

Februarie 2023

PAXgene[®] Blood RNA Kit (manual) Instrucțiuni de utilizare



Versiunea 3 (V3)

IVD

A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro



REF

762174

PreAnalytiX[®] GmbH

Garstligweg 8, 8634 Hombrechtikon, Elveția



Produs de QIAGEN[®] GmbH pentru PreAnalytiX GmbH

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R2

MAT

1130774

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

PreAnalytiX GmbH, 8634 Hombrechtikon, CH.

© 2023 PreAnalytiX GmbH. Dacă nu se menționează altceva, PreAnalytiX, logotipul PreAnalytiX și toate celelalte mărci comerciale sunt proprietatea PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH.

Acord de licență limitată pentru PAXgene Blood RNA Kit

Utilizarea acestui produs înseamnă acceptarea următorilor termeni de către orice cumpărător sau utilizator al produsului:

1. Produsul poate fi utilizat doar în conformitate cu protocoalele furnizate împreună cu produsul și prezentul manual și doar împreună cu componentele incluse în panou. PreAnalytiX® nu acordă nicio licență pentru niciuna dintre proprietățile sale intelectuale în vederea utilizării sau încorporării componentelor incluse în acest panou cu orice componentă care nu este inclusă în acest panou, dacă nu este precizat astfel în protocoalele furnizate împreună cu produsul, în prezentul manual și în protocoalele suplimentare disponibile la adresele **www.qiagen.com** și **www.preanalytix.com**.
2. În afară de licențele acordate în mod explicit, PreAnalytiX nu garantează sub nicio formă că acest kit și/sau utilizarea (utilizările) acestuia nu încalcă drepturile terților.
3. Acest kit este licențiat pentru o singură utilizare și nu poate fi reutilizat, recondiționat sau revândut.
4. PreAnalytiX declină în mod specific orice licențe, explicite sau implicite, altele decât cele declarate în mod explicit.
5. Cumpărătorul și utilizatorul kitului acceptă să nu ia măsuri și să nu permită niciunei persoane să ia măsuri care ar putea conduce la sau facilita oricare dintre faptele interzise prezentate mai sus.
6. PreAnalytiX poate pune în aplicare interdicțiile din acest Acord de licență limitată în orice instanță și va recupera toate costurile anchetelor și cheltuielile de judecată, inclusiv onorariile avocaților, în orice acțiune pentru aplicarea acestui Acord de licență limitată sau a oricăruia dintre drepturile sale de proprietate intelectuală legate de kit și/sau componentele acestuia.

Pentru clauzele de licență actualizate, consultați **www.qiagen.com** și **www.preanalytix.com**.

HB-3009-002 BD-8945 1130774 © 2023 PreAnalytiX GmbH, toate drepturile rezervate.

Distribuitorii PreAnalytiX

Produsele PreAnalytiX sunt fabricate și distribuite de QIAGEN și BD pentru PreAnalytiX.

Cuprins

Cuprins	3
Domeniul de utilizare	6
Utilizatori potențiali.....	6
Descrierea și principiul	7
Introducere	7
Principiu și procedură	7
Recoltarea și stabilizarea probelor	8
Izolarea ARN-ului	8
Izolarea manuală de ARN-ului	9
Izolarea automată a ARN-ului	11
Materiale furnizate	14
Conținutul kitului.....	14
Componentele kitului	15
Materiale necesare, dar nefurnizate	16
Pentru toate protocoalele	16
Pentru protocolul manual	16
Pentru protocolul automat	17
Avertismente și precauții	18
Informații de siguranță	18
Informații pentru situații de urgență	19
Precauții	19
Depozitarea și manipularea reactivilor	22

Stabilitatea în utilizare	22
Recoltarea, depozitarea și manipularea eșantioanelor	24
Protocol: Izolarea manuală a ARN-ului total din sângele integral uman recoltat în tuburi PAXgene Blood RNA Tubes.....	25
Protocol: Izolarea automată a ARN-ului total din sângele integral uman recoltat în tuburi PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	33
Limitări în utilizarea produsului.....	41
Controlul calității	41
Caracteristici de performanță	42
Recoltarea și stabilizarea probelor	42
Izolarea manuală de ARN-ului	47
Izolarea automată a ARN-ului	56
Stabilitatea ARN-ului izolat	59
Note importante	60
Utilizarea QIAcube Connect MDx.....	60
Pornirea QIAcube Connect MDx	60
Instalarea protocoalelor pe QIAcube Connect MDx	62
Încărcarea QIAcube Connect MDx	63
Coloane rotative (PSC, PRC), MCT și componente din plastic QIAcube Connect MDx..	66
Eliminare	72
Referințe.....	73
Ghid de depanare	74
Simboluri	76
Date de contact.....	78
Anexa A: Observații generale privind manipularea ARN	79

Anexa B: Cuantificarea și determinarea calității ARN-ului total81

Anexa C: Manipularea tuburilor PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)..... 83

Informații pentru comandă 85

Istoricul revizuirilor documentului 87

Domeniul de utilizare

A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro.

PAXgene Blood RNA System constă dintr-un tub de recoltare a sângelui (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) și un kit de purificare a acidului nucleic (PAXgene Blood RNA Kit). Acesta este destinat recoltării, depozitării și transportului sângelui și stabilizării ARN-ului intracelular într-un tub închis, precum și izolării și purificării ulterioare a ARN-ului gazdă din sângele integral pentru RT-PCR utilizat în testarea pentru diagnosticare moleculară.

Caracteristicile de performanță pentru PAXgene Blood RNA System au fost stabilite doar cu transcripții ale genelor FOS și IL1B. Utilizatorul este responsabil pentru stabilirea caracteristicilor de performanță adecvate ale PAXgene Blood RNA System pentru alte transcripții țintă.

Indicații de utilizare

PAXgene Blood RNA Kit este destinat purificării ARN-ului intracelular din sângele integral recoltat în PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Când kitul este utilizat împreună cu PAXgene Blood RNA Tube (BRT), sistemul furnizează ARN intracelular purificat din sânge integral pentru RT-PCR utilizat în testarea pentru diagnosticare moleculară.

Utilizatori potențiali

Produsul este destinat utilizării de către utilizatori profesioniști, de exemplu, tehnicieni și medici care sunt instruiți în procedurile de diagnosticare in vitro.

Acest kit este destinat uzului profesional.

Descrierea și principiul

Introducere

Recoltarea sângelui integral este primul pas în multe teste moleculare utilizate pentru studierea ARN-ului celular. Totuși, o problemă majoră în astfel de experimente este instabilitatea profilului de ARN celular in vitro. Studiile efectuate la PreAnalytiX au arătat că numărul de copii ale speciilor individuale de ARNm în sângele integral se poate modifica de peste 1000 de ori în timpul depozitării sau transportului la temperatura camerei (Rainen et al., 2002). Acest fenomen este cauzat atât de degradarea rapidă a ARN-ului, cât și de expresia indusă a anumitor gene după recoltarea sângelui. Astfel de modificări ale profilului de expresie a ARN-ului fac imposibile studii fiabile ale expresiei genelor. Prin urmare, o metodă care păstrează profilul de expresie a ARN-ului în timpul și după flebotomie este esențială pentru analiza de precizie a expresiei genelor în sângele integral uman.

Principiu și procedură

PreAnalytiX a dezvoltat un sistem care permite recoltarea, stabilizarea, depozitarea și transportul eșantioanelor de sânge integral uman, împreună cu un protocol rapid și eficient pentru izolarea ARN-ului intracelular. Sistemul necesită utilizarea tuburilor PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) pentru recoltarea sângelui și stabilizarea ARN-ului, urmată de izolarea manuală sau automată a ARN-ului folosind PAXgene Blood RNA Kit. Atât protocoalele manuale, cât și cele automate oferă performanțe echivalente substanțial în ceea ce privește calitatea și rezultatul ARN. Date privind performanța pentru protocolul manual (începând de la pagina 47 și protocolul automat (începând de la pagina 56) sunt incluse în acest manual.

PAXgene Blood RNA System permite standardizarea etapelor fluxului de lucru pre-analitic, de la recoltarea eșantioanelor de sânge până la izolarea ARN-ului celular,

conform standardului ISO 20186-1:2019, Examinări de diagnosticare moleculară în vitro. Specificații pentru procesele de examinare preliminară pentru sânge integral venos. Partea 1: ARN celular izolat.

Recoltarea și stabilizarea probelor

Tuburile PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) conțin un reactiv brevetat de stabilizare a ARN-ului. Acest aditiv protejează moleculele de ARN împotriva degradării induse de RNaze și reduce la minimum modificările ex vivo ale expresiei genelor. Caracteristicile de performanță ale PAXgene Blood RNA System au fost stabilite cu transcripții ale genelor FOS și IL1B, care pot fi vizualizate începând de la pagina 42.

Izolarea ARN-ului

PAXgene Blood RNA Kit este destinat izolării ARN-ului total din 2,5 ml de sânge integral uman recoltat într-un tub PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Procedura este simplă și poate fi efectuată folosind proceduri manuale sau automate (consultați Figura 1 sau Figura 3, pagina 10 sau, respectiv, 12). În ambele protocoale, izolarea începe cu o etapă de centrifugare pentru a transforma acizii nucleici în peleți în PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Peletul este spălat și resuspendat, operațiuni urmate de izolarea manuală sau automată a ARN-ului. În principiu, ambele protocoale urmează aceleași etape de protocol cu aceleași componente ale kitului.

Izolarea manuală de ARN-ului

În detaliu, peletul resuspendat este incubat în soluții tampon optimizate împreună cu proteinaza K (PK) pentru a realiza digestia proteinelor. Este efectuată o centrifugare suplimentară prin coloana rotativă PAXgene Shredder (PSC) pentru a omogeniza lizatul celular și a îndepărta reziduurile celulare, iar lichidul supernatant al fracției de curgere este transferat într-o eprubetă pentru microcentrifugă (microcentrifuge tube, MCT) nouă. Se adaugă etanol pentru a ajusta condițiile de legare, iar lizatul este aplicat pe o coloană rotativă pentru ARN PAXgene (PRC). În timpul unei scurte centrifugări, ARN-ul se leagă selectiv de membrana de silice PAXgene pe măsură ce contaminanții trec prin aceasta. Contaminanții rămași sunt eliminați prin mai multe etape eficiente de spălare. Între prima și a doua etapă de spălare, membrana este tratată cu DNază I (RNFD) pentru a elimina urmele de ADN legat. După etapele de spălare, ARN-ul este eluat în soluție tampon de eluție (BR5) și denaturat termic. Caracteristicile de performanță ale izolării manuale a ARN-ului folosind PAXgene Blood RNA System pot fi vizualizate la pagina 47.

