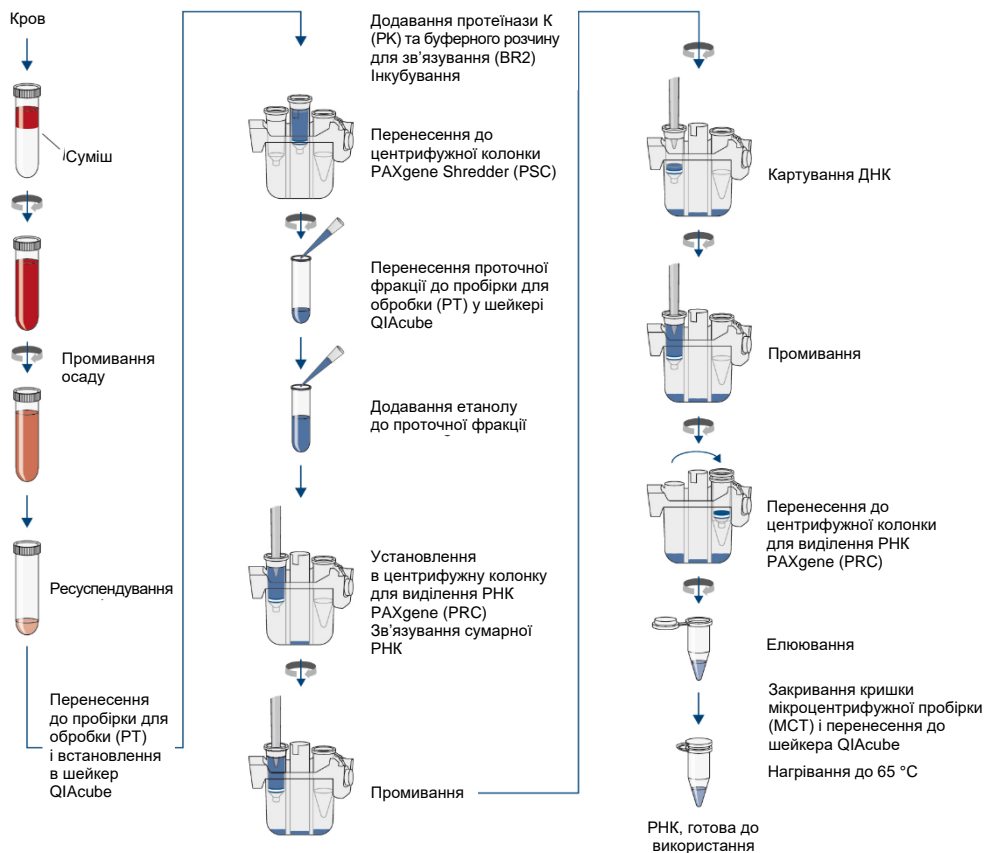
СВ – стандартне відхилення.

Середні значення  $\Delta\Delta Ct$  (N = 120) і стандартні відхилення відображаються для даних, представлених на рис. 8 і 9.

## Автоматизоване виділення РНК

Підготовка зразків здійснюється автоматизовано з використанням стандартного приладу QIAcube® (номер за каталогом 9001882 [110 В], номер за каталогом 9001293 [230 В]; без QIAcube Connect) і передбачає виконання тих самих етапів, що й для ручної процедури. Це дає змогу застосовувати комплект для виділення РНК з крові PAXgene з метою виділення високоякісної РНК. Для отримання детальнішої інформації про QIAcube. див. *Посібник користувача QIAcube* або перейдіть за посиланням [www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube).

Протокол автоматизованого виділення РНК складається із 2 частин (або протоколів): «Виділення РНК з крові PAXgene. Частина А» і «Виділення РНК з крові PAXgene. Частина В» із незначним втручанням оператора між цими 2 частинами (див. рис. 10, стор. 31).



Відцентрифугований, промитий і ресуспендований осад нуклеїнових кислот (див. розділ «Концентрування й виділення РНК», стор. 20) переноситься з пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT) у пробірки для обробки (PT), установлені в термошейкер на робочому столі QIAcube. Оператор вибирає та запускає з меню протокол «Виділення РНК з крові PAXgene. Частина А». QIAcube виконує етапи

протоколу, включно з елююванням РНК в елюєнтному буферному розчині (BR5). Оператор переносить мікроцентрифужні пробірки (МСТ), які містять виділену РНК, у термошейкер QIAcube. Оператор вибирає та запускає з меню протокол «Виділення РНК крові PAXgene. Частина В», а термічну денатурацію виконує прилад QIAcube.

Середній час приготування зразків (на основі даних про приготування 12 зразків) становить 151 хв\* зі значно меншим часом практичної частини порівняно з ручним протоколом.

Вихід РНК у 2,5 мл цільної крові людини становить  $\geq 3$  мкг для  $\geq 95$  % оброблених зразків. На рис. 11 (стор. 33) показано вихід РНК з 216 зразків загалом, підготовлених 3 операторами з використанням автоматизованого протоколу і 3 партій комплектів. Оскільки для цього дослідження було використано змішані зразки крові від пулу донорів замість окремих пробірок для виділення РНК з крові PAXgene (BRT), результати не відображають вихід РНК, очікуваний для окремих зразків, отриманих від окремих заборів крові. Оскільки вихід значно залежить від донорів, окремі значення виходу можуть відрізнатись (рис. 11, стор. 33).

Щонайменше 95 % зразків не демонструють інгібування ЗТ-ПЛР у разі використання до 30 % елюату. У разі використання автоматизованого протоколу перехресне забруднення зразків виявити неможливо відповідно до вимірювання методом кількісної ЗТ-ПЛР послідовності транскриптів ABL1 і FOS у РНК-негативних зразках (вода), сполучених із РНК-позитивними зразками (цільна кров людини) під час виконання одного циклу.

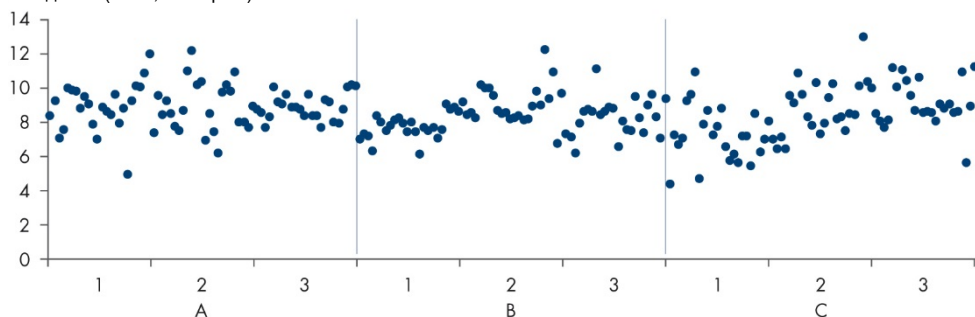
РНК, виділена в результаті використання системи для виділення РНК з крові PAXgene і автоматизованого протоколу, є чистою, про що свідчать відсутність інгібування ЗТ-ПЛР (див. рис. 11, стор. 33) і значення  $A_{260}/A_{280}$  у діапазоні від 1,8 до 2,2. У  $\geq 95$  % всіх зразків виявлено  $\leq 1$  % (ваг.) геномної ДНК відповідно до вимірювання методом

\* Загальна тривалість виконання протоколу, включно з оперативною обробкою пробірок для виділення РНК з крові PAXgene (центрифугування, промивання осаду та ресуспендування осаду).



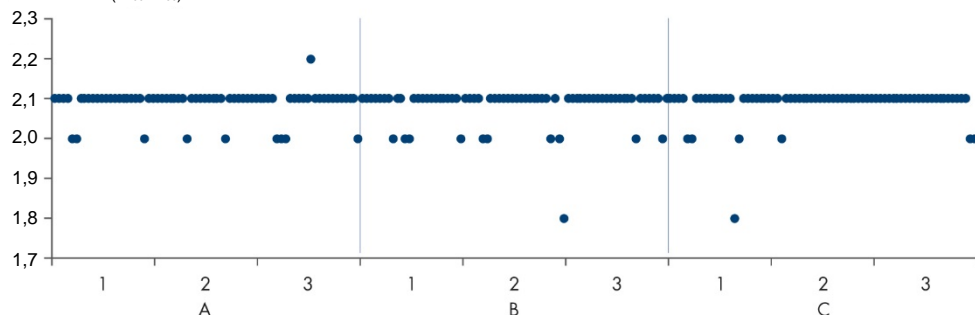
кількісної ПЛР послідовності гену бета-актину. На рис. 12 і 13 (стор. 33 і 34) показано значення  $A_{260}/A_{280}$  і відносну геномну ДНК з 216 зразків, підготовлених 3 операторами з використанням автоматизованого протоколу і 3 партій комплектів.

Вихід РНК (мкг/2,5 мл крові)

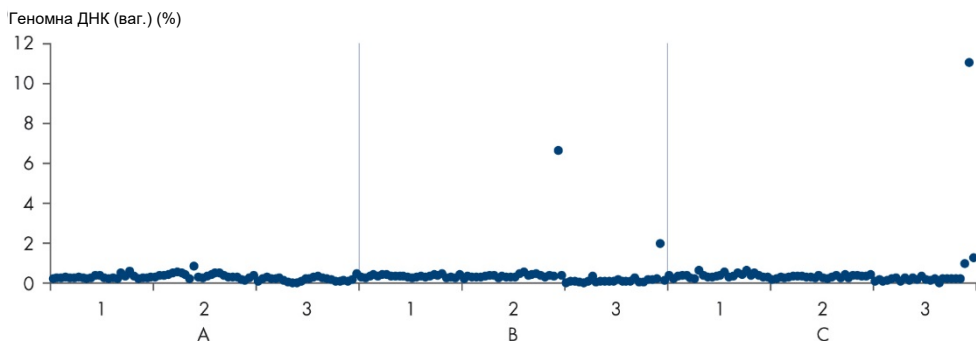


**Рис. 11. Вихід РНК – автоматизована обробка.** У 36 різних донорів було взято зразки крові в пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT; 6 пробірок на кожного донора, разом 216 пробірок). Вміст пробірок 6 донорів було об'єднано й розділено на аліквати для отримання 36 зразків. Ці 36 зразків для кожного пулу з 6 донорів було оброблено 3 різними операторами (А, В, С). Кожен оператор використовував 3 різні партії (1, 2, 3) комплекту для виділення РНК з крові PAXgene для автоматизованого виділення й обробив чотири паралельні зразки для кожного пулу з 6 донорів. Значення виходу РНК всіх окремих зразків показано для кожної комбінації «оператор – партія».

Чистота РНК ( $A_{260}/A_{280}$ )

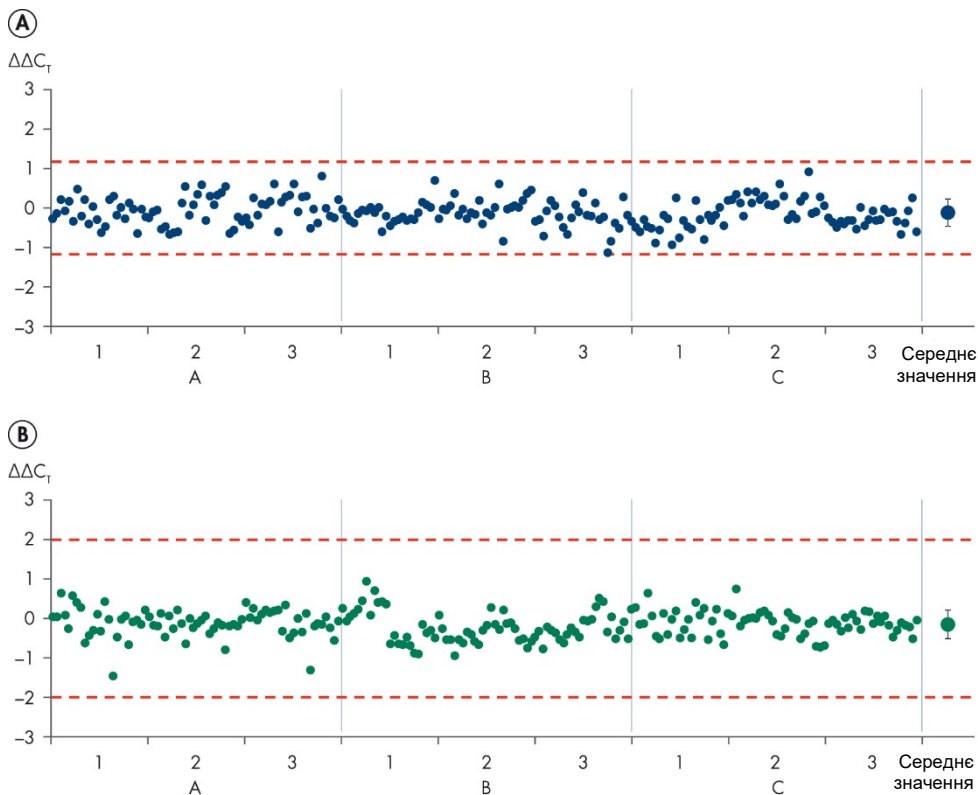


**Рис. 12. Чистота РНК (значення  $A_{260}/A_{280}$ ) – автоматизована обробка.** РНК було виділено 3 різними операторами (А, В, С) із використанням 3 різних партій (1, 2, 3) комплекту для виділення РНК з крові PAXgene під час експерименту, описаного на рис. 11. Значення  $A_{260}/A_{280}$  всіх окремих зразків показано для кожної комбінації «оператор – партія».



**Рис. 13. Чистота РНК (% забруднення геномної ДНК) – автоматизована обробка.** РНК було виділено 3 різними операторами (А, В, С) із використанням 3 різних партій (1, 2, 3) комплекту для виділення РНК з крові RAXgene під час експерименту, описаного на рис. 11. Кількість геномної ДНК (ваг.) у всіх окремих зразках показано для кожної комбінації «оператор – партія».

Автоматизований протокол виділення РНК за допомогою системи виділення РНК з крові RAXgene крові забезпечує результати ЗТ-ПЛР з високою відтворюваністю й повторюваністю, як показано на рис. 14 (стор. 35), що робить його дуже надійним засобом для клінічних діагностичних тестів.



**Рис. 14. Відтворюваність ЗТ-ПЛР – ручний та автоматизований протоколи.** РНК було виділено 3 різними операторами (А, В, С) із використанням 3 різних партій (1, 2, 3) комплекту для виділення РНК з крові РАХgene і автоматизованого протоколу під час експерименту, описаного на рис. 11. Водночас РНК було виділено з відповідних пробірок із паралельними зразками із використанням ручного протоколу. Відносні рівні транскриптів [А] FOS і [В] IL1B визначалися дуплексною полімеразною ланцюговою реакцією зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) у реальному часі з використанням 18S рРНК як внутрішнього стандарту. Можливі відмінності між рівнями транскриптів РНК, отриманої з парних зразків крові з використанням обох протоколів виділення (автоматизованого й ручного), було розраховано за допомогою методу  $\Delta\Delta C_t$ . Окремі значення  $\Delta\Delta C_t$  для всіх пар зразків (4 паралельні зразки x 6 пулів донорів x 3 партії комплектів x 3 оператори = 216 пар для кожного гена) наведено у вигляді окремих точок із середніми значеннями (більші точки) та стандартними відхиленнями (чорні смуги) для всіх показаних зразків. Пунктирні лінії вказують на загальну точність аналізів  $\pm 3x$  (FOS: 1,16  $C_t$ ; IL1B: 1,98  $C_t$ ; різна точність аналізу порівняно з рис. 1–4, 8 і 9 через різні варіанти аналізу).

# Обладнання й реагенти, які постачає користувач

Під час роботи з хімічними речовинами необхідно носити лабораторний халат, одноразові рукавички та захисні окуляри. Для отримання детальнішої інформації див. відповідні паспорти безпеки матеріалів, які можна отримати у постачальника продукту.

## Для всіх протоколів

- Пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT; номер за каталогом 762165)
- Етанол (96–100 %, ступінь чистоти: чистий для аналізу)
- Піпетки\* (10 мкл – 4 мл)
- Стерильні наконечники піпеток без вмісту РНКаз із аерозольним фільтром<sup>†</sup>
- Мірний циліндр<sup>‡</sup>
- Центрифуга\*, здатна створювати відцентрову силу 3000–5000 x g, оснащена ротором із вільно підвішеними стаканами, призначеними для тримання пробірок для виділення РНК з крові PAXgene (BRT)
- Вихровий змішувач\*
- Подрібнений лід
- Перманентний маркер для маркування

\* Необхідно забезпечити регулярне проведення перевірок, обслуговування й калібрування всіх приладів відповідно до рекомендацій виробника.

<sup>†</sup> Обов'язково ознайомтеся з настановами щодо поводження з РНК (додаток А, стор. 72).

<sup>‡</sup> Для додавання етанолу до концентрату буферного розчину BR4.

## Для ручного протоколу

- Мікроцентрифуга з регульованою швидкістю обертання\* здатна створювати відцентрову силу в діапазоні 1000–8000 x g, хоча застосовуються й менші та більші відцентрові сили (для отримання детальнішої інформації див. кроки протоколу), і оснащена ротором для мікроцентрифужних пробірок об'ємом 2 мл.
- Шейкер-інкубатор\*, здатний інкубувати за температури 55 °C і 65 °C, а також здійснювати струшування зі швидкістю від 400 до 1400 об./хв (наприклад, Eppendorf® Thermomixer Compact або подібний)

## Для автоматизованого протоколу

- QIAcube\* (QIAGEN, номер за каталогом 9001882 [110 B], номер за каталогом 9001293 [230 B])
- Ножиці

### Витратні матеріали QIAcube

- Наконечники з фільтрами, 1000 мкл (1024) (QIAGEN, номер за каталогом 990352)<sup>†</sup>
- Флакони для реагентів, 30 мл (6) (QIAGEN, номер за каталогом 990393)<sup>†</sup>
- Адаптери ротора (10 x 24) (QIAGEN, номер за каталогом 990394)<sup>†</sup>

### Додаткове приладдя QIAcube

- Штатив для флаконів для реагентів (QIAGEN, номер за каталогом 990390)<sup>†</sup>
- Тримач адаптера ротора (QIAGEN, номер за каталогом 990392)<sup>†</sup>

\* Необхідно забезпечити регулярне проведення перевірок, обслуговування й калібрування всіх приладів відповідно до рекомендацій виробника.

<sup>†</sup> Також включено до стартового набору, QIAcube (QIAGEN, номер за каталогом 990395)

# Важливі примітки

## Використання QIAcube

Обов'язково ознайомтеся з правилами експлуатації QIAcube. Перш ніж виконувати протоколи автоматизованого виділення РНК з крові PAXgene, ознайомтеся із *Посібником користувача QIAcube* і всією додатковою супровідною інформацією щодо QIAcube, звертаючи особливу увагу на правила техніки безпеки.

## Запуск QIAcube

Зачиніть дверцята приладу QIAcube і ввімкніть QIAcube, натиснувши вимикач живлення (див. рис. 15, стор. 39).

Пролунає звуковий сигнал, і з'явиться екран запуску. Прилад автоматично виконає ініціалізацію.

## Установлення протоколів на приладі QIAcube

Перш ніж на приладі QIAcube можна буде виконати перший цикл приготування РНК, необхідно встановити початковий протокол. Установіть протоколи «Виділення РНК крові PAXgene. Частина А» і «Виділення РНК крові PAXgene. Частина В».

Протоколи доступні за посиланням **[www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube)**. Їх потрібно завантажити на USB-носії, який входить до комплекту постачання приладу QIAcube, і перенести на QIAcube через USB-порт.

USB-порт, розташований за захисною панеллю (див. рис. 15, стор. 39), використовується для підключення USB-носія (входить до комплекту постачання QIAcube) до приладу QIAcube. Такі файли даних, як файли журналів або звітів, також можна перенести через USB-порт із приладу QIAcube на USB-носії.



USB-порт призначений тільки для використання з USB-носієм, який надається компанією QIAGEN. Не під'єднуйте до цього порту жодних інших пристроїв.



Не виймайте USB-носії, поки триває завантаження протоколів, передача файлів даних або виконання протоколу.



Рис. 15. Вигляд QIAcube спереду.

1

Сенсорний екран

2

Дверцята

3

Послідовний порт RS232 за захисною панеллю (тільки для використання фахівцями з технічного обслуговування приладів QIAGEN)

4

USB-порт за захисною панеллю

5

Вимикач живлення

6

Ящик для відходів

## Завантаження приладу QIAcube

Для заощадження часу завантаження можна виконувати під час одного або обох 10-хвилинних етапів центрифугування (етапи 3 та 5), описаних у розділі «Протокол: Автоматизоване виділення сумарної РНК з цільної крові людини, зібраної в пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT)», стор. 60.

### Флакони для реагентів

Перед виконанням кожного циклу на приладі QIAcube обережно наповніть 4 флакони реагентами, переліченими в таблиці 3, до максимального рівня індикатора або, якщо це неможливо, до рівня, який дозволяють об'єми буферного розчину, що постачається з комплектом для виділення РНК з крові PAXgene. Чітко вкажіть на флаконах і кришках назви буферних розчинів і встановіть флакони для реагентів у відповідні положення на штативі для флаконів для реагентів. Установіть штатив на робочий стіл QIAcube, як показано на рис. 16 і 17 (стор. 41 і 42).



Об'єму буферного розчину BR2 з комплекту постачання недостатньо для заповнення флакона для реагентів до рівня індикатора. Після обробки кількох зразків у попередніх циклах буферних розчинів BR3 і BR4 може не вистачити для заповнення флакона до рівня індикатора.



Перш ніж установити штатив на робочий стіл, зніміть кришки із флаконів.