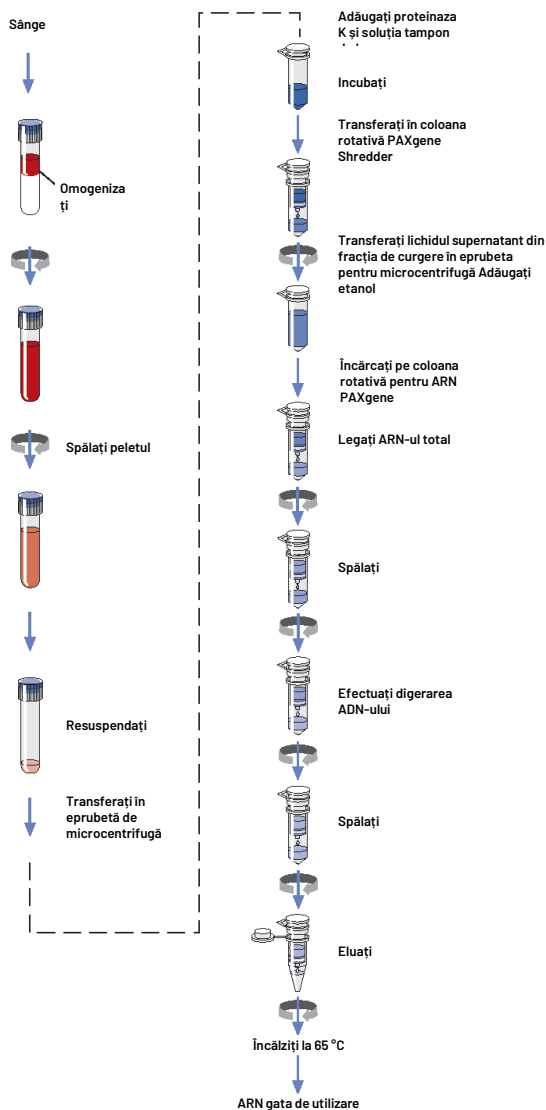


Figura 1: Procedura manuală PAXgene Blood RNA.

Izolarea automată a ARN-ului

Izolarea ARN-ului din sânge este automatizată pe QIAGEN QIAcube Connect MDx. Instrumentul inovator utilizează tehnologie avansată pentru a procesa coloanele rotative QIAGEN, permițând integrarea perfectă a pregătirii automate a probelor cu randament redus în fluxul de lucru al laboratorului. Prepararea probelor folosind QIAcube Connect MDx urmează aceleași etape ca și procedura manuală (adică liză, legare, spălare și eluție) și poate fi efectuată folosind același produs PAXgene Blood RNA Kit.



Figura 2: QIAcube Connect MDx.



QIAGEN QIAcube Connect MDx nu este disponibil în toate țările. Pentru detalii suplimentare, contactați Serviciile tehnice QIAGEN.

Protocolul de izolare automată a ARN-ului constă în 2 părți (sau protocoale), „PAXgene Blood RNA Partea A” (din sângele din PAXgene Blood RNA Tube pentru eluție) și „PAXgene Blood RNA Partea B” (după eluție până la ARN gata de utilizare), cu o scurtă intervenție manuală între cele 2 părți (consultați Figura 3).

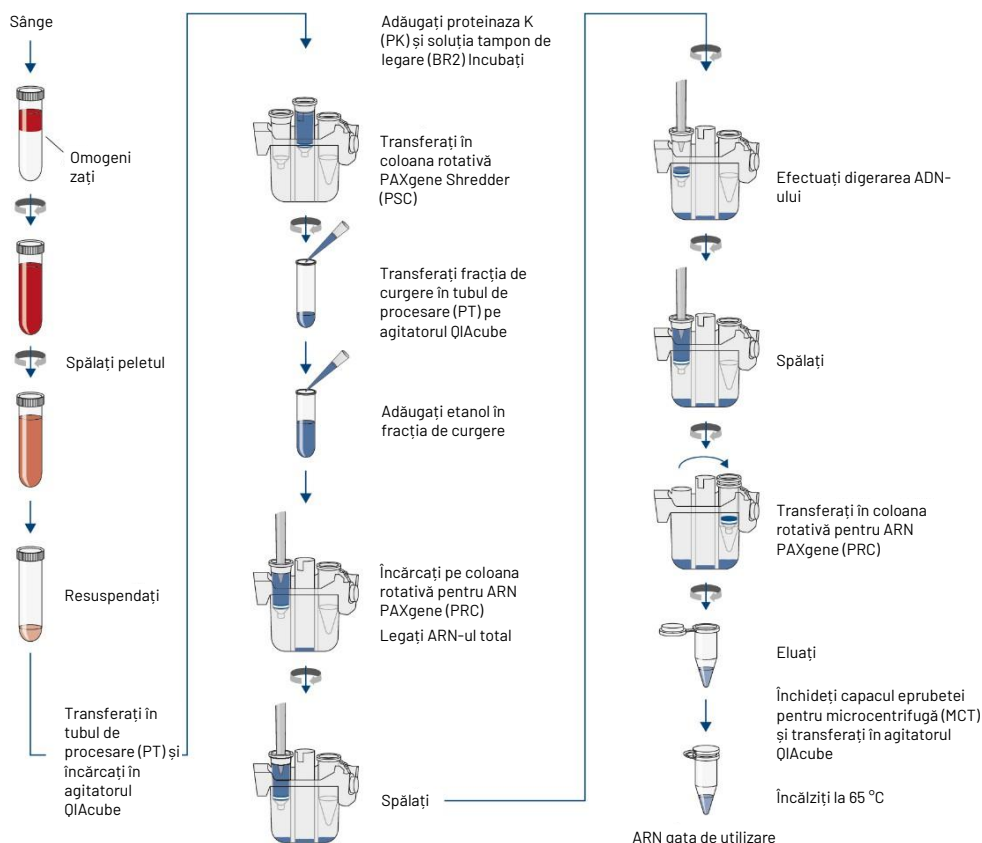


Figura 3: Procedura automată PAXgene Blood RNA.

Peletul de acid nucleic centrifugat, spălat și resuspendat (consultați „Izolarea ARN-ului”, pagina 8) este transferat din PAXgene Blood RNA Tube (BRT) în tuburile de procesare (processing tube, PT), care sunt plasate în agitatorul termostatat de pe masa de lucru QIAcube Connect MDx. Operatorul selectează și pornește protocolul „PAXgene Blood RNA Partea A” din meniu. QIAcube Connect MDx efectuează etapele protocolului până la eluția ARN-ului în soluția tampon de eluție (BR5). Operatorul transferă MCT-urile care conțin ARN-ul purificat în agitatorul termostatat al QIAcube Connect MDx. Operatorul selectează și pornește protocolul „PAXgene Blood RNA Partea B” din meniu, iar denaturarea termică este efectuată de QIAcube Connect MDx. Caracteristicile de performanță ale izolării automate a ARN-ului folosind PAXgene Blood RNA System pe QIAcube Connect MDx pot fi vizualizate la pagina 56.

Materiale furnizate

Conținutul kitului

PAXgene Blood RNA Kit Nr. de catalog Numărul de dispozitive de recoltare			(50) 762174 50
Denumire componentă	Descriere	Simbol	Cantitate
BR1	Resuspension Buffer (Soluție tampon de resuspendare)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Soluție tampon de legare)*	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (Soluție tampon de spălare 1)*	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (Soluție tampon de spălare 2) (concentrat)†	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Soluție tampon de eluție)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (Apă fără RNază)(flacon)	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (Proteinază K)(capac verde)	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (Coloane rotative pentru ARN PAXgene)(roșii)‡	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (Tuburi de procesare)(2 ml)§	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard™	Secondary BD Hemogard Closures (Capace secundare BD Hemogard)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (Eprubete pentru microcentrifugă)(1,5 ml)§	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (DNază I, fără RNază) (liofilizată)	DNA REM	1500 unități Kunitz¶
RDD	DNA Digestion Buffer (Soluție de digerare a ADN-ului)(capac alb)	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (Soluție tampon de resuspendare DNază)(tub, capac lila)	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (Coloane rotative PAXgene Shredder)(lila)‡	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Handbook	PAXgene Blood RNA Kit Handbook (Manualul PAXgene Blood RNA Kit) (versiunea 3)		1

* Nu este compatibil cu reactivii dezinfectanți care conțin soluții de albire. Conține o sare de guanidină. Consultați pagina 18 pentru Informații de siguranță.

† Soluția tampon de spălare 2 (BR4) este furnizată sub formă de concentrat. Înainte de prima utilizare, adăugați 4 volume de etanol (96–100 % v/v, grad de puritate p.a.) așa cum este indicat pe flacon pentru a obține o soluție de lucru.

‡ Fiecare coloană este ambalată într-un blister de unică folosință. Vă rugăm să consultați informațiile de siguranță

pentru instrucțiunile de eliminare.

- [§] Tuburile sunt disponibile în pungi de plastic, iar fiecare tub este de unică folosință. Vă rugăm să consultați informațiile de siguranță pentru instrucțiunile de eliminare.
- [¶] Unitățile Kunitz sunt unitățile utilizate în mod obișnuit pentru măsurarea DNazei I, definite drept cantitatea de DNază I care provoacă o creștere a A_{260} de 0,001 pe minut pe mililitru la 25 °C, pH 5,0, cu ADN puternic polimerizat ca substrat (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* 33, 349 and 363).

Componentele kitului

Denumire componentă	Descriere	Ingredient activ	Concentrație
BR1	Resuspension Buffer (Soluție tampon de resuspendare)	Niciunul	-
BR2	Binding Buffer (Soluție tampon de legare)	Tiocianat de guanidină	≥30 până la <50 % procent de masă
BR3	Wash Buffer 1 (Soluție tampon de spălare 1)	Tiocianat de guanidină Etanol	≥10 până la <20 % procent de masă ≥3 până la <10 % procent de masă
BR4	Wash Buffer 2 (Soluție tampon de spălare 2) (concentrat)	Niciunul	-
BR5	Elution Buffer (Soluție tampon de eluție)	Niciunul	-
RNFW	RNase-Free Water (Apă fără RNază) (flacon)	Niciunul	-
PK	Proteinase K (Proteinază K) (capac verde)	Proteinază K	≥1 până la <3 % procent de masă
RNFD	DNase I, RNase-free (DNază I, fără RNază) (iofilizată)	DNază	≥90 până la ≤100 % procent de masă
RDD	DNA Digestion Buffer (Soluție de digerare a ADN-ului) (capac alb)	Niciunul	-
DRB	DNase Resuspension Buffer (Soluție tampon de resuspendare DNază) (tub, capac lila)	Niciunul	-

Materiale necesare, dar nefurnizate

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvați. Pentru informații suplimentare, consultați fișele cu date de securitate (Safety Data Sheets, SDS) corespunzătoare, disponibile de la furnizorul produsului.