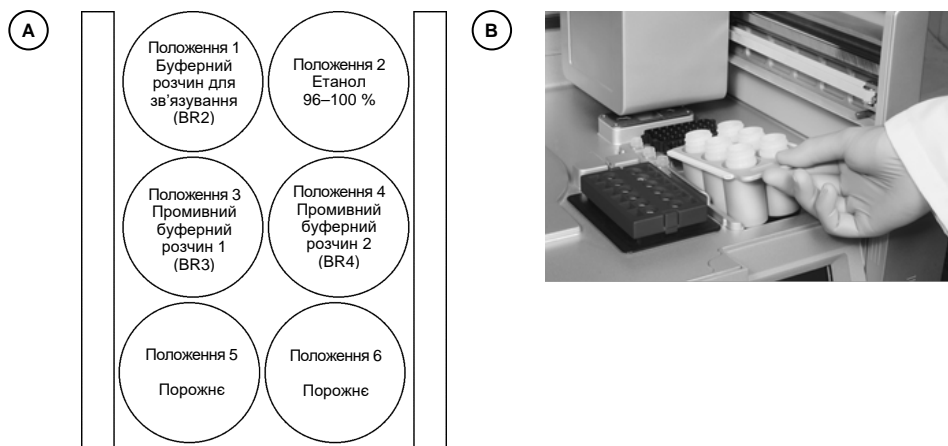
Об'ємів буферних розчинів, які постачаються разом із комплектом для виділення РНК з крові PAXgene (50), вистачить щонайбільше для 7 циклів приготування РНК за допомогою приладу QIAcube. При цьому за один цикл здійснюється обробка від 2 до 12 зразків. Загалом слід уникати циклів із меншою кількістю зразків, щоб забезпечити обробку 50 зразків за макс. 7 циклів приготування РНК. Якщо циклів приготування РНК буде більше ніж 7, для обробки останніх зразків може не вистачити об'ємів буферних розчинів.



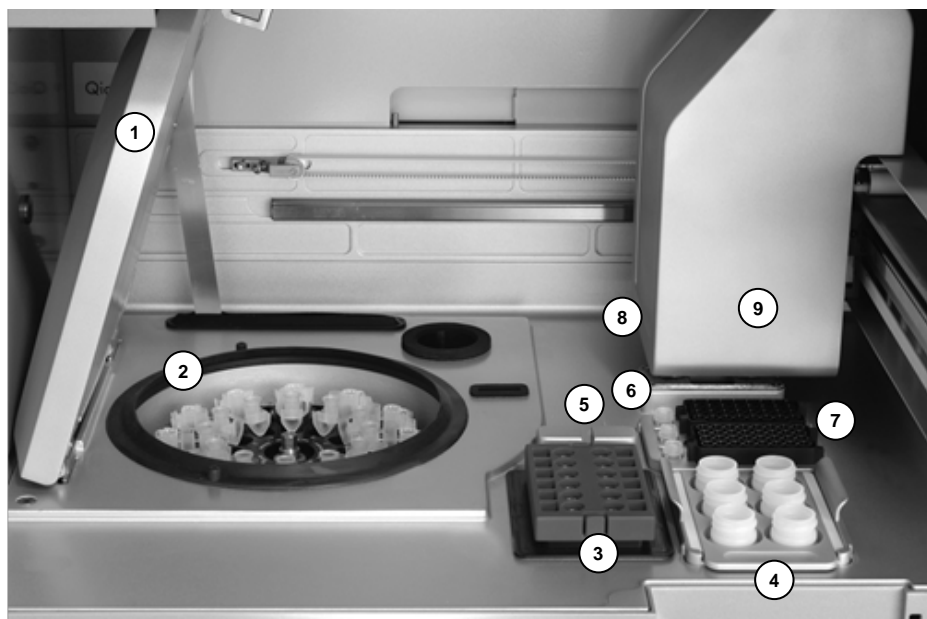
**Таблиця 3. Положення на штативі для флаконів для реагентів**

| Положення | Реагент                               |
|-----------|---------------------------------------|
| 1         | Буферний розчин для зв'язування (BR2) |
| 2         | Етанол 96–100 %                       |
| 3         | Промивний буферний розчин 1 (BR3)     |
| 4         | Промивний буферний розчин 2 (BR4)*    |
| 5         | – (залишити порожнім)                 |
| 6         | – (залишити порожнім)                 |

\* Промивний буферний розчин 2 (BR4) постачається у вигляді концентрату. Перед першим використанням додайте 4 частини за об'ємом етанолу (96–100 %, ступінь чистоти: чистий для аналізу), як зазначено на флаконі, щоб отримати робочий розчин.



**Рис. 16. Установлення флаконів для реагентів у штатив. [A]** Схематичне зображення положень і вмісту флаконів у штативі для флаконів для реагентів. **[B]** Завантаження штатива на QIAcube.



**Рис. 17. Внутрішній вигляд QIAcube.**

- |                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| ① Кришка центрифуги                 | ⑥ Слоти для мікроцентрифужних пробірок            |
| ② Центрифуга                        | ⑦ Штативи для наконечників                        |
| ③ Шейкер                            | ⑧ Слоти для наконечників і колонок для утилізації |
| ④ Штатив для флаконів для реагентів | ⑨ Механічний маніпулятор                          |
| ⑤ Датчик наконечника                |   |

## Центрифужні колонки (PRC, PSC), мікроцентрифужні пробірки (MCT) і пластиковий посуд QIAcube

Установіть на QIAcube 2 штативи, заповнені наконечниками з фільтрами об'ємом 1000 мкл (див. рис. 17, стор. 42). За потреби встановіть у штативи додаткові наконечники.



Використовуйте тільки наконечники з фільтрами об'ємом 1000 мкл, призначені для застосування з QIAcube.

Позначте за допомогою перманентного маркера адаптери роторів і мікроцентрифужні пробірки (MCT) для кожного зразка. Відкрийте центрифужні колонки PAXgene Shredder (PSC), які будуть використовуватися, і повністю відріжте кришки за допомогою ножиць (див. рис. 18, стор. 44).

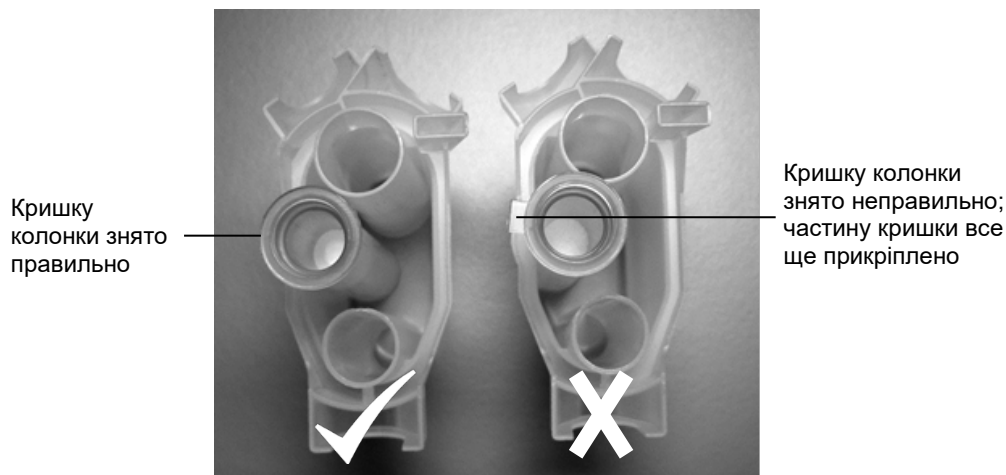


Для забезпечення належної роботи механічного маніпулятора QIAcube необхідно повністю зняти (зрізати) кришки та всі пластикові деталі, які з'єднують кришку з центрифужними колонами PAXgene Shredder (PSC; див. рис. 16). Інакше механічний маніпулятор не зможе захопити центрифужні колонки (PSC, PRC) належним чином.

Установіть центрифужну колонку для виділення РНК PAXgene (PRC), центрифужну колонку PAXgene Shredder (PSC, без кришки) і позначену мікроцентрифужну пробірку (MCT) у відповідні положення в кожному позначеному адаптері ротора, як показано в таблиці 4 і на рис. 19 (стор. 45).



Переконайтеся, що кришки центрифужної колонки (PRC) і мікроцентрифужної пробірки (MCT) вставлено до самого дна слотів на краю адаптера ротора, інакше вони можуть розбитися під час центрифугування.

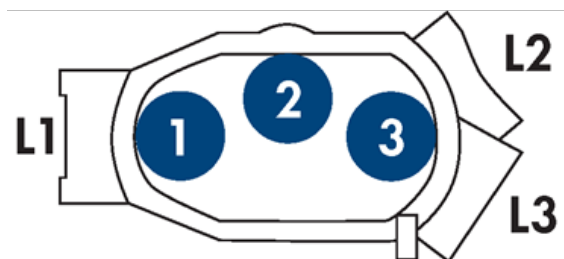


**Рис. 18. Завантаження центрифужної колонки PAXgene Shredder (PSC).** Центрифужну колонку PAXgene Shredder (PSC) завантажено в центральне положення адаптера ротора. Зріжте кришку перед завантаженням центрифужної колонки (PSC).

**Таблиця 4. Лабораторний посуд в адаптері ротора**

| Положення | Реагент   | Положення кришки |
|-----------|---|------------------|
| 1         | Центрифужна колонка для виділення РНК PAXgene (червона, PRC)  | L1               |
| 2         | Центрифужна колонка PAXgene Shredder (бузкового кольору, PSC)<br>(зріжте кришку перед установленням в адаптер ротора) | —                |
| 3         | Мікроцентрифужна пробірка (МСТ)*  | L3               |

\* Використовуйте мікроцентрифужні пробірки (1,5 мл), які входять до комплекту для виділення РНК з крові PAXgene.



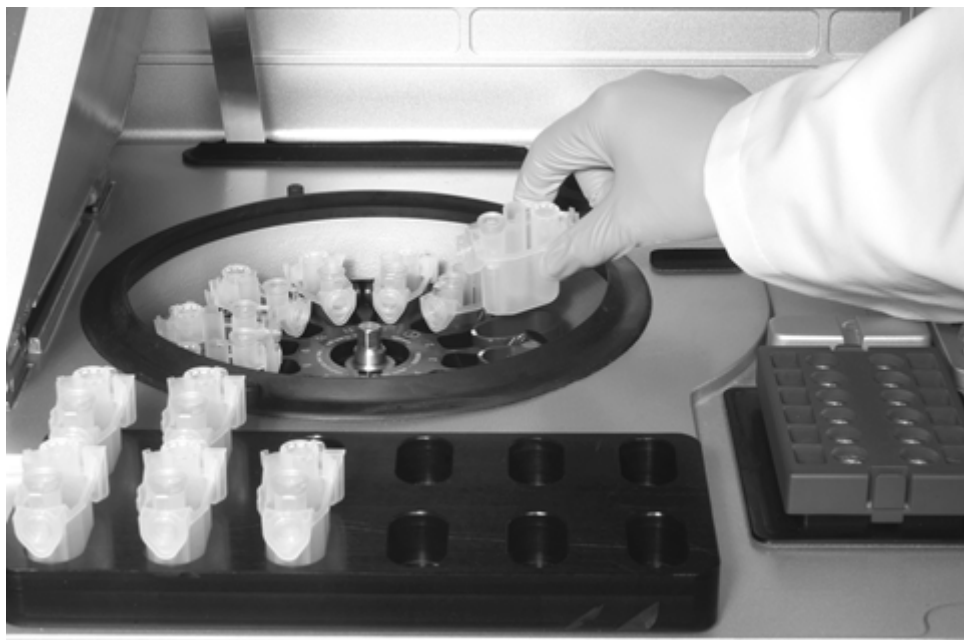
**Рис. 19. Положення в адаптері ротора.** Адаптер ротора має три положення пробірки (1–3) і три положення кришки (L1–L3).

### Завантаження центрифуги

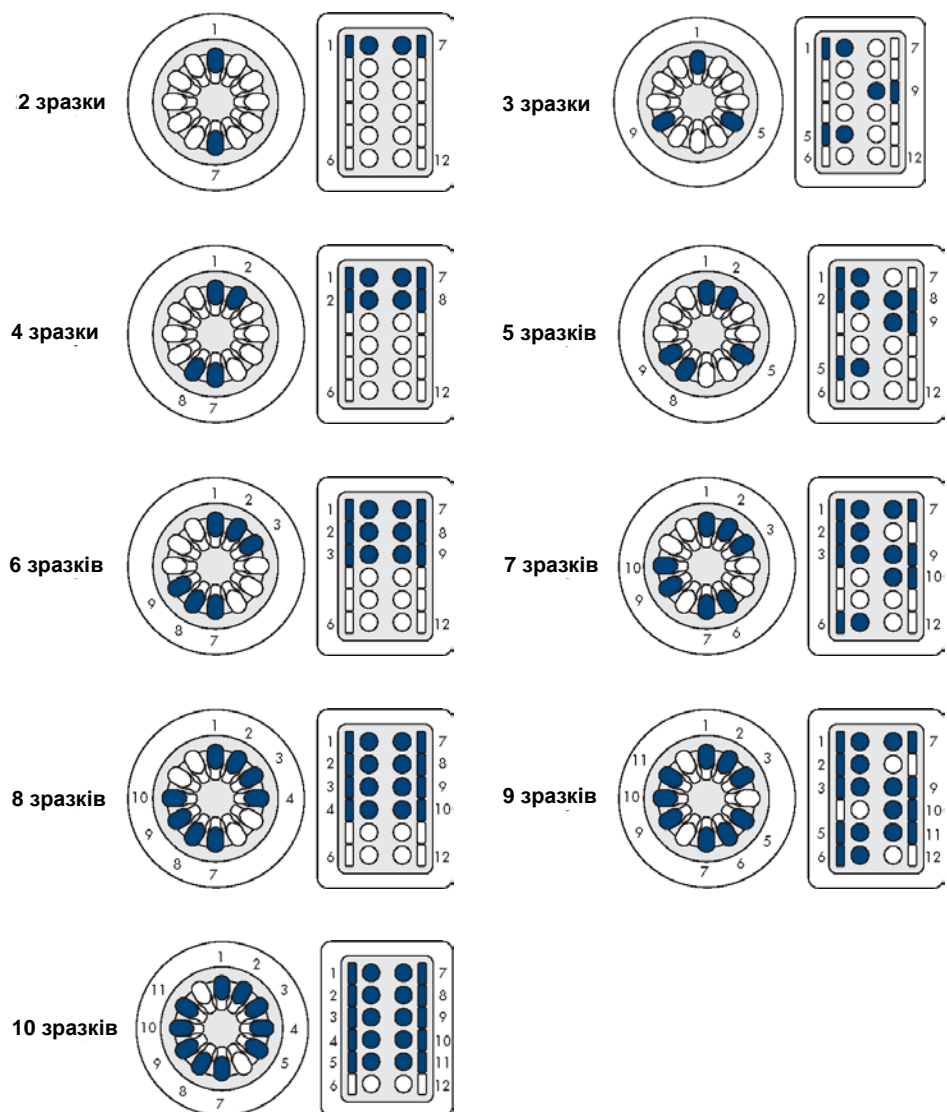
Завантажте зібрані адаптери ротора в стакани центрифуги, як показано нижче на рис. 20.



Якщо обробляється менше 12 зразків, прослідкуйте, щоб ротор центрифуги було рівномірно завантажено в радіальному напрямку (див. рис. 21, стор. 47). Усі стакани центрифуги необхідно встановити до моменту запуску протоколу, навіть якщо потрібно обробити менше 12 зразків. Неможливо обробити один або 11 зразків.



**Рис. 20. Завантаження центрифуги.** Завантажте зібрані адаптери ротора в стакани центрифуги.



**Рис. 21. Завантаження центрифуги та шейкера.** Положення центрифуги та шейкера зображені для обробки від двох (2) до десяти (10) зразків. Неможливо обробити один або 11 зразків.

## Пробірки для обробки (РТ)

Вийміть усі пробірки для обробки (РТ), які залишились у слотах для мікроцентрифужних пробірок із попереднього циклу обробки (див. рис. 17, стор. 42). Заповніть 3 пробірки для обробки (РТ) кількістю реагентів, указаною в таблиці 5, відповідно до кількості зразків у циклі.

Для отримання суміші ДНКази I для інкубування піпеткою перенесіть об'єм буферного розчину для розщеплення ДНК (RDD) у пробірку для обробки й додайте вказаний об'єм основного розчину ДНКази I. Обережно перемішайте всю суміш у піпетці, тричі набираючи і випускаючи її за допомогою наконечника піпетки об'ємом 1000 мкл.

Використовуйте пробірки для обробки об'ємом 2 мл (РТ), які входять до комплекту для виділення РНК з крові PAXgene. Чітко позначте пробірки (РТ), зазначивши назви реагентів, і встановіть їх у відповідному положенні в слоти для мікроцентрифужних пробірок, як указано в таблиці 6 (стор. 49).



ДНКаза I (RNFD) особливо чутлива до фізичної денатурації. Виконуйте змішування лише за допомогою піпетки, використовуючи наконечники з фільтром із великим отвором, щоб зменшити рівень фрагментування. Не перемішуйте вихровим способом.



Переконайтеся, що за допомогою піпетки переноситься потрібний об'єм, зазначений у таблиці 5.



**Таблиця 5. Об'єм реагентів, який необхідно перенести у пробірки для обробки, установлені в слоти для мікроцентрифужних пробірок**

| Кількість зразків | Об'єм реагенту для вказаної кількості зразків (мкл) |  |                                 |
|-------------------|---|--|---------------------------------|
|                   | Протеїназа К (РК)                                   | Суміш ДНКази І для інкубування                 | Елюентний буферний розчин (BR5) |
| 2                 | 126   | 187 (23 ДНКази І + 164 буферного розчину RDD)  | 313                             |
| 3                 | 170   | 261 (33 ДНКази І + 228 буферного розчину RDD)  | 399                             |
| 4                 | 213   | 334 (42 ДНКази І + 292 буферного розчину RDD)  | 486                             |
| 5                 | 256   | 407 (51 ДНКази І + 356 буферного розчину RDD)  | 572                             |
| 6                 | 299   | 481 (60 ДНКази І + 421 буферного розчину RDD)  | 658                             |
| 7                 | 342   | 554 (69 ДНКази І + 485 буферного розчину RDD)  | 745                             |
| 8                 | 386   | 627 (78 ДНКази І + 549 буферного розчину RDD)  | 831                             |
| 9                 | 429   | 701 (88 ДНКази І + 613 буферного розчину RDD)  | 918                             |
| 10                | 472   | 775 (97 ДНКази І + 678 буферного розчину RDD)  | 1004                            |
| 12                | 558   | 921 (115 ДНКази І + 806 буферного розчину RDD) | 1177                            |

**Таблиця 6. Слоти для мікроцентрифужних пробірок**

| Положення |                            |                                |                                 |
|-----------|----------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
|           | А                          | В                              | С                               |
| Вміст     | Протеїназа К (РК)          | Суміш ДНКази І для інкубування | Елюентний буферний розчин (BR5) |
| Посудина  | Пробірка для обробки (РТ)* | Пробірка для обробки (РТ)*     | Пробірка для обробки (РТ)*      |

\* Використовуйте пробірки для обробки об'ємом 2 мл (РТ), які входять до комплекту для виділення РНК з крові PAXgene.

# Протокол: Ручне виділення сумарної РНК із цільної крові людини, зібраної у пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT)

Важливі моменти, на які потрібно звернути увагу перед початком роботи

- Переконайтеся, що коробка з комплектом не має пошкоджень, а буферні розчини не витекли. Якщо комплект пошкоджено, його не можна використовувати.
- Під час використання піпетки переконайтеся, що для неї встановлено правильний об'єм, а рідина відсмоктується та дозується обережно й повністю.
- Щоб уникнути перенесення зразків не в ту пробірку або центрифужну колонку, обов'язково позначте відповідним чином усі пробірки та центрифужні колонки перманентним маркером. Позначте кришку та корпус кожної пробірки (PT, MCT). Для центрифужних колонок нанесіть позначення на корпусі її пробірки для обробки (PT). Закривайте кожну пробірку або центрифужну колонку після перенесення в неї рідини.
- Проливання зразків або буферних розчинів під час процедури може призвести до зменшення виходу та ступеня чистоти РНК.
- Якщо не вказано інше, усі етапи цього протоколу, зокрема центрифугування, необхідно проводити за кімнатної температури (15–25 °C).

Через чутливість технологій ампліфікації нуклеїнових кислот під час роботи зі зразками необхідно вживати наведених нижче запобіжних заходів, щоб уникнути перехресного забруднення:

- Обережно переносить зразок за допомогою піпетки в центрифужну колонку (PRC, PSC), не намочивши обідок колонки.

- Завжди змінюйте наконечники піпеток між етапами перенесення рідини. Використовуйте наконечники піпеток з аерозольним фільтром.
- Не торкайтесь наконечником піпетки до мембрани центрифужної колонки (PRC, PSC).
- Після змішування вихровим способом або нагрівання мікроцентрифужної пробірки (MCT) центрифугуйте її вміст протягом короткого часу, щоб видалити краплі із внутрішньої поверхні кришки.
- Не знімайте рукавички протягом усієї процедури. Якщо зразок потрапить на рукавички, негайно змініть рукавички.
- Перш ніж помістити центрифужну колонку (PRC, PSC) у мікроцентрифугу, закрийте її. Виконайте центрифугування, як описано у процедурі.
- Одночасно відкривайте лише одну центрифужну колонку (PRC, PSC) і слідкуйте, щоб не утворювався аерозоль.
- Для забезпечення ефективної паралельної обробки кількох зразків вставте у штатив пробірки для обробки (PT), у які після центрифугування можна перенести центрифужні колонки (PRC, PSC). Утилізуйте використані пробірки для обробки (PT), які містять фільтрат, і вставте нові з центрифужними колонками (PRC, PSC) безпосередньо в мікроцентрифугу.