Pentru toate protocoalele

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; nr. cat. 762165)
- Etanol (96–100 % v/v, grad de puritate p.a.)
- Pipete* (10 μ l–4 ml)
- Vârfuri de pipetă fără RNază, sterile, cu barieră de aerosoli†
- Cilindru gradat‡
- Centrifugă* capabilă să atingă 3000–5000 $\times g$ și echipată cu un rotor cu cupă basculantă pentru a susține tuburile PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Agitator vortex*
- Gheață zdrobită
- Marker permanent pentru etichetare

Pentru protocolul manual

- Microcentrifugă* cu viteză variabilă, capabilă să atingă un interval de cel puțin 1000–8000 $\times g$, deși sunt aplicabile forțe g mai mici și mai mari (consultați etapele protocolului pentru detalii) și echipată cu un rotor pentru MCT-uri de 2 ml

* Asigurați-vă că dispozitivele și instrumentele au fost verificate, întreținute și calibrate cu regularitate, conform cu recomandările producătorului.

† Asigurați-vă că sunteți familiarizat cu instrucțiunile privind manipularea ARN-ului (Anexa A, pagina 75).

‡ Pentru adăugarea etanolului în soluția tampon BR4 concentrată.

- Agitator-incubator* capabil să incubeze la 55 °C și 65 °C și să agite la ≥400 rpm, fără a depăși 1400 rpm (de exemplu, Eppendorf® Thermomixer Compact sau echivalent)

Pentru protocolul automat

- Foarfece
- QIAcube Connect MDx* (QIAGEN, nr. cat. 9003070)

Consumabile QIAcube Connect MDx:

- Filter-Tips, 1000 µL (1024)(QIAGEN, nr. cat. 990352)[†]
- Reagent Bottles, 30 mL (6)(QIAGEN, nr. cat. 990393)[†]
- Rotor Adapters (10 × 24)(QIAGEN, nr. cat. 990394)[†]

Accesorii QIAcube Connect MDx:

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, nr. cat. 990392)[†]

Pachete de servicii QIAcube Connect MDx:

- QIAcube Connect MDx System FUL-2 (QIAGEN, nr. cat. 9003071)
- QIAcube Connect MDx System FUL-3 (QIAGEN, nr. cat. 9003072)
- QIAcube Connect MDx System PRV-1 (QIAGEN, nr. cat. 9003073)
- QIAcube Connect MDx Device PRV-1 (QIAGEN, nr. cat. 9003074)
- QIAcube Connect MDx System PRM-1 (QIAGEN, nr. cat. 9003075)

* Asigurați-vă că dispozitivul și instrumentul au fost verificate, întreținute și calibrate cu regularitate, conform cu recomandările producătorului.

[†] De asemenea, inclus în Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, nr. cat. 990395).

Avertismente și precauții

Pentru clienții din Uniunea Europeană, vă rugăm să rețineți că aveți obligația de a raporta orice incident grav survenit în legătură cu dispozitivul către producător și autoritatea competentă a statului membru în care își are sediul/domiciliul utilizatorul și/sau pacientul.

Pentru clienții din afara Uniunii Europene, vă rugăm să rețineți că este posibil să aveți obligația de a consulta reglementările locale privind raportarea incidentelor grave survenite în legătură cu dispozitivul către producător și/sau reprezentanța autorizată a acestuia și autoritatea de reglementare în care își are sediul/domiciliul utilizatorul și/sau pacientul.

Informații de siguranță

Atunci când lucrați cu substanțe chimice și materiale periculoase din punct de vedere biologic, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvate. Pentru informații suplimentare, vă rugăm să consultați fișele cu date de securitate (Safety Data Sheet, SDS) corespunzătoare. Acestea sunt disponibile online într-un format PDF ușor de utilizat și compact, la adresa **www.qiagen.com/safety**, unde puteți găsi, vizualiza și tipări fișa cu date de securitate a fiecărei truse și componente a trusei QIAGEN.

- Toate substanțele chimice și materialele biologice sunt potențial periculoase. Specimenele și probele de sânge sunt potențial infecțioase și trebuie tratate ca materiale periculoase din punct de vedere biologic.
- Aruncați deșeurile periculoase din punct de vedere biologic și deșeurile de kituri în conformitate cu procedurile locale de siguranță.

Informații pentru situații de urgență

CHEMTREC

În afara SUA și a Canadei +1 703-527-3887

Precauții

Când lucrați cu sânge, luați măsuri de precauții universale pentru a evita riscul de expunere potențială la agenți patogeni transmiși prin sânge (de exemplu, HIV, hepatita B și alte virusuri transmise prin sânge). Purtați mănuși, halate, echipament de protecție a ochilor, alte echipamente individuale de protecție și efectuați controale tehnice pentru a vă proteja de expunerea la sânge. Pentru informații suplimentare, vă rugăm să consultați fișele cu date de securitate (Safety Data Sheet, SDS) corespunzătoare. Acestea sunt disponibile online într-un format PDF ușor de utilizat și compact, la adresa **www.preanalytix.com** unde puteți găsi, vizualiza și tipări fișele cu date de securitate pentru acest kit.

ATENȚIE



NU adăugați soluții de albire sau soluții acide direct în deșeurile rezultate din prepararea probelor.

Soluția tampon de legare (BR2) și soluția tampon de spălare 1 (BR3) conțin tiocianat de guanidină, care, în combinație cu soluțiile de albire, poate forma compuși cu reactivitate ridicată. Dacă soluția tampon de legare (BR2) sau soluția tampon de spălare 1 (BR3) se varsă, curățați cu un detergent adecvat pentru laborator și cu apă. Dacă se varsă lichid care conține agenți potențial infecțioși, curățați mai întâi zona afectată cu detergent pentru laborator și cu apă, iar apoi cu hipoclorit de sodiu (înălbitor) 1 % (v/v).

Soluția de stabilizare a ARN-ului și amestecul de sânge din PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pot fi dezinfectate folosind 1 volum de soluție comercială de albire (5 % hipoclorit de sodiu) la 9 volume de soluție de stabilizare a ARN-ului și amestec de sânge.

Deșeurile rezultate în urma preparării probelor, cum ar fi lichidele supernatante din etapele de centrifugare din procedura de izolare a ARN-ului, trebuie considerate potențial infecțioase. Folosiți containere pentru deșeuri biologice periculoase pentru a elimina materialele biologice. Eliminarea trebuie efectuată în conformitate cu reglementările și procedurile locale ale unității dumneavoastră.

Anumite componente ale PAXgene Blood RNA Kit sunt de unică folosință. Consultați Conținutul kitului la pagina 14 pentru informații despre componentele individuale.

Următoarele fraze de pericol și de precauție se aplică pentru componentele PAXgene Blood RNA Kit. Consultați *Manualul PAXgene Blood RNA Tube* pentru informații de siguranță referitoare la tuburile PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Soluție tampon BR2



Conține: tiocianat de guanidină. Pericol! Nociv în caz de înghițire. Poate fi nociv în contact cu pielea sau prin inhalare. Provoacă leziuni oculare grave. Nociv pentru mediul acvatic cu efecte pe termen lung. În contact cu acizi, degajă un gaz foarte toxic. A se evita aruncarea în mediul înconjurător. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție. ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: Clătiți cu atenție cu apă, timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți. ÎN CAZ DE expunere sau de posibilă expunere: Sunați imediat la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau la

un medic. Eliminați conținutul/recipientul la o unitate autorizată de eliminare a deșeurilor.

Soluție tampon BR3



Conține: etanol; tiocianat de guanidină. Pericol! Lichid și vapori inflamabili. Provoacă leziuni oculare grave. În contact cu acizi, degajă un gaz foarte toxic. A se păstra departe de surse de căldură/scântei/flăcări deschise/suprafețe încinse. Fumatul interzis. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție. ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: Clătiți cu atenție cu apă, timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți. Sunați imediat la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau la un medic.

DNază I



Conține: DNază. Pericol! Poate provoca o reacție alergică a pielii. Poate provoca simptome de alergie sau astm sau dificultăți de respirație în caz de inhalare. Evitați să inspirați praful. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție. Purtați echipament de protecție respiratorie. ÎN CAZ DE expunere sau de posibilă expunere: Sunați la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau la un medic. Scoateți persoana la aer curat și mențineți o poziție confortabilă pentru respirat. Spălați îmbrăcămintea contaminată înainte de reutilizare.

Depozitarea și manipularea reactivilor

Coloanele rotative PAXgene RNA (PRC), coloanele rotative PAXgene Shredder (PSC), proteinaza K (PK) și soluțiile tampon (BR1, BR2, BR3, BR4 și BR5) trebuie depozitate în loc uscat, la temperatura indicată pe eticheta kitului.

Setul de DNază fără RNază, care conține DNază I (RNFD), soluție tampon de digereare a ADN-ului (RDD) și soluție tampon de resuspendare a DNazei (DRB), este livrat la temperatura ambiantă. Depozitați toate componentele setului de DNază fără RNază imediat după primire, la temperatura indicată pe etichetă. Dacă este păstrat în condiții corespunzătoare, kitul este stabil până la data de expirare tipărită pe cutia kitului.

Trebuie acordată atenție datelor de expirare și condițiilor de depozitare tipărite pe cutiile și etichetele tuturor componentelor. Nu utilizați componente expirate sau depozitate în mod incorect.

Stabilitatea în utilizare

După prima utilizare a kitului, reactivii sunt stabili în flacoanele originale la temperaturile indicate și până la data de expirare indicată pe eticheta cutiei kitului.

Reactivii introduși în flacoanele de reactivi ale QIAcube Connect MDx sunt stabili timp de 3 luni de depozitare la temperatura camerei (15–25 °C).

DNaza I reconstituită (RNFD) este stabilă la 2–8 °C timp de 6 săptămâni în flaconul de sticlă original (soluție standard).

Părțile alicote de unică folosință din soluția standard din MCT-urile de 1,5 ml (livrate împreună cu kitul) sunt stabile timp de 9 luni de depozitare la –20 °C. După

decongelare, părțile alicote de unică folosință sunt stabile timp de 6 săptămâni de depozitare la 2–8 °C.