#### Дії, які потрібно виконати перед початком роботи

- Кров необхідно зібрати в пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT), дотримуючись інструкцій, наведених у *Довіднику з використання пробірок для виділення РНК з крові PAXgene*. За потреби див. рекомендації щодо поводження з пробірками для виділення РНК з крові PAXgene (BRT), наведені в додатку С (стор. 75).
- Необхідно, щоб пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT) було інкубовано після забору крові протягом принаймні 2 годин за кімнатної температури, щоб забезпечити повний лізис клітин крові. Інкубування пробірок для виділення РНК з крові PAXgene (BRT) протягом ночі сприяє збільшенню виходу.

Якщо після забору крові пробірка для виділення РНК з крові PAXgene (BRT) зберігалася за температури 2–8 °С, –20 °С або –70 °С, спочатку дайте їй нагрітися до кімнатної температури, а потім витримайте за кімнатної температури протягом 2 годин перед початком процедури.

- Прочитайте правила техніки безпеки, наведені на стор. 9.
- Ознайомтеся з настановами щодо поводження з РНК (додаток А, стор. 72).
- Забезпечте регулярне проведення перевірок і калібрування відповідно до рекомендацій виробника таких приладів, як піпетки й шейкери-інкубатори.
- Шейкер-інкубатор потрібен під час виконання кроків 5 і 20. Установіть для шейкера-інкубатора температуру 55 °С.
- У результаті тривалого зберігання в буферному розчині (BR2) для зв'язування може утворюватись осад. За потреби підігрійте розчин до температури 37 °С, щоб осад розчинився.
- Промивний буферний розчин 2 (BR4) постачається у вигляді концентрату. Перед першим використанням додайте 4 частини за об'ємом етанолу (96–100 %, ступінь чистоти: чистий для аналізу), як зазначено на флаконі, щоб отримати робочий розчин.
- Якщо набір ДНКази без вмісту РНКаз використовується вперше, підготуйте базовий розчин ДНКази І. Розчиніть ДНКазу І у твердій формі (RNFD; 1500 одиниць Кунітца)\* у 550 мкл буферного розчину для ресуспендування ДНКази (DRB), який входить до комплекту постачання набору. Не допускайте втрати ДНКази І (RNFD) під час відкривання флакона. Не перемішуйте відновлену ДНКазу І (RNFD) вихровим способом. ДНКаза І особливо чутлива до фізичної денатурації. Для змішування достатньо обережно перевернути пробірку.

\* Одиниці Кунітца – це найбільш широко вживані одиниці вимірювання активності ДНКази І, що визначаються як кількість ДНКази І, яка збільшує поглинання на довжині хвилі  $A_{260}$  на 0,001 за хвилину в розрахунку на мілілітр за температури 25 °С, рН 5,0, коли субстратом є високополімеризована ДНК (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 and 363).

- Наявні дані свідчать, що відновлена ДНКаза I (RNFD) може зберігатися за температури 2–8 °C до 6 тижнів. Для тривалого зберігання ДНКази I (RNFD) злийте базовий розчин зі скляного флакона, розділіть його на аліквоти для одноразового використання (використовуйте мікроцентрифужні пробірки [МСТ] об'ємом 1,5 мл, які входять до комплекту постачання набору; достатньо 5 аліквот) і зберігайте за температури –20 °C щонайбільше 9 місяців. Розморожені аліквоти можуть зберігатися за температури 2–8 °C щонайбільше 6 тижнів. Після розморожування не заморожуйте аліквоти повторно.
- Під час відновлення й аліквотування ДНКази I (RNFD) дотримуйтесь настанов щодо поводження з РНК (додаток А, стор. 72).

## Процедура

1. Центрифугуйте пробірку для виділення РНК (BRT) з крові PAXgene протягом 10 хвилин при 3000–5000 x *g*, використовуючи ротор із вільно підвішеними стаканами.



Необхідно, щоб зразок крові було інкубовано в пробірці для виділення РНК з крові PAXgene (BRT) протягом принаймні 2 годин за кімнатної температури (15–25 °C), щоб забезпечити повний лізис клітин крові.



У роторі мають бути тримачі для пробірок із круглим дном. Якщо використовуються інші типи тримача для пробірок, пробірки можуть розбитися під час центрифугування.

2. Видаліть супернатант шляхом зливання або піпетування. Додайте до осаду в пробірці 4 мл води без вмісту РНКаз (RNFW) і закрийте пробірку за допомогою нової додаткової кришки BD Nemetogard (входить до комплекту постачання набору).

Якщо супернатант зливається, не чіпайте осад і протріть обідок пробірки чистим паперовим рушником.

3. Перемішуйте вміст пробірки вихровим способом, доки не буде помітно, що осад розчинився, і центрифугуйте протягом 10 хвилин при 3000–5000 x *g*, використовуючи ротор із вільно підвішеними стаканами. Видаліть і утилізуйте весь супернатант.

Дрібні частинки, які залишилися в супернатанті після вихрового перемішування, але перед центрифугуванням, не впливають на процедуру.



Неповне видалення супернатанту призводить до інгібування лізису й розбавлення лізату, а отже впливає на умови зв'язування РНК із мембраною PAXgene.

4. Додайте 350 мкл буферного розчину для ресуспендування (BR1) і перемішуйте вихровим способом, доки не буде помітно, що осад розчинився.

5. За допомогою піпетки перенесіть зразок у мікроцентрифужну пробірку об'ємом 1,5 мл (МСТ). Додайте 300 мкл буферного розчину для зв'язування (BR2) і 40 мкл протеїнази К (РК). Перемішайте вихровим способом протягом 5 секунд і інкубуйте за допомогою шейкера-інкубатора протягом 10 хвилин за температури 55 °С зі швидкістю 400–1400 об./хв. Після інкубування встановіть для шейкера-інкубатора температуру 65 °С (для кроку 20).



Не змішуйте буферний розчин для зв'язування (BR2) і протеїназу К (РК) перед додаванням їх до зразка.

6. За допомогою піпетки перенесіть лізат безпосередньо в центрифужну колонку PAXgene Shredder (PSC; бузкового кольору), вставлену у пробірку для обробки (PT) об'ємом 2 мл, і центрифугуйте протягом 3 хвилин із максимальною швидкістю (але не більше 20 000 x g).



За допомогою піпетки обережно перенесіть лізат у центрифужну колонку (PSC) і візуально переконайтеся, що в центрифужну колонку (PSC) перенесено весь лізат.

Щоб уникнути пошкодження колонок (PSC) і пробірок (PT), не можна перевищувати відцентрову силу 20 000 x g.



Деякі зразки можуть протікати крізь центрифужні колонки PAXgene Shredder (PSC) без центрифугування. Це пояснюється низькою в'язкістю деяких зразків і не вважається ознакою дефекту продукту.

7. Обережно перенесіть увесь супернатант проточної фракції в чисту мікроцентрифужну пробірку (МСТ) об'ємом 1,5 мл, не чіпаючи осад у пробірці.
8. Додайте 350 мкл етанолу (96–100 %, ступінь чистоти: чистий для аналізу). Перемішайте вихровим способом і центрифугуйте протягом короткого часу (1–2 секунди при 500–1000 x g), щоб видалити краплі із внутрішньої поверхні кришки пробірки.



Не можна допускати перевищення тривалості центрифугування 1–2 секунди, оскільки це може призвести до осідання нуклеїнових кислот і зменшення виходу сумарної РНК.

9. За допомогою піпетки перенесіть 700 мкл у центрифужну колонку для виділення РНК PAXgene (PRC; червона), вставлену в пробірку для обробки (PT) об'ємом 2 мл, і центрифугуйте протягом 1 хвилини при 8000–20 000 x g. Вставте центрифужну колонку (PRC) у нову пробірку для обробки (PT) об'ємом 2 мл і утилізуйте стару пробірку (PT) із проточною фракцією.
10. За допомогою піпетки перенесіть залишок зразка в центрифужну колонку для виділення РНК PAXgene (PRC) і центрифугуйте протягом 1 хвилини при 8000–20 000 x g. Вставте центрифужну колонку (PRC) у нову пробірку для обробки (PT) об'ємом 2 мл і утилізуйте стару пробірку (PT) із проточною фракцією.



За допомогою піпетки обережно перенесіть зразок у центрифужну колонку (PRC) і візуально переконайтеся, що в центрифужну колонку (PRC) перенесено весь зразок.

11. За допомогою піпетки додайте 350 мкл промивного розчину 1 (BR3) у центрифужну колонку для виділення РНК (PRC). Центрифугуйте протягом 1 хвилини при 8000–20 000 x g. Вставте центрифужну колонку (PRC) у нову пробірку для обробки (PT) об'ємом 2 мл і утилізуйте стару пробірку (PT) із проточною фракцією.
12. Додайте 10 мкл базового розчину ДНКазі I (RNFD) до 70 мкл буферного розчину для розщеплення ДНК (RDD) у мікроцентрифужній пробірці об'ємом 1,5 мл (MCT). Обережно перемішайте вміст пробірки та центрифугуйте її протягом короткого часу, щоб зібрати залишки рідини зі стінок пробірки.

Якщо обробляється, наприклад, 10 зразків, додайте 100 мкл базового розчину ДНКазі I (RNFD) до 700 мкл буферного розчину для розщеплення ДНК (RDD). Використовуйте мікроцентрифужні пробірки (MCT) об'ємом 1,5 мл, які постачаються в комплекті.



ДНКазі I особливо чутлива до фізичної денатурації. Для змішування потрібно лише обережно постукувати по пробірці. Не перемішуйте вихровим способом.



13. За допомогою піпетки перенесіть суміш ДНКази I (RNFD) для інкубування (80 мкл) безпосередньо на мембрану центрифужної колонки для виділення РНК PAXgene (PRC) і помістіть на стіл (20–30 °C) на 15 хвилин.



Переконайтеся, що суміш ДНКази I (RNFD) для інкубування нанесено безпосередньо на мембрану. Розщеплення ДНКази буде неповним, якщо частина суміші залишиться на стінках або ущільненні центрифужної колонки (PRC).

14. За допомогою піпетки перенесіть 350 мкл промивного буферного розчину 1 (BR3) у центрифужну колонку для виділення РНК PAXgene (PRC) і центрифугуйте протягом 1 хвилини при 8000–20 000 x g. Вставте центрифужну колонку (PRC) у нову пробірку для обробки (PT) об'ємом 2 мл і утилізуйте стару пробірку (PT) із проточною фракцією.

15. За допомогою піпетки перенесіть 500 мкл промивного буферного розчину 2 (BR4) у центрифужну колонку для виділення РНК PAXgene (PRC) і центрифугуйте протягом 1 хвилини при 8000–20 000 x g. Вставте центрифужну колонку (PRC) у нову пробірку для обробки (PT) об'ємом 2 мл і утилізуйте стару пробірку (PT) із проточною фракцією.