Recoltarea, depozitarea și manipularea eșantioanelor

PAXgene Blood RNA Kit este destinat utilizării cu sângele recoltat în tuburile PAXgene Blood RNA Tubes. Sângele trebuie recoltat în tuburi PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) conform instrucțiunilor din Manualul PAXgene Blood RNA Tube. Dacă este necesar, consultați Anexa C (pagina 83) pentru recomandări privind manipularea tuburilor PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Toate probele trebuie tratate ca potențial infecțioase. Caracteristicile de performanță ale PAXgene Blood RNA System au fost stabilite cu transcripții ale genelor FOS și IL1B, care pot fi vizualizate la paginile 40–43.

Protocol: Izolarea manuală a ARN-ului total din sângele integral uman recoltat în tuburi PAXgene Blood RNA Tubes

Informații importante înainte de a începe

- Asigurați-vă că cutia kitului este intactă și nedeteriorată și că soluțiile tampon nu s-au vărsat. Nu utilizați un kit care a fost deteriorat.
- Când utilizați o pipetă, asigurați-vă că aceasta are volumul corect și că lichidul este aspirat și dozat cu grijă și complet.
- Pentru a evita transferul probelor în tubul sau coloana rotativă greșită, asigurați-vă că toate tuburile și coloanele rotative sunt etichetate corespunzător folosind un marker permanent. Etichetați capacul și corpul fiecărui tub (PT, MCT). Pentru coloanele rotative, etichetați corpul PT-ului. Închideți fiecare tub sau coloană rotativă după ce lichidul este transferat în aceasta.
- Scurgerile de probe și soluții tampon în timpul procedurii pot reduce rezultatul și puritatea ARN-ului.
- Dacă nu se specifică altfel, toate etapele acestui protocol, inclusiv etapele de centrifugare, trebuie efectuate la temperatura camerei (15–25 °C).

Din cauza sensibilității tehnologiilor de amplificare a acizilor nucleici, sunt necesare următoarele precauții la manipularea probelor pentru a evita contaminarea încrucișată:

- Pipetați cu grijă proba în coloana rotativă (PSC, PRC) fără a uda marginea coloanei.
- Înlocuiți întotdeauna vârfurile pipetelor între transferurile de lichide. Folosiți vârful de pipetă cu barieră de aerosoli.
- Evitați atingerea membranei coloanei rotative (PSC, PRC) cu vârful pipetei.
- După vortexarea sau încălzirea unui MCT, centrifugați-l scurt pentru a îndepărta picăturile din interiorul capacului.

- Purtați mănuși pe tot parcursul procedurii. În caz de contact între mănuși și probă, schimbați imediat mănușile.
- Închideți coloana rotativă (PSC, PRC) înainte de a o introduce în microcentrifugă. Centrifugați conform descrierii din procedură.
- Deschideți doar câte o singură coloană rotativă (PSC, PRC) pe rând și aveți grijă să evitați generarea de aerosoli.
- Pentru procesarea paralelă eficientă a mai multor probe, umpleți un suport cu PT-uri în care pot fi transferate coloanele rotative (PSC, PRC) după centrifugare. Aruncați PT-urile utilizate care conțin fracția de curgere și introduceți coloanele rotative (PSC, PRC) în PT-uri noi înainte de a le transfera înapoi în microcentrifugă.

Operațiuni care trebuie executate înainte de începere

- Sângele trebuie recoltat în tuburi PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) conform instrucțiunilor din *Manualul PAXgene Blood RNA Tube*. Dacă este necesar, consultați Anexa C (pagina 83) pentru recomandări privind manipularea tuburilor PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Asigurați-vă că tuburile PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) sunt incubate timp de cel puțin 2 ore la temperatura camerei după recoltarea sângelui pentru a asigura liza completă a celulelor sanguine și precipitarea ARN-ului. Incubarea PAXgene Blood RNA Tube (BRT) peste noapte poate crește rezultatele. Dacă incubarea inițială a sângelui la temperatura camerei timp de 2 ore nu a fost efectuată înainte de depozitare la 2–8 °C, –20 °C sau –70 °C, atunci echilibrați mai întâi PAXgene Blood RNA Tube (BRT) la temperatura camerei și apoi incubați la această temperatură timp de 2 ore înainte de a începe procedura.
- Citiți informațiile de siguranță de la pagina 18.
- Citiți instrucțiunile privind manipularea ARN-ului (Anexa A, pagina 79).
- Asigurați-vă că instrumentele, cum ar fi pipetele și agitatorul-incubator, au fost verificate și calibrate cu regularitate, conform cu recomandările producătorului.

- Un agitator-incubator este necesar în etapele 5 și 20. Setați temperatura agitatorului-incubator la 55 °C.
- Soluția tampon de legare (BR2) poate forma un precipitat la depozitare. Dacă este necesar, încălziți-o la 37 °C pentru a se dizolva.
- Soluția tampon de spălare 2 (BR4) este furnizată sub formă de concentrat. Înainte de prima utilizare, adăugați 4 volume de etanol (96–100 % v/v, grad de puritate p.a.) așa cum este indicat pe flacon pentru a obține o soluție de lucru.
- Dacă utilizați setul de DNază fără RNază pentru prima dată, preparați soluția standard de DNază I. Dizolvați DNaza I solidă (RNFD; 1500 unități Kunitz)* în 550 µl de soluție tampon de resuspendare a DNazei (DRB) livrată împreună cu setul. Aveți grijă să nu se piardă DNază I (RNFD) la deschiderea flaconului. Nu vortexați DNaza I reconstituită (RNFD). DNaza I este deosebit de sensibilă la denaturarea fizică. Omogenizarea trebuie efectuată numai prin răsturnarea ușoară a flaconului.
- DNaza I reconstituită (RNFD) poate fi depozitată la 2–8 °C în flaconul de sticlă original (soluție standard) sau la –20 °C după scoaterea soluției standard din flaconul de sticlă și împărțirea acesteia în părți alicote de unică folosință (utilizați MCT-ul de 1,5 ml livrat împreună cu kitul; suficient pentru 5 părți alicote). Părțile alicote decongelate pot fi depozitate la 2–8 °C. Nu recongelați părțile alicote după decongelare.
- La reconstituirea și separarea în părți alicote a DNazei I (RNFD), asigurați-vă că urmați instrucțiunile privind manipularea ARN-ului (Anexa A, pagina 79).

Procedură

1. Centrifugați PAXgene Blood RNA Tube (BRT) timp de 10 minute la 3000–5000 × g folosind un rotor cu cupă basculantă.

* Unitățile Kunitz sunt unitățile utilizate în mod obișnuit pentru măsurarea DNazei I, definite drept cantitatea de DNază I care provoacă o creștere a A_{260} de 0,001 pe minut pe mililitru la 25 °C, pH 5,0, cu ADN puternic polimerizat ca substrat (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* **33**, 349 and 363).



Asigurați-vă că proba de sânge a fost incubată în PAXgene Blood RNA Tube (BRT) timp de minimum 2 ore la temperatura camerei (15–25 °C) pentru a realiza liza completă a celulelor sanguine și precipitarea ARN-ului.



Rotorul trebuie să conțină adaptoare de tuburi pentru tuburi cu fund rotund. Dacă se utilizează alte tipuri de adaptoare sw tuburi, tuburile se pot sparge în timpul centrifugării.

2. Îndepărtați lichidul supernatant prin decantare sau pipetare. Adăugați 4 ml de apă fără RNază (RNFW) în pelet și închideți tubul folosind un cap secundar BD Hemogard nou (livrat împreună cu kitul).

Dacă lichidul supernatant este decantat, aveți grijă să nu deranjați peletul și uscați marginea tubului cu un prosop de hârtie curat.

3. Vortexați până când peletul este vizibil dizolvat și centrifugați timp de 10 minute la $3000\text{--}5000 \times g$ folosind un rotor cu cupă basculantă. Îndepărtați și aruncați întregul lichid supernatant.

Micile reziduuri rămase în lichidul supernatant după vortexare, dar înainte de centrifugare, nu vor afecta procedura.



Îndepărtarea incompletă a lichidului supernatant va inhiba liza și va dilua lizatul și, prin urmare, va afecta condițiile de legare a ARN-ului la membrana PAXgene.

4. Adăugați 350 µl de soluție tampon de resuspendare (BR1) și vortexați până când peletul este vizibil dizolvat.
5. Pipetați proba într-un MCT de 1,5 ml. Adăugați 300 µl de soluție tampon de legare (BR2) și 40 µl de proteinază K (PK). Amestecați prin vortexare timp de 5 secunde și incubați timp de 10 minute la 55 °C folosind un agitator-incubator la 400–1400 rpm. După incubare, setați temperatura agitatorului-incubator la 65 °C (pentru etapa 20).



Nu amestecați soluția tampon de legare (BR2) cu proteinaza K (PK) înainte de a le adăuga în probă.

6. Pipetați lizatul direct într-un PSC (lila) introdus într-un PT de 2 ml și centrifugați timp de 3 minute la viteză maximă (dar fără a depăși $20.000 \times g$).



Pipetați cu grijă lizatul în coloana rotativă (PSC) și verificați vizual dacă lizatul este transferat complet în coloana rotativă (PSC).

Pentru a preveni deteriorarea coloanelor (PSC) și a tuburilor (PT), nu depășiți $20.000 \times g$.



Unele probe pot curge prin PSC fără centrifugare. Acest lucru se întâmplă din cauza viscozității scăzute a unor probe și nu ar trebui considerat un indiciu al unei defecțiuni a produsului.

7. Transferați cu grijă întregul lichid supernatant al fracției de curgere într-un MCT de 1,5 ml nou, fără a deranja peletul din PT.
8. Adăugați 350 μ l etanol (96–100 % v/v, grad de puritate p.a.). Amestecați prin vortexare și centrifugați pentru scurt timp (1–2 s la $500\text{--}1000 \times g$) pentru a îndepărta picăturile din interiorul capacului tubului.



Durata centrifugării nu trebuie să depășească 1–2 secunde, deoarece acest lucru poate duce la peletizarea acizilor nucleici și la reducerea rezultatelor de ARN total.

9. Pipetați 700 μ l de probă în PRC (roșu) introdus într-un PT de 2 ml și centrifugați timp de 1 minut la $8000\text{--}20.000 \times g$. Introduceți coloana rotativă (PRC) într-un nou PT de 2 ml și aruncați vechiul PT care conține fracția de curgere.
10. Pipetați proba rămasă în PRC și centrifugați timp de 1 minut la $8000\text{--}20.000 \times g$. Introduceți coloana rotativă (PRC) într-un nou PT de 2 ml și aruncați vechiul PT care conține fracția de curgere.



Pipetați cu grijă proba în coloana rotativă (PRC) și verificați vizual dacă proba este transferată complet în coloana rotativă (PRC).