Промивний буферний розчин 2 (BR4) постачається у вигляді концентрату. Переконайтеся, що етанол додано до промивного розчину 2 (BR4) перед використанням (див. розділ «Дії, які потрібно виконати перед початком роботи», стор. 51).

16. Додайте 500 мкл промивного розчину 2 (BR4) у центрифужну колонку для виділення РНК (PRC). Центрифугуйте протягом 3 хв при 8000–20 000 x g.
17. Утилізуйте пробірку для обробки (PT) із проточною фракцією та вставте центрифужну колонку для виділення РНК PAXgene (PRC) у нову пробірку для обробки (PT) об'ємом 2 мл. Центрифугуйте протягом 1 хв при 8000–20 000 x g.

18. Утилізуйте пробірку для обробки (PT) із проточною фракцією. Вставте центрифужну колонку для виділення РНК PAXgene (PRC) у мікроцентрифужну колонку (МСТ) об'ємом 1,5 мл і за допомогою піпетки нанесіть 40 мкл елюентного буферного розчину (BR5) безпосередньо на мембрану центрифужної колонки для виділення РНК PAXgene (PRC). Центрифугуйте протягом 1 хв при 8000–20 000 x g для елювання РНК.

Для досягнення максимальної ефективності елювання необхідно змочити всю мембрану елюентним буферним розчином (BR5).

19. Повторіть етап елювання (етап 18), як описано вище, використовуючи 40 мкл елюентного буферного розчину (BR5) і ту ж саму мікроцентрифужну пробірку (МСТ).

20. Протягом 5 хвилин інкубуйте елюат за температури 65 °C у шейкері-інкубаторі (з етапу 5), уникаючи струшування. Після інкубування негайно покладіть елюат на лід для охолодження.

Таке інкубування за температури 65 °C денатурує РНК для застосування на подальших етапах. Не перевищуйте час і температуру інкубування.

21. Якщо зразки РНК не використовуються відразу, зберігайте їх за температури –20 °C або –70 °C.

Оскільки РНК залишається денатурованою після повторного заморожування й розморожування, повторювати інкубування за температури 65 °C не потрібно. Якщо зразки РНК використовуються для проведення діагностичного аналізу, дотримуйтеся інструкцій, наданих виробником.

Для забезпечення точності кількісного визначення РНК шляхом поглинання при довжині хвилі 260 нм рекомендовано розводити зразки за допомогою 10 мМ трис-НCl, рН 7,5.\* Розведення зразка у воді без вмісту РНКаз може призвести до неточних занижених значень.

\* Під час роботи з хімічними речовинами необхідно носити лабораторний халат, одноразові рукавички та захисні окуляри. Для отримання детальнішої інформації див. відповідні паспорти безпеки матеріалів, які можна отримати у постачальника продукту.

Скиньте до нуля показання спектрофотометр, використовуючи розчин, який складається з такої ж пропорції елюентного буферного розчину (BR5) та трис-НСІ, як і у зразках, для яких потрібно виконати вимірювання. Елюентний буферний розчин (BR5) має високе поглинання при довжині хвилі 220 нм, що може призвести до високих рівнів фонового поглинання, якщо показання спектрофотометра скинуто до нуля неналежним чином.

**Примітка.** Для кількісного визначення в буферному розчині трис-НСІ використовуйте співвідношення

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ мкг/мл.}$  Див. додаток В, стор. 73.

# Протокол: Автоматизоване виділення сумарної РНК із цільної крові людини, зібраної у пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT)

Важливі моменти, на які потрібно звернути увагу перед початком роботи

- Переконайтеся, що коробка з комплектом не має пошкоджень, а буферні розчини не витекли. Якщо комплект пошкоджено, його не можна використовувати.
- Під час використання піпетки переконайтеся, що для неї встановлено правильний об'єм, а рідина відсмоктується та дозується обережно й повністю.
- Щоб уникнути перенесення зразків не в ті пробірки чи пластикові посудини, переконайтеся, обов'язково позначте відповідним чином усі пробірки для обробки (РТ), мікроцентрифужні пробірки (МСТ) й адаптери ротора перманентним маркером. Позначте кришку й корпус кожної мікроцентрифужної пробірки (МСТ), корпус кожної пробірки для обробки (РТ) і зовнішню стінку кожного адаптера ротора.
- Проливання зразків або буферних розчинів під час процедури може призвести до зменшення виходу та ступеня чистоти РНК.
- Якщо не вказано інше, усі етапи цього протоколу, зокрема центрифугування, необхідно проводити за кімнатної температури (15–25 °C).

Через чутливість технологій ампліфікації нуклеїнових кислот під час роботи зі зразками необхідно вживати наведених нижче запобіжних заходів, щоб уникнути перехресного забруднення:

- Обережно переносить зразок за допомогою піпетки на дно пробірки для обробки (РТ), не намочивши її обідок.

- Завжди змінюйте наконечники піпеток між етапами перенесення рідини. Використовуйте наконечники піпеток з аерозольним фільтром.
- Не торкайтесь наконечником піпетки до мембрани центрифужної колонки (PRC, PSC).
- Після змішування вихровим способом або нагрівання мікроцентрифужної пробірки (MCT) центрифугуйте її вміст протягом короткого часу, щоб видалити краплі із внутрішньої поверхні кришки.
- Не знімайте рукавички протягом усієї процедури. Якщо зразок потрапить на рукавички, негайно змініть рукавички.

#### Дії, які потрібно виконати перед початком роботи

- Кров необхідно зібрати в пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT), дотримуючись інструкцій, наведених у *Довіднику з використання пробірок для виділення РНК з крові PAXgene*. За потреби див. рекомендації щодо поводження з пробірками для виділення РНК з крові PAXgene (BRT), наведені в додатку С (стор. 75).
- Необхідно, щоб пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT) було інкубовано після забору крові протягом принаймні 2 годин за кімнатної температури, щоб забезпечити повний лізис клітин крові. Інкубування пробірок для виділення РНК з крові PAXgene (BRT) протягом ночі сприяє збільшенню виходу. Якщо після забору крові пробірка для виділення РНК з крові PAXgene (BRT) зберігалася за температури 2–8 °C, –20 °C або –70 °C, спочатку дайте їй нагрітися до кімнатної температури, а потім витримайте за кімнатної температури протягом 2 годин перед початком процедури.
- Прочитайте правила техніки безпеки, наведені на стор. 9.
- Прочитайте розділ «Важливі примітки» на стор. 38.
- Ознайомтеся з настановами щодо поводження з РНК (додаток А, стор. 72).
- Ознайомтеся із *Посібником користувача QIAcube* і всією додатковою супровідною інформацією щодо QIAcube, звертаючи особливу увагу на правила техніки безпеки.

- Забезпечте регулярне проведення перевірок і калібрування відповідно до рекомендацій виробника таких приладів, як піпетки й QIAcube.
- У результаті тривалого зберігання в буферному розчині (BR2) для зв'язування може утворюватись осад. За потреби підігрійте розчин до температури 37 °C, щоб осад розчинився.
- Промивний буферний розчин 2 (BR4) постачається у вигляді концентрату. Перед першим використанням додайте 4 частини за об'ємом етанолу (96–100 %, ступінь чистоти: чистий для аналізу), як зазначено на флаконі, щоб отримати робочий розчин.
- Якщо набір ДНКаз без вмісту РНКаз використовується вперше, підготуйте базовий розчин ДНКаз I. Розчиніть ДНКазу I у твердій формі (RNFD; 1500 одиниць Кунітца)\* у 550 мкл буферного розчину для ресуспендування ДНКаз (DRB), який входить до комплекту постачання набору. Не допускайте втрати ДНКаз I (RNFD) під час відкривання флакона. Не перемішуйте відновлену ДНКазу I (RNFD) вихровим способом. ДНКаз I особливо чутлива до фізичної денатурації. Для змішування достатньо обережно перевернути пробірку.
- Наявні дані свідчать, що відновлена ДНКаз I (RNFD) може зберігатися за температури 2–8 °C до 6 тижнів. Для тривалого зберігання ДНКаз I (RNFD) злийте базовий розчин зі скляного флакона, розділіть його на аліквоти для одноразового використання (використовуйте мікроцентрифужні пробірки [MCT] об'ємом 1,5 мл, які входять до комплекту постачання набору; достатньо 5 аліквот) і зберігайте за температури –20 °C щонайбільше 9 місяців. Розморожені аліквоти можуть зберігатися за температури 2–8 °C щонайбільше 6 тижнів. Після розморожування не заморожуйте аліквоти повторно.
- Під час відновлення й аліквотування ДНКаз I (RNFD) дотримуйтесь настанов щодо поводження з РНК (додаток А, стор. 72).

\* Одиниці Кунітца – це найбільш широко вживані одиниці вимірювання активності ДНКаз I, що визначаються як кількість ДНКаз I, яка збільшує поглинання на довжині хвилі  $A_{260}$  на 0,001 за хвилину в розрахунку на мілілітр за температури 25 °C, рН 5,0, коли субстратом є високополімеризована ДНК (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 and 363).

- Установіть правильний адаптер шейкера (надається разом із QIAcube; використовуйте адаптер для пробірок із замком об'ємом 2 мл із позначкою «2») і помістіть штатив шейкера на верхню частину адаптера.
- Перевірте ящик для відходів, за потреби спорожніть.
- Установіть протоколи, якщо їх ще не встановлено для попередніх циклів. Установіть протоколи «Виділення РНК крові RAXgene. Частина А» і «Виділення РНК крові RAXgene. Частина В». Див. розділ «Установлення протоколів на приладі QIAcube», стор. 38.

## Процедура

1. Зачиніть дверцята приладу QIAcube і ввімкніть QIAcube, натиснувши вимикач живлення (див. рис. 15, стор. 39).

Пролунає звуковий сигнал, і з'явиться екран запуску. Прилад автоматично виконає ініціалізацію.

2. Відчиніть дверцята приладу QIAcube, за потреби завантажте необхідні реагенти та встановіть у QIAcube пластиковий посуд. Див. розділ «Завантаження приладу QIAcube», стор. 40.

Для заощадження часу завантаження можна виконувати під час одного або обох 10-хвилинних етапів центрифугування (етапи 3 та 5).

3. Центрифугуйте пробірку для виділення РНК (BRT) з крові PAXgene протягом 10 хвилин при 3000–5000 x g, використовуючи ротор із вільно підвішеними стаканами.



Необхідно, щоб зразок крові було інкубовано в пробірці для виділення РНК з крові PAXgene (BRT) протягом принаймні 2 годин за кімнатної температури (15–25 °C), щоб забезпечити повний лізис клітин крові.



У роторі мають бути тримачі для пробірок із круглим дном. Якщо використовуються інші типи тримача для пробірок, пробірки можуть розбитися під час центрифугування.