11. Pipetați 350 μ l de soluție tampon de spălare 1 (BR3) în PRC. Centrifugați timp de 1 minut la $8000\text{--}20.000 \times g$. Introduceți coloana rotativă (PRC) într-un nou PT de 2 ml și aruncați vechiul PT care conține fracția de curgere.
12. Adăugați 10 μ l de soluție standard de DNază I (RNFD) la 70 μ l de soluție tampon de

digerare a ADN-ului (RDD) într-un MCT de 1,5 ml. Amestecați prin răsturnarea ușoară a tubului și centrifugați pentru scurt timp pentru a colecta lichidul rezidual de pe părțile laterale ale tubului.

Dacă procesați, de exemplu, 10 probe, adăugați 100 µl de soluție standard de DNază I (RNFD) la 700 µl de soluție tampon de digereare a ADN-ului (RDD). Utilizați MCT-urile de 1,5 ml livrate împreună cu kitul.



DNaza I este deosebit de sensibilă la denaturarea fizică. Omogenizarea trebuie efectuată numai prin răsturnarea ușoară a tubului. Nu agitați în agitatorul vortex.

13. Pipetați amestecul de incubare de DNază I (RNFD) (80 µl) direct pe membrana PRC și așezați-l pe banc (20–30 °C) timp de 15 minute.



Asigurați-vă că amestecul de incubare de DNază I (RNFD) este plasat direct pe membrană. Digerarea DNazei va fi incompletă dacă o parte din amestec este aplicată și rămâne pe pereții sau pe garnitura inelară a coloanei rotative (PRC).

14. Pipetați 350 µl de soluție tampon de spălare 1 (BR3) în PRC și centrifugați timp de 1 minut la $8000-20.000 \times g$. Introduceți coloana rotativă (PRC) într-un nou PT de 2 ml și aruncați vechiul PT care conține fracția de curgere.
15. Pipetați 500 µl de soluție tampon de spălare 2 (BR4) în PRC și centrifugați timp de 1 minut la $8000-20.000 \times g$. Introduceți coloana rotativă (PRC) într-un nou PT de 2 ml și aruncați vechiul PT care conține fracția de curgere.



Soluția tampon de spălare 2 (BR4) este furnizată sub formă de concentrat. Asigurați-vă că etanolul este adăugat în soluția tampon de spălare 2 (BR4) înainte de utilizare (consultați „Operațiuni care trebuie executate înainte de începere”, pagina 26).

16. Adăugați încă 500 µl de soluție tampon de spălare 2 (BR4) în PRC. Centrifugați timp de 3 minute la $8000-20.000 \times g$.
17. Aruncați PT-ul care conține fracția de curgere și introduceți PRC-ul într-un PT de 2 ml nou. Centrifugați timp de 1 minut la $8000-20.000 \times g$.

18. Aruncați PT-ul care conține fracția de curgere. Introduceți PRC-ul într-un MCT de 1,5 ml și pipetați 40 µl de soluție tampon de eluție (BR5) direct pe membrana PRC. Centrifugați timp de 1 minut la $8000\text{--}20.000 \times g$ pentru a elua ARN-ul.

Este important să umeziți întreaga membrană cu soluție tampon de eluție (BR5) pentru a obține o eficiență maximă a eluției.

19. Repetați etapa de eluție (etapa 18) conform descrierii, utilizând 40 µl de soluție tampon de eluție (BR5) și același MCT.
20. Incubați eluatul timp de 5 minute la 65 °C în agitatorul-incubator (de la etapa 5) fără agitare. După incubare, răciți imediat pe gheață.



Această incubare a probelor la 65 °C denaturează ARN-ul pentru aplicații din aval. Chiar dacă aplicația din aval include o etapă de denaturare termică, nu omiteți această etapă. O denaturare suficientă a ARN-ului în acest moment este esențială pentru o eficiență maximă în aplicațiile din aval.

Nu depășiți timpul sau temperatura de incubare.

21. Dacă probele de ARN nu vor fi utilizate imediat, depozitați-le la -20 °C sau -70 °C.

Deoarece ARN-ul rămâne denaturat după congelare și decongelare repetate, nu este necesară repetarea incubării la 65 °C. Dacă utilizați probele de ARN într-un test de diagnosticare, urmați instrucțiunile furnizate de producător.

Pentru cuantificarea exactă a ARN-ului prin absorbanță la 260 nm, se recomandă diluarea probelor cu 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Diluarea probei în apă fără RNază poate genera valori mici imprecise.

Aduceți la zero spectrofotometrul folosind un blank constând din aceeași proporție de soluție tampon de eluție (BR5) și soluție tampon Tris-HCl ca și în probele care urmează să fie măsurate. Soluția tampon pentru eluție (BR5) are o

* Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvați. Pentru informații suplimentare, consultați fișele cu date de securitate (Safety Data Sheets, SDS) corespunzătoare, disponibile de la furnizorul produsului.

absorbanță ridicată la 220 nm, ceea ce poate genera niveluri mari ale absorbantei în fundal, dacă spectrofotometrul nu este adus la zero în mod corespunzător.



Pentru cuantificare în soluție tampon Tris HCl, utilizați relația

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Consultați Anexa B, pagina 81.

22. Închideți la loc toate flacoanele care conțin soluții tampon și apă fără RNază, flacoanele și tuburile care conțin enzime și soluții tampon enzimatică, precum și pungile care conțin materiale plastice din kitul utilizat pentru protocol. Depozitați conținutul rămas al kitului conform descrierii din secțiunea „Depozitarea și manipularea reactivilor” (pagina 22) și „Stabilitatea în utilizare” (pagina 22) până la o utilizare ulterioară.

Protocol: Izolarea automată a ARN-ului total din sângele integral uman recoltat în tuburi PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Informații importante înainte de a începe

- Asigurați-vă că cutia kitului este intactă și nedeteriorată și că soluțiile tampon nu s-au vărsat. Nu utilizați un kit care a fost deteriorat.
- Când utilizați o pipetă, asigurați-vă că aceasta are volumul corect și că lichidul este aspirat și dozat cu grijă și complet.
- Pentru a evita transferul probelor în tuburile și consumabilele din plastic greșite, asigurați-vă că toate PT, MCT și adaptoarele de rotor sunt etichetate corespunzător folosind un marker permanent. Etichetați capacul și corpul fiecărui MCT, corpul fiecărui PT și peretele exterior al fiecărui adaptor de rotor.
- Scurgerile de probe și soluții tampon în timpul procedurii pot reduce rezultatul și puritatea ARN-ului.
- Dacă nu se specifică altfel, toate etapele acestui protocol, inclusiv etapele de centrifugare, trebuie efectuate la temperatura camerei (15–25 °C).

Din cauza sensibilității tehnologiilor de amplificare a acizilor nucleici, sunt necesare următoarele precauții la manipularea probelor pentru a evita contaminarea încrucișată:

- Pipetați cu grijă proba în PT, în fundul tubului, fără a uda marginea acestuia.
- Înlocuiți întotdeauna vârful pipetelor între transferurile de lichide. Folosiți vârful de pipetă cu barieră de aerosoli.
- Evitați atingerea membranei coloanei rotative (PSC, PRC) cu vârful pipetei.
- După vortexarea sau încălzirea unui MCT, centrifugați-l scurt pentru a îndepărta picăturile din interiorul capacului.

- Purtați mănuși pe tot parcursul procedurii. În caz de contact între mănuși și probă, schimbați imediat mănușile.

Operațiuni care trebuie executate înainte de începere

- Sângele trebuie recoltat în tuburi PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) conform instrucțiunilor din *Manualul PAXgene Blood RNA Tube*. Dacă este necesar, consultați Anexa C (pagina 83) pentru recomandări privind manipularea tuburilor PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Asigurați-vă că tuburile PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) sunt incubate timp de cel puțin 2 ore la temperatura camerei după recoltarea sângelui pentru a asigura liza completă a celulelor sanguine și precipitarea ARN-ului. Incubarea PAXgene Blood RNA Tube (BRT) peste noapte poate crește rezultatele. Dacă PAXgene Blood RNA Tube (BRT) a fost depozitat la 2–8 °C, –20 °C sau –70 °C după recoltarea sângelui, mai întâi aduceți-l la temperatura camerei și apoi țineți-l la temperatura camerei timp de 2 ore înainte de începerea procedurii.
- Citiți informațiile de siguranță de la pagina 18.
- Citiți „Note importante”, pagina 60.
- Citiți instrucțiunile privind manipularea ARN-ului (Anexa A, pagina 79).
- Citiți Manualul de utilizare corespunzător pentru QIAcube Connect MDx și orice informații suplimentare furnizate împreună cu instrumentul, acordând o atenție deosebită informațiilor de siguranță.
- Asigurați-vă că dispozitivele și instrumentele, cum ar fi pipetele și QIAcube Connect MDx, au fost verificate și calibrate cu regularitate, conform cu recomandările producătorului.
- Soluția tampon de legare (BR2) poate forma un precipitat la depozitare. Dacă este necesar, încălziți-o la 37 °C pentru a se dizolva.
- Soluția tampon de spălare 2 (BR4) este furnizată sub formă de concentrat. Înainte de prima utilizare, adăugați volumul corespunzător de etanol (96–100 % v/v, grad de puritate p.a.) așa cum este indicat pe flacon pentru a obține o soluție de lucru.

- Dacă utilizați setul de DNază fără RNază pentru prima dată, preparați soluția standard de DNază I. Dizolvați DNaza I solidă (RNFD; 1500 unități Kunitz)* în 550 µl de soluție tampon de resuspendare a DNazei (DRB) livrată împreună cu setul. Aveți grijă să nu se piardă DNază I (RNFD) la deschiderea flaconului. Nu vortexați DNaza I reconstituită (RNFD). DNaza I este deosebit de sensibilă la denaturarea fizică. Omogenizarea trebuie efectuată numai prin răsturnarea ușoară a flaconului.
- DNaza I reconstituită (RNFD) poate fi depozitată la 2–8 °C în flaconul de sticlă original (soluție standard) sau la –20 °C după scoaterea soluției standard din flaconul de sticlă și împărțirea acesteia în părți alicote de unică folosință (utilizați MCT-ul de 1,5 ml livrat împreună cu kitul; suficient pentru 5 părți alicote). Părțile alicote decongelate pot fi depozitate la 2–8 °C. Nu recongelați părțile alicote după decongelare.
- La reconstituirea și separarea în părți alicote a DNazei I (RNFD), asigurați-vă că urmați instrucțiunile privind manipularea ARN-ului (Anexa A, pagina 79).
- Instalați adaptorul corect de agitator (inclus în QIAcube Connect MDx; utilizați adaptorul pentru tuburile safe-lock de 2 ml, marcate cu „2”) și așezați suportul agitatorului deasupra adaptorului.
- Verificați sertarul Waste (Deșeuri) și goliți-l dacă este necesar.
- Instalați orice protocoale aferente, dacă nu ați făcut-o deja pentru testările anterioare. QIAcube Connect MDx necesită descărcarea tuturor protocoalelor găsite în fișierul .zip aferent. Consultați „Instalarea protocoalelor pe QIAcube Connect MDx”, pagina 62.