4. Видаліть супернатант шляхом зливання або піпетування. Додайте до осаду в пробірці 4 мл води без вмісту РНКаз (RNFw) і закрийте пробірку за допомогою нової додаткової кришки BD Nemetgard (входить до комплекту постачання набору). Якщо супернатант зливається, не чіпайте осад і протріть обідок пробірки чистим паперовим рушником.
5. Перемішуйте вміст пробірки вихровим способом, доки не буде помітно, що осад розчинився, і центрифугуйте протягом 10 хвилин при 3000–5000 x g, використовуючи ротор із вільно підвішеними стаканами. Видаліть і утилізуйте весь супернатант.



Дрібні частинки, які залишилися в супернатанті після вихрового перемішування, але перед центрифугуванням, не впливають на процедуру.



Неповне видалення супернатанту призводить до інгібування лізису й розбавлення лізату, а отже впливає на умови зв'язування РНК із мембраною PAXgene.

6. Додайте 350 мкл буферного розчину для ресуспендування (BR1) і перемішуйте вихровим способом, доки не буде помітно, що осад розчинився.

7. За допомогою піпетки перенесіть зразок у пробірку для обробки об'ємом 2 мл (PT).



Використовуйте пробірки для обробки об'ємом 2 мл (PT), які входять до комплекту для виділення РНК з крові PAXgene.

8. Завантажте відкриті пробірки для обробки (PT) зі зразком у шейкер QIAcube (див. рис. 17, стор. 42). Для зручності завантаження положення зразків пронумеровано. Вставте штекери штатива шейкера (разом із QIAcube) у слоти на краю штатива шейкера поряд із кожною пробіркою для обробки. Це дає змогу розрізняти зразки під час перевірки завантаження.



Обов'язково встановіть правильний адаптер шейкера (адаптер шейкера, пробірки із замком об'ємом 2 мл із позначкою «2», надані разом із QIAcube).



Якщо обробляється менше 12 зразків, прослідкуйте, щоб штатив шейкера було встановлено, як показано на рис. 21, стор. 47. Неможливо обробити один або 11 зразків.

9. Зачиніть дверцята приладу QIAcube (див. рис. 15, стор. 39).

10. Виберіть і запустіть протокол «Виділення РНК крові PAXgene. Частина А».

Дотримуйтесь інструкцій, відображених на сенсорному екрані приладу QIAcube.



Необхідно, щоб на приладі QIAcube було встановлено обидві частини програми (А і В) (див. розділ «Установлення протоколів на приладі QIAcube», стор. 38).



Прилад QIAcube виконає перевірку завантаження зразків, наконечників, адаптерів ротора та флаконів для реагентів.

11. Після виконання протоколу «Виділення РНК крові PAXgene. Частина А» відчиніть дверцята приладу QIAcube (див. рис. 15, стор. 39). Вийміть та утилізуйте центрифужні колонки для виділення РНК PAXgene (PRC) з адаптерів ротора й порожні пробірки для обробки (PT) із шейкера.



Під час обробки прилад переносить центрифужні колонки з положення 1 адаптера ротора (положення кришки L1) в положення 3 адаптера ротора (положення кришки L2) (див. рис. 19, стор. 45).

12. Закрийте кришки всіх мікроцентрифужних пробірок (МСТ) об'ємом 1,5 мл, які містять виділену РНК і знаходяться в адаптерах ротора (положення 3, положення кришки L3, див. рис. 19, стор. 45). Перенесіть мікроцентрифужні пробірки (МСТ) об'ємом 1,5 мл в адаптер шейкера QIAcube (див. рис. 17, стор. 42).

13. Зачиніть дверцята приладу QIAcube (див. рис. 15, стор. 39).

14. Виберіть і запустіть протокол «Виділення РНК крові PAXgene. Частина В».

Дотримуйтесь інструкцій, відображених на сенсорному екрані приладу QIAcube.



Цей протокол здійснює інкубування зразків за температури 65 °C і денатурує РНК для застосування на подальших етапах. Навіть якщо подальше застосування передбачає етап термічної денатурації, не пропускайте цей етап. Достатня денатурація РНК необхідна для досягнення максимальної ефективності під час застосування на подальших етапах.

15. Після виконання програми «Виділення РНК крові PAXgene. Частина В» відчиніть дверцята приладу QIAcube (див. рис. 15, стор. 39). Негайно покладіть на лід мікроцентрифужні пробірки (МСТ) із виділеною РНК.



**ПОПЕРЕДЖЕННЯ.** Гаряча поверхня. Температура шейкера може досягати 70 °C. Не торкайтеся шейкера, коли він гарячий.



Слідкуйте, щоб виділена РНК не залишилась у приладі QIAcube. Оскільки зразки не охолоджуються, виділена РНК може розкластися. Тому не рекомендовано виконувати цикли приготування зразків протягом ночі без нагляду оператора.

16. Якщо зразки РНК не використовуються відразу, зберігайте їх за температури  $-20^{\circ}\text{C}$  або  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Оскільки РНК залишається денатурованою після повторного заморожування й розморожування, повторювати протокол термічного інкубування не потрібно («Виділення РНК крові PAXgene. Частина В»). Якщо зразки РНК використовуються для діагностичного аналізу, дотримуйтеся інструкцій, наданих виробником.

Для забезпечення точності кількісного визначення РНК шляхом поглинання при довжині хвилі 260 нм рекомендовано розводити зразки в 10 мМ трис-НСІ, рН 7,5.\* Розведення зразка у воді без вмісту РНКаз може призвести до неточних занижених значень.

Скиньте до нуля показання спектрофотометр, використовуючи розчин, який складається з такої ж пропорції елюентного буферного розчину (BR5) та трис-НСІ, як і у зразках, для яких потрібно виконати вимірювання. Елюентний буферний розчин (BR5) має високе поглинання при довжині хвилі 220 нм, що може призвести до високих рівнів фонового поглинання, якщо показання спектрофотометра скинуто до нуля неналежним чином.



Для кількісного визначення в буферному розчині трис-НСІ використовуйте співвідношення

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ мкг/мл}$ . Див. додаток В, стор. 73.

\* Під час роботи з хімічними речовинами необхідно носити лабораторний халат, одноразові рукавички та захисні окуляри. Для отримання детальнішої інформації див. відповідні паспорти безпеки матеріалів, які можна отримати у постачальника продукту.

17. Зніміть штатив для флаконів для реагентів з робочого столу QIAcube (див. рис. 17, стор. 42) і закрийте всі флакони відповідно позначеними кришками. Буферний розчин у флаконах може зберігатись за кімнатної температури (15–25 °C) щонайдовше 3 місяці. Вийміть і утилізуйте залишки реагентів у пробірках для обробки (PT), вставлені у слоти для мікроцентрифужних пробірок QIAcube (див. рис. 17, стор. 42). Вийміть із центрифуги й утилізуйте адаптери ротора (див. рис. 17, стор. 42). Спорожніть ящик для відходів QIAcube (див. рис. 15, стор. 39). Зачиніть дверцята приладу QIAcube і вимкніть прилад, натиснувши вимикач живлення (див. рис. 15, стор. 39).

# Посібник з усунення несправностей

Цей посібник з усунення несправностей може знадобитись під час вирішення можливих проблем. Для отримання додаткової інформації див. також сторінку з найпоширенішими запитаннями на сайті нашого центру технічної підтримки: **[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx)**. Фахівці служби технічної підтримки QIAGEN завжди охоче дадуть відповіді на будь-які запитання, пов'язані з інформацією та протоколами в цьому довіднику, зразками й технологіями аналізу (контактні дані вказано на останній сторінці або на сайті [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Коментарі та рекомендації

---

### РНК розклалася

Забруднення РНКазою



Слідкуйте, щоб під час процедури чи подальшої роботи в реагенти не потрапили РНКازی (див. додаток А, стор. 72).

### Низький вихід РНК

а) У пробірку для виділення РНК з крові PAXgene (BRT) зібрано менше 2,5 мл крові



Переконайтеся, що в пробірку для виділення РНК з крові PAXgene зібрано 2,5 мл крові (BRT; див. *Довідник з використання пробірок для виділення РНК з крові PAXgene*).

б) Концентрацію РНК виміряно у воді



Для забезпечення точного кількісного визначення РНК потрібно розвести в 10 мМ трис-НСІ, рН 7,5\* (див. додаток В, стор. 73).

\* Під час роботи з хімічними речовинами необхідно носити лабораторний халат, одноразові рукавички та захисні окуляри. Для отримання детальнішої інформації див. відповідні паспорти безпеки матеріалів, які можна отримати у постачальника продукту.

## Коментарі та рекомендації

- с) Залишки зруйнованих клітин перенесено до центрифужної колонки для виділення РНК PAXgene (PRC) під час виконання етапів 9 і 10 ручного протоколу
- і Переносячи піпеткою супернатант під час виконання етапу 7 ручного протоколу, уникайте перенесення великих частинок (перенесення дрібних частинок не впливає на процедуру).
- д) Під час виконання етапу 3 супернатант видалено не повністю
- і Переконайтеся, що видалено весь супернатант. Якщо супернатант зливається, паперовим рушником витріть краплі з обідка пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT). Вживайте відповідних запобіжних заходів, щоб уникнути перехресного забруднення.
- е) Після забору крові в пробірку для виділення РНК з крові PAXgene (BRT) кров інкубується менше 2 годин
- і Інкубуйте кров у пробірці для виділення РНК з крові PAXgene (BRT) протягом щонайменше 2 годин після забору.

Низьке значення  $A_{260}/A_{280}$

- а) Для розведення РНК з метою визначення  $A_{260}/A_{280}$  використовується вода
- і Перш ніж вимірювати чистоту РНК, її потрібно розвести в 10 мМ трис-НСІ, рН 7,5 \* (див. додаток В, стор. 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.

## Коментарі та рекомендації

---

- b) Показання спектрофотометра скинуто до нуля неправильно



Скиньте до нуля показання спектрофотометра, використовуючи розчин, який складається з такої ж пропорції елюентного буферного розчину (BR5) та 10 мМ трис-НСІ, рН 7,5, як і в зразках, для яких потрібно виконати вимірювання. Елюентний буферний розчин (BR5) має високе поглинання при довжині хвилі 220 нм, що може призвести до високих рівнів фонового поглинання, якщо показання спектрофотометра скинуто до нуля неналежним чином.

### Несправність приладу

- Прилад QIAcube не працює належним чином

Ознайомтеся з *Посібником користувача QIAcube*, звертаючи особливу увагу на розділ «Усунення несправностей». Забезпечте належне технічне обслуговування приладу QIAcube, як описано в *Посібнику користувача QIAcube*.

# Додаток А. Загальні зауваження щодо поводження з РНК

## Поводження з РНК



Рибонуклеази (РНКазы) – це дуже стабільні й активні ферменти, які зазвичай не потребують кофакторів для функціонування. Оскільки РНКазы важко інактивувати, і навіть їх незначної кількості достатньо для розщеплення РНК, не використовуйте пластиковий або скляний посуд, не виконавши перед цим очищення від можливого забруднення РНКазами. Необхідна особлива обережність, щоб уникнути ненавмисного введення РНКаз у зразок РНК під час процедури очищення або після неї. Щоб створити й підтримувати середовище, що не містить РНКаз, під час роботи з РНК дотримуйтесь запобіжних заходів протягом попередньої обробки й використання одноразового та багаторазового посуду, а також розчинів.

## Загальні правила поводження



Під час роботи з РНК необхідно завжди використовувати належний мікробіологічний асептичний метод. Руки й частинки пилу, що переносять бактерії та грибки, є найпоширенішими джерелами забруднення РНКазами. Під час роботи з реагентами або зразками РНК обов'язково носіть рукавички з латексу або вінілу, щоб запобігти забрудненню РНКазами з поверхні шкіри або запиленого лабораторного обладнання. Часто міняйте рукавички та слідкуйте за тим, щоб за можливості пробірки були закритими. Зберігайте очищену РНК на льоду, коли аліквоти піпетуються для подальшого застосування.

Протоколи видалення забруднення РНКазами зі скляного посуду та розчинів можна знайти в загальних посібниках з молекулярної біології, зокрема Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.



## Додаток В. Кількісний і якісний аналіз сумарної РНК

### Кількісний аналіз РНК

Концентрація РНК визначається шляхом вимірювання поглинання на довжині хвилі 260 нм ( $A_{260}$ ) у спектрофотометрі. Для забезпечення достовірності покази мають перебувати в лінійному діапазоні спектрофотометра. Поглинання 1 одиниці на довжині хвилі 260 нм відповідає 44 мкг РНК на мл ( $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ мкг/мл}$ ). Це співвідношення дійсне тільки для вимірювань у 10 мМ трис-НСІ, \* рН 7,5. Тому, якщо необхідно розвести зразок РНК, це слід робити в 10 мМ трис-НСІ. Як описується нижче (див. розділ «Чистота РНК», стор. 74), співвідношення між значеннями поглинання на довжинах хвиль 260 і 280 нм дає оцінку чистоти РНК. Під час вимірювання зразків РНК переконайтеся, що кювети не містять РНКаз. Скиньте до нуля показання спектрофотометр, використовуючи розчин, який складається з такої ж пропорції елюентного буферного розчину (BR5) та трис-НСІ, як і у зразках, для яких потрібно виконати вимірювання. Елюентний буферний розчин (BR5) має високе поглинання при довжині хвилі 220 нм, що може призвести до високих рівнів фонового поглинання, якщо показання спектрофотометра скинуто до нуля неналежним чином. Приклад розрахунку, який використовується під час кількісного аналізу РНК, наведено нижче.

\* Під час роботи з хімічними речовинами необхідно носити лабораторний халат, одноразові рукавички та захисні окуляри. Для отримання детальнішої інформації див. відповідні паспорти безпеки матеріалів, які можна отримати у постачальника продукту.

|  |   |   |
|--|---|---|
| Об'єм зразка РНК   | = | 80 мкл  |
| Розведення (1/15)  | = | 10 мкл зразка РНК + 140 мкл 10 мМ трис-НСІ, рН 7,5      |
| Виміряйте поглинання розведеного зразка в кюветі (без вмісту РНКаз). |   |   |
| $A_{260}$  | = | 0,3   |
| Концентрація зразка  | = | $44 \times A_{260} \times \text{коефіцієнт розведення}$ |
|  | = | $44 \times 0,3 \times 15$                               |
|  | = | 198 мкг/мл  |
| Сумарний результат   | = | концентрація $\times$ об'єм зразка в мілілітрах         |
|  | = | $198 \text{ мкг/мл} \times 0,08 \text{ мл}$             |
|  | = | 15,8 мкг РНК  |

## Чистота РНК

Співвідношення показань на довжинах хвиль 260 нм і 280 нм ( $A_{260}/A_{280}$ ) дає оцінку чистоти РНК щодо забруднювачів, які поглинаються УФ-випромінюванням, наприклад білка. Однак на співвідношення  $A_{260}/A_{280}$  значно впливає рівень рН. Зниження рівня рН призводить до зменшення співвідношення  $A_{260}/A_{280}$  та зниження чутливості до забруднення білком.\* Для отримання точних значень рекомендовано вимірювати поглинання в 10 мМ трис-НСІ, рН 7,5. Для чистої РНК співвідношення  $A_{260}/A_{280}$  становить 1,8–2,2 у 10 мМ трис-НСІ, рН 7,5. Скиньте до нуля показання спектрофотометр, використовуючи розчин, який складається з такої ж пропорції елюентного буферного розчину (BR5) та трис-НСІ, як і у зразках, для яких потрібно виконати вимірювання. Елюентний буферний розчин (BR5) має високе поглинання при довжині хвилі 220 нм, що може призвести до високих рівнів фонового поглинання, якщо показання спектрофотометра скинуто до нуля неналежним чином.

\* 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.

## Додаток С. Поводження з пробірками для виділення РНК з крові PAXgene (BRT)



Наведені нижче рекомендації від компанії BD можуть стати в нагоді під час роботи з пробірками для виділення РНК з крові PAXgene (BRT). Для отримання детальнішої інформації про пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT) див. *Довідник з використання пробірок для виділення РНК з крові PAXgene.*

### Інструкції щодо зняття кришки BD Hemogard

1. Затисніть пробірку для виділення РНК з крові PAXgene (BRT) однією рукою, помістивши великий палець під кришку BD Hemogard. (Для більшої стійкості покладіть руку на тверду поверхню.) Іншою рукою відкручуйте кришку BD Hemogard, одночасно штовхаючи її вгору великим пальцем іншої руки, **ПОКИ ПРОБКА ПРОБІРКИ НЕ ОСЛАБНЕ.**
2. Приберіть великий палець, перш ніж підняти кришку. **НЕ** використовуйте великий палець для зіштовхування кришки з пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT). Застереження. Якщо пробірка для виділення РНК з крові PAXgene (BRT) містить кров, існує небезпека контактування. Щоб уникнути травмування під час зняття кришки, важливо прибрати великий палець, за допомогою якого кришку штовхали вгору, із пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT), щойно кришка BD Hemogard ослабне.
3. Зніміть кришку з пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT). У дуже рідкісних випадках пластикова муфта відокремлюється від гумової пробки. **НЕ ЗБИРАЙТЕ КРИШКУ ЗНОВУ.** Обережно вийміть гумову пробку з пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (BRT).

## **Інструкції щодо встановлення допоміжної кришки BD Hemogard**

1. Обережно встановіть кришку на пробірку PAXgene (BRT).
2. Поверніть кришку і щільно натискайте на неї, поки пробка повністю не ввійде. Повне повторне встановлення пробки необхідне для того, щоб під час роботи з пробіркою для виділення РНК з крові PAXgene (BRT) кришка залишалась надійно зафіксованою.

# Інформація про замовлення

| Продукт   | Вміст   | Номер за кат. |
|---|---|---------------|
| Комплект для виділення РНК з крові PAXgene (50)               | 50 центрифужних колонок,<br>50 центрифужних колонок Shredder, пробірки для обробки, ДНКаз I без вмісту РНКаз, реагенти й буферні розчини без вмісту РНКаз. Для використання разом із пробірками для виділення РНК з крові PAXgene (PAXgene Blood RNA Tubes)   | 762174        |
| Пробірки для виділення РНК з крові PAXgene (100)              | 100 пробірок для забору крові   | 762165        |
| <b>Супутні продукти, які можна замовити в компанії QIAGEN</b> |   |               |
| Стартового набору, QIAcube                                    | До комплекту входять: штативи для флаконів для реагентів (3); стрічки для маркування штативів (8); наконечники з фільтрами об'ємом 200 мкл (1024); наконечники з фільтрами об'ємом 1000 мкл (1024); наконечники з фільтрами з великим отвором об'ємом 1000 мкл (1024); флакони для реагентів, 30 мл (18); адаптери ротора (240); тримач для адаптера ротора | 990395        |
| Наконечники з фільтрами, 1000 мкл (1024)                      | Стерильні одноразові наконечники з фільтром, складені штабелем  | 990352        |

|                                     |  |        |
|-------------------------------------|--|--------|
| Флакони для реагентів,<br>30 мл (6) | Флакони для реагентів (30 мл) із кришками; упаковка з 6 штук для використання зі штативом для флаконів для реагентів QIAcube | 990393 |
| Адаптери ротора (10 x 24)           | Для 240 препаратів:<br>240 одноразових адаптерів ротора; для використання з QIAcube  | 990394 |
| Штатив для флаконів для реагентів   | Штатив для флаконів для реагентів 6 x30 мл на робочому столі QIAcube   | 990390 |
| Тримач адаптера ротора              | Тримач для 12 одноразових адаптерів ротора; для використання з QIAcube   | 990392 |

#### **Супутні продукти, які можна замовити в компанії BD\***

|   |  |        |
|---|--|--------|
| Набір для забору крові                    | Набір для забору крові BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6: голка 21G 0,8 x 19 мм, трубки 305 мм з адаптером типу Люер; 50 шт. У коробці, 200 шт. у ящику | 367286 |
| Тримач одноразовий BD Vacutainer          | Підходить для пробірок діаметром 13 і 16 мм; 1000 шт. у ящику  | 364815 |
| Пробірки для сироватки BD Vacutainer Plus | Пробірка для забору крові 13 x 75 мм, 4,0 мл із червоною кришкою BD Hemogard і паперовою етикеткою; 100 шт. у коробці, 1000 шт. у ящику            | 368975 |

\* Ці аксесуари для забору крові є типовими продуктами, які можна використовувати з пробірками для виділення РНК з крові PAXgene (BRT). Отримати детальнішу інформації про ці аксесуари, а також про їх замовлення можна на веб-сайті [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

Найновішу інформацію про ліцензії та застереження щодо конкретних продуктів дивіться у відповідному довіднику з використання комплекту PreAnalytiX або QIAGEN або посібнику користувача. Довідники з використання комплектів PreAnalytiX і QIAGEN, а також посібники користувача можна знайти на веб-сайті **www.preanalytix.com** і **www.qiagen.com**, а також замовити через службу технічної підтримки PreAnalytiX.

## Історія редакцій довідника

| Документ і редакція | Зміни  | Дата              |
|---------------------|--|-------------------|
| НВ-0101-004, R2     | Зміни в тексті всього документа для відповідності нормам Всесвітньої гармонізованої системи (GHS).   | Червень 2015 року |
| НВ-0101-005, R3     | Новий шаблон; перегляд автоматизованих протоколів і даних щодо ефективності; оновлення правил техніки безпеки відповідно до норм Всесвітньої гармонізованої системи (GHS); зміни інформації про продукт та заяви про обмеження щодо застосування виробу. | Лютий 2019 року   |
| НВ-0101-006, R3     | Виправлення назви комплекту в таблиці його вмісту на сторінці 5.   | Січень 2020 року  |



## **PreAnalytiX у світі**

Вироби PreAnalytiX розповсюджуються компаніями QIAGEN і 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**