Procedură

1. Închideți capacul QIAcube Connect MDx și porniți instrumentul cu ajutorul

* Unitățile Kunitz sunt unitățile utilizate în mod obișnuit pentru măsurarea DNazei I, definite drept cantitatea de DNază I care provoacă o creștere a A_{260} de 0,001 pe minut pe mililitru la 25 °C, pH 5,0, cu ADN puternic polimerizat ca substrat (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* **33**, 349 and 363).

comutatorului de alimentare (consultați Figura 15, pagina 61).

Se aude un semnal sonor și apare ecranul de pornire. Instrumentul realizează automat testele de inițializare.

2. Deschideți capacul QIAcube Connect MDx și încărcați reactivii și componentele din plastic necesare în instrument. Consultați „Încărcarea QIAcube Connect MDx”, pagina 63.

Pentru a economisi timp, încărcarea poate fi efectuată în timpul uneia sau ambelor etape de centrifugare următoare, de 10 minute (etapele 3 și 5).

3. Centrifugați PAXgene Blood RNA Tube (BRT) timp de 10 minute la $3000\text{--}5000 \times g$ folosind un rotor cu cupă basculantă.



Asigurați-vă că proba de sânge a fost incubată în PAXgene Blood RNA Tube (BRT) timp de minimum 2 ore la temperatura camerei ($15\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) pentru a realiza liza completă a celulelor sanguine și precipitarea ARN-ului.



Rotorul trebuie să conțină adaptoare de tuburi pentru tuburi cu fund rotund. Dacă se utilizează alte tipuri de adaptoare sw tuburi, tuburile se pot sparge în timpul centrifugării.

4. Îndepărtați lichidul supernatant prin decantare sau pipetare. Dacă lichidul supernatant este decantat, aveți grijă să nu deranjați peletul și uscați marginea tubului cu un prosop de hârtie curat. Adăugați 4 ml de apă fără RNază (RNFw) în pelet și închideți tubul folosind un cap secundar BD Hemogard nou (livrat împreună cu kitul).
5. Vortexați până când peletul este vizibil dizolvat și centrifugați timp de 10 minute la $3000\text{--}5000 \times g$ folosind un rotor cu cupă basculantă. Îndepărtați și aruncați întregul lichid supernatant.

Micile reziduuri rămase în lichidul supernatant după vortexare, dar înainte de centrifugare, nu vor afecta procedura.



Îndepărtarea incompletă a lichidului supernatant va inhiba liza și va dilua lizatul și, prin urmare, va afecta condițiile de legare a ARN-ului la membrana PAXgene.

6. Adăugați 350 µl de soluție tampon de resuspendare (BR1) și vortexați până când peletul este vizibil dizolvat.

7. Pipetați proba într-un PT de 2 ml.



Utilizați PT-urile de 2 ml incluse în PAXgene Blood RNA Kit.

8. Încărcați PT-urile deschise care conțin proba în agitatorul QIAcube Connect MDx (consultați Figura 18, pagina 65). Pozițiile probei sunt numerotate pentru a facilita încărcarea. Introduceți dopurile suporturilor pentru agitator (incluse în QIAcube Connect MDx) în fantele de la marginea suportului agitatorului, lângă fiecare PT. Acest lucru permite detectarea probelor în timpul verificării încărcării.



Asigurați-vă că este instalat adaptorul corect de agitator (adaptor de agitator, 2 ml, tuburi safe-lock, marcate cu „2”, inclus cu QIAcube Connect MDx).



Dacă procesați mai puțin de 12 probe, asigurați-vă că încărcați suportul agitatorului așa cum se arată în Figura 22, pagina 69. Una (1) sau 11 probe nu pot fi procesate. Numerele pozițiilor din suportul agitatorului corespund numerelor pozițiilor din centrifugă.

9. Închideți capacul QIAcube Connect MDx (consultați Figura 15, pagina 61).

10. Selectați protocolul „PAXgene Blood RNA Partea A” și porniți protocolul.

Urmați instrucțiunile de pe ecranul tactil al QIAcube Connect MDx.



Asigurați-vă că ambele părți ale programului (partea A și partea B) sunt instalate pe QIAcube Connect MDx (consultați „Instalarea protocoalelor pe QIAcube Connect MDx”, pagina 62).



Instrumentul va efectua verificări ale încărcării pentru probe, vârfuri, adaptoare de rotor și flacoane de reactivi.

11. După finalizarea protocolului „PAXgene Blood RNA Partea A”, deschideți capacul

QIAcube Connect MDx (consultați Figura 15, pagina 61). Îndepărtați și aruncați PRC-ul din adaptoarele rotorului și PT-urile goale din agitator.



În timpul testării, coloanele rotative sunt transferate din poziția 1 a adaptorului rotorului (poziția capacului L1) în poziția 3 a adaptorului rotorului (poziția capacului L2) de către instrument (consultați Figura 20, pagina 67).

12. Închideți capacele tuturor MCT-urilor de 1,5 ml care conțin ARN purificat în adaptoarele rotorului (poziția 3, poziția capacului L3, consultați Figura 20, pagina 67). Transferați MCT-urile de 1,5 ml pe adaptorul agitatorului QIAcube Connect MDx (consultați Figura 18, pagina 65).
13. Închideți capacul QIAcube Connect MDx (consultați Figura 15, pagina 61).
14. Selectați protocolul „PAXgene Blood RNA Partea B” și porniți protocolul.

Urmați instrucțiunile de pe ecranul tactil al QIAcube Connect MDx.



Acest program incubează probele la 65 °C și denaturează ARN-ul pentru aplicații din aval. Chiar dacă aplicația din aval include o etapă de denaturare termică, nu omiteți această etapă. O denaturare suficientă a ARN-ului în acest moment este esențială pentru o eficiență maximă în aplicațiile din aval.

15. După finalizarea programului „PAXgene Blood RNA Partea B”, deschideți capacul QIAcube Connect MDx (consultați Figura 15, pagina 61). Așezați imediat MCT-urile care conțin ARN purificat pe gheață.



AVERTISMENT: Suprafață fierbinte. Agitatorul poate atinge temperaturi de până la 70 °C (158 °F). Evitați atingerea acesteia atunci când este fierbinte.



Nu lăsați ARN-ul purificat să rămână în QIAcube Connect MDx. Deoarece probele nu sunt răcite, ARN-ul purificat se poate degrada. Prin urmare,

nu se recomandă rulările de pregătire a probelor nesupravegheate pe parcursul nopții.

16. Dacă probele de ARN nu vor fi utilizate imediat, depozitați-le la -20°C sau -70°C .

Întrucât ARN-ul rămâne denaturat după congelare și decongelare repetate, nu este necesară repetarea protocolului de incubare termică („PAXgene Blood RNA Partea B”). Dacă utilizați probele de ARN într-un test de diagnosticare, urmați instrucțiunile furnizate de producător.

Pentru cuantificarea exactă a ARN-ului prin absorbanță la 260 nm, se recomandă diluarea probelor în 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. * Diluarea probei în apă fără RNază poate genera valori mici imprecise.

Aduceți la zero spectrofotometrul folosind un blank constând din aceeași proporție de soluție tampon de eluție (BR5) și soluție tampon Tris-HCl ca și în probele care urmează să fie măsurate. Soluția tampon pentru eluție (BR5) are o absorbantă ridicată la 220 nm, ceea ce poate genera niveluri mari ale absorbantei în fundal, dacă spectrofotometrul nu este adus la zero în mod corespunzător.



Pentru cuantificare în soluție tampon Tris-HCl, utilizați relația

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Consultați Anexa B, pagina 81.

17. Scoateți suportul pentru flacoane de reactivi de pe masa de lucru a QIAcube Connect MDx (consultați Figura 18, pagina 65) și închideți toate flacoanele de reactivi cu capacele etichetate corespunzător. Închideți la loc toate flacoanele care conțin soluții tampon și apă fără RNază, flacoanele și tuburile care conțin enzime și soluții tampon enzimatică, precum și pungile care conțin materiale plastice din kitul utilizat pentru protocol. Depozitați conținutul rămas al kitului și flacoanele de reactivi conform descrierii din secțiunea „Depozitarea și manipularea reactivilor” (pagina 22) și „Stabilitatea în utilizare” (pagina 22) până la o utilizare ulterioară.

* Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvați. Pentru informații suplimentare, consultați fișele cu date de securitate (Safety Data Sheets, SDS) corespunzătoare, disponibile de la furnizorul produsului.

Scoateți și aruncați reactivii rămași în PT-urile din fantele pentru MTC QIAcube Connect MDx. Scoateți și aruncați adaptoarele rotorului din centrifugă. Goliți sertarul Waste (Deșeuri) al QIAcube Connect MDx (consultați Figura 15, pagina 61). Închideți capacul instrumentului și opriți instrumentul cu ajutorul comutatorului de alimentare.

Limitări în utilizarea produsului

PAXgene Blood RNA Kit este destinat izolării ARN-ului intracelular din sângele integral uman ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leucocite/ml) pentru aplicații de diagnosticare in vitro. Nu este destinat izolării ADN-ului genomic sau a acizilor nucleici virali din sângele integral uman. Din cauza numărului limitat de transcripții validate pentru specificațiile de stabilizare (transcripții ale genelor FOS și IL1B), caracteristicile de performanță nu au fost stabilite pentru toate transcripțiile. Utilizatorii ar trebui să examineze datele producătorului și propriile date pentru a determina dacă validarea este necesară și pentru alte transcripții. Componentele kitului sunt destinate exclusiv utilizării în protocolul manual și cel automat descrise în aceste instrucțiuni de utilizare.

Consultați *Manualul PAXgene Blood RNA Tube* pentru informații despre utilizarea tuburilor PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Controlul calității

În conformitate cu sistemul de management al calității certificat ISO al QIAGEN, fiecare lot de PAXgene Blood RNA Kit este testat pentru specificațiile prestabilite, pentru a asigura calitatea constantă a produsului.

Caracteristici de performanță

Recoltarea și stabilizarea probelor

Tuburile PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) conțin un reactiv brevetat de stabilizare a ARN-ului. Acest aditiv protejează moleculele de ARN împotriva degradării induse de RNaze și reduce la minimum modificările ex vivo ale expresiei genelor. Tuburile PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) sunt destinate recoltării de sânge integral uman și stabilizării ARN-ului celular timp de până la 3 zile la 18–25 °C (Figura 4 și Figura 5, paginile 43 și, respectiv, 44) sau până la 5 zile la 2–8 °C (Figura 6 și Figura 7, paginile 45 și 46). În plus, sângele stabilizat poate fi păstrat în stare congelată. Datele disponibile în prezent arată stabilizarea ARN-ului celular timp de cel puțin 11 ani la –20 °C sau –70 °C*. Pentru mai multe informații provenite din studiile în curs de desfășurare care evaluează stabilitatea pe perioade mai lungi de timp, vă rugăm să vizitați www.preanalytix.com sau să contactați Serviciile tehnice QIAGEN.

Durata reală a stabilizării ARN-ului poate varia în funcție de specia de ARN celular și de aplicația din aval utilizată. Din cauza numărului limitat de transcripții validate pentru specificațiile de stabilizare (transcripții ale genelor FOS și IL1B), caracteristicile de performanță nu au fost stabilite pentru toate transcripțiile. Utilizatorii ar trebui să examineze datele producătorului și propriile date pentru a determina dacă validarea este necesară și pentru alte transcripții.

* Un studiu pe termen lung privind depozitarea sângelui în tuburile PAXgene Blood RNA Tubes este în curs de desfășurare.

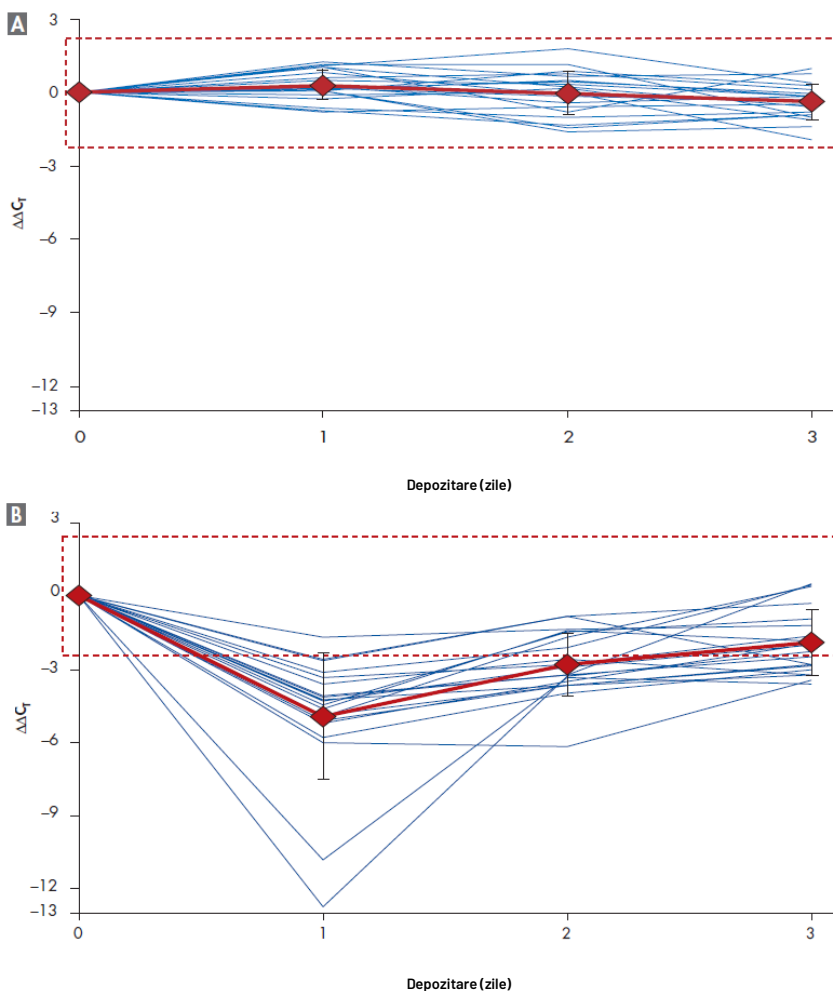


Figura 4: Stabilitatea ARN-ului în probele de sânge la 18–25 °C: FOS. S-a prelevat sânge de la 10 donatori aparent sănătoși, cu probe duplicate, și s-a depozitat la 18–25 °C pentru numărul indicat de zile, urmat de izolarea ARN-ului total. **[A]** Sângele a fost recoltat și depozitat în tuburi PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), iar ARN-ul total a fost purificat folosind PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Sângele a fost recoltat și depozitat în tuburi standard de recoltare a sângelui cu EDTA ca anticoagulant, iar ARN-ul total a fost purificat folosind o metodă standard de izolare organică cu curățare a ARN-ului pe bază de membrană de silice. Nivelurile relative de transcripții ale FOS au fost determinate prin real-time RT-PCR duplex, utilizând ARNr 18S ca standard intern. Valorile pentru toate probele sunt reprezentate grafic, fiind afișate mediile și abaterile standard ale tuturor probelor. Linii punctate indică precizia totală de $\pm 3 \times$ a testului ($2,34 C_t$).

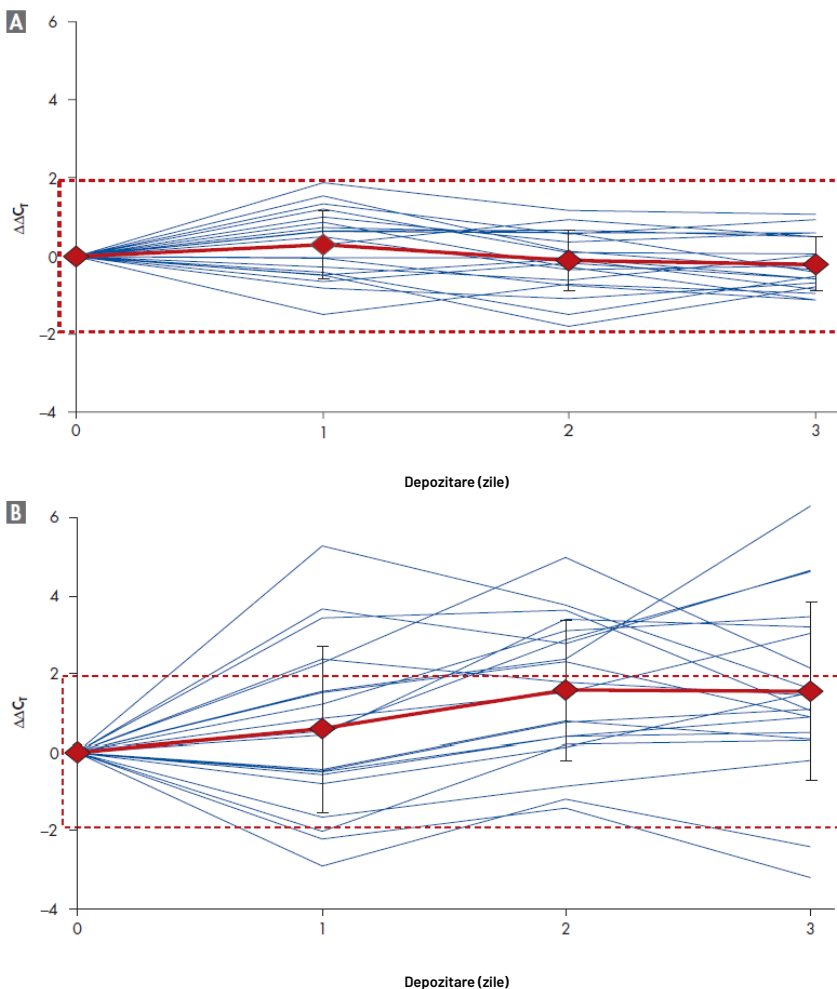


Figura 5: Stabilitatea ARN-ului în probele de sânge la 18–25 °C: IL1B. S-a prelevat sânge și ARN-ul total a fost purificat, după depozitare la 18–25 °C, așa cum este descris în Figura 4. Nivelurile relative de transcripții ale IL1B au fost determinate prin real-time RT-PCR duplex, utilizând ARNr 18S ca standard intern. Valorile pentru toate probele sunt reprezentate grafic, fiind afișate mediile și abaterile standard ale tuturor probelor. Liniile punctate indică precizia totală de $\pm 3 \times$ a testului ($1,93 C_t$).

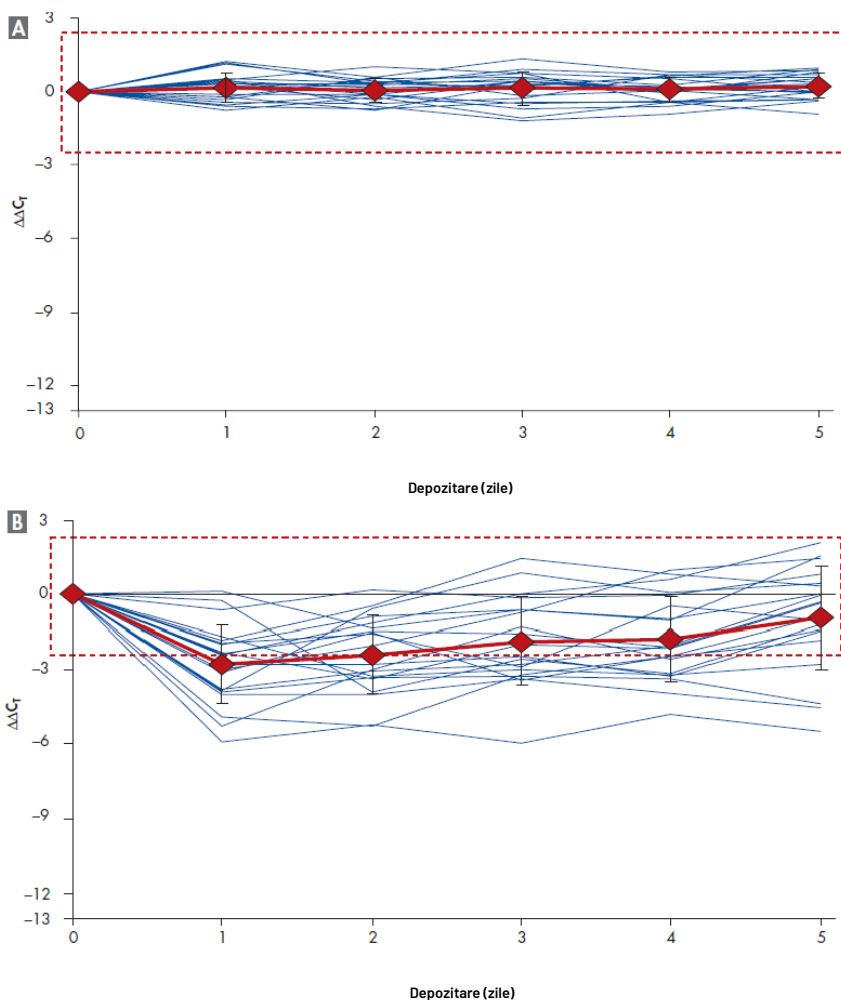


Figura 6: Stabilitatea ARN-ului în probele de sânge la 2–8 °C: FOS. S-a prelevat sânge de la 10 donatori, cu probe duplicat, și s-a depozitat la 2–8 °C pentru numărul indicat de zile, urmat de izolarea ARN-ului total. **[A]** Sângele a fost recoltat și depozitat în tuburi PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), iar ARN-ul total a fost purificat folosind PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Sângele a fost recoltat și depozitat în tuburi standard de recoltare a sângelui cu EDTA ca anticoagulant, iar ARN-ul total a fost purificat folosind o metodă standard de izolare organică cu curățare a ARN-ului pe bază de membrană de silice. Nivelurile relative de transcripții ale FOS au fost determinate prin real-time RT-PCR duplex, utilizând ARNr 18S ca standard intern. Valorile pentru toate probele sunt reprezentate grafic, fiind afișate mediile și abaterile standard ale tuturor probelor. Linii punctate indică precizia totală de $\pm 3 \times$ a testului ($2,34 C_T$).

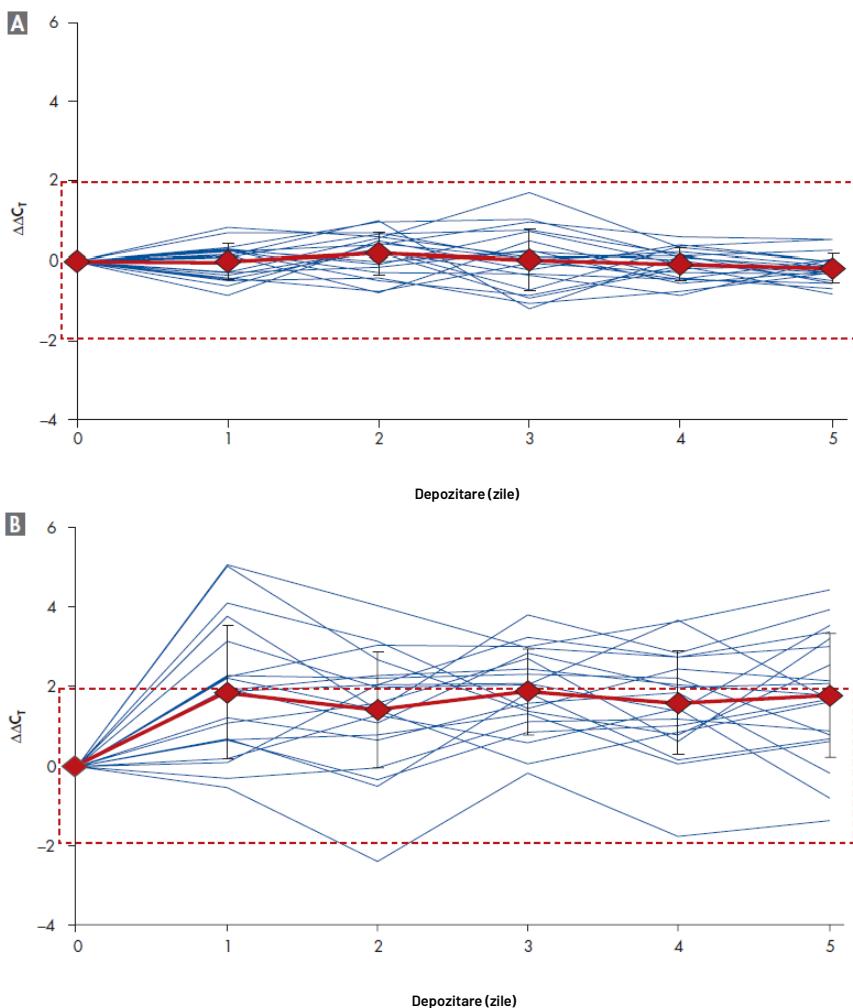


Figura 7: Stabilitatea ARN-ului în probele de sânge la 2–8 °C: IL1B. S-a prelevat sânge și ARN-ul total a fost purificat, după depozitare la 2–8 °C, așa cum este descris în Figura 6. Nivelurile relative de transcripții ale IL1B au fost determinate prin real-time RT-PCR duplex, utilizând ARNr 18S ca standard intern. Valorile pentru toate probele sunt reprezentate grafic, fiind afișate mediile și abaterile standard ale tuturor probelor. Linii punctate indică precizia totală de $\pm 3 \times$ a testului ($1,93 C_T$).

Izolarea manuală de ARN-ului

ARN-ul total izolat folosind PAXgene Blood RNA System este pur. Folosind protocolul manual, valorile A_{260}/A_{280} se situează între 1,8 și 2,2, iar ADN-ul genomic ≤ 1 % (procent de masă) este prezent în ≥ 95 % din toate probele, măsurat prin real-time PCR cantitativ, al unei secvențe a genei beta-actină. Cel puțin 95 % dintre probe nu prezintă inhibare în RT-PCR atunci când eluatul reprezintă până la 30 % din volumul de reacție RT-PCR.

Folosind protocolul manual, timpul mediu de preparare a probei (pe baza datelor din 12 rulări de preparare a probelor) este de aproximativ 90 de minute.*, cu doar 40 de minute de lucru practic. Rezultatele ARN din 2,5 ml de sânge integral uman sănătos sunt ≥ 3 μ g pentru ≥ 95 % din probele procesate. Deoarece rezultatele depind în mare măsură de donator, rezultatele individuale pot varia. Pentru donatorii individuali, PAXgene Blood RNA System oferă rezultate extrem de reproductibile și repetabile (Figura 8 și Figura 9, paginile 48 și, respectiv, 49) și RT-PCR reproductibilă și repetabilă (Figura 10 și Figura 11, paginile 54 și, respectiv, 55), ceea ce îl face extrem de robust pentru testele de diagnosticare clinică.

Figura 8 (pagina 45) indică repetabilitatea și reproductibilitatea generale ale PAXgene Blood RNA System. Au fost efectuate studii suplimentare pentru a demonstra influența diferitelor loturi de kituri PAXgene Blood RNA și a diferiților operatori asupra reproductibilității rezultatului ARN și a performanței RT-PCR în timp real. Întrucât pentru aceste studii s-au folosit probe de sânge comasate în loc de tuburi PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) individuale, rezultatele nu reflectă repetabilitatea sistemului, inclusiv fluctuația dintre prelevările individuale de sânge, ci doar repetabilitatea preparării probei (consultați Figura 9, pagina 49).

* Timpul total de execuție a protocolului, inclusiv manipularea inițială a tuburilor PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugări, spălare și resuspendare a peletilor).

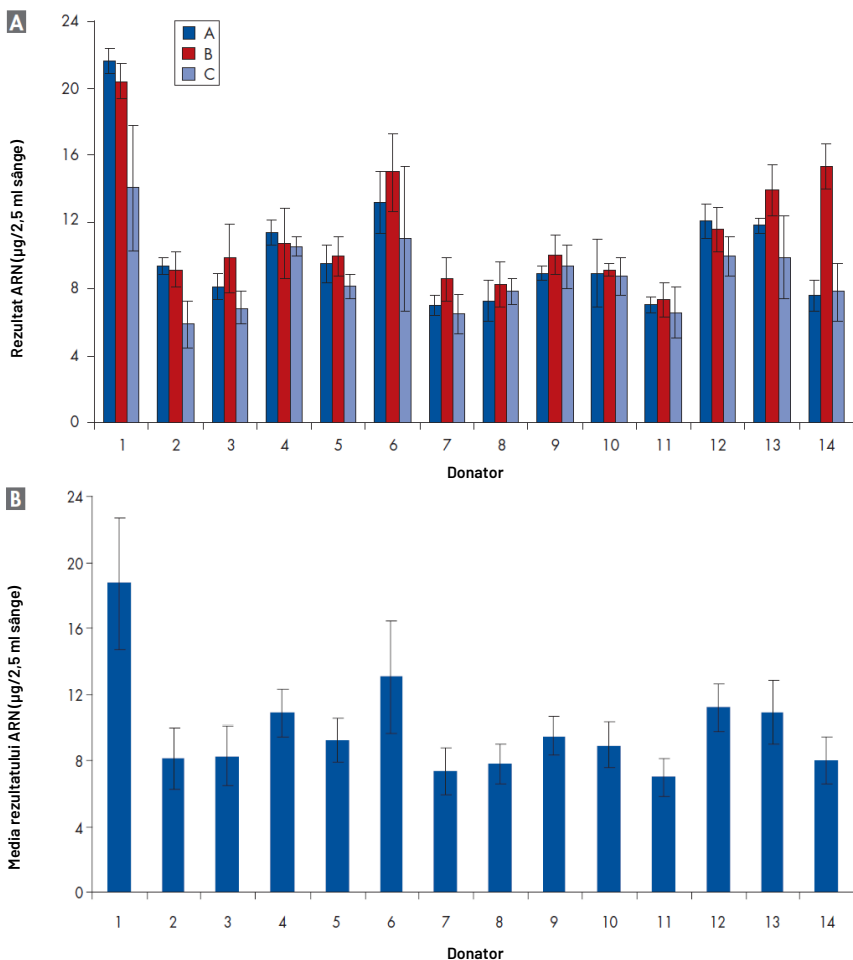


Figura 8: Izolarea reproductibilă și repetabilă a ARN-ului. Probe de sânge în cvadruplicat de la 14 donatori au fost procesate manual de fiecare dintre cei 3 tehnicieni (A, B, C). Au fost utilizate trei seturi de echipamente, iar toate probele preparate de un singur tehnician au fost procesate folosind același echipament. [A] Sunt prezentate mediile și abaterile standard ale rezultatului ARN per probe replicate de la aceiași donatori și tehnicieni diferiți. [B] Douăsprezece probe de sânge replicate de la fiecare dintre cei 14 donatori au fost procesate de către cei 3 tehnicieni diferiți. Sunt prezentate mediile și abaterile standard ale rezultatului ARN per probe de la aceiași donatori și de la toți tehnicienii. Pentru toate probele de ARN, rapoartele A_{260}/A_{280} au variat între 1,8 și 2,2.

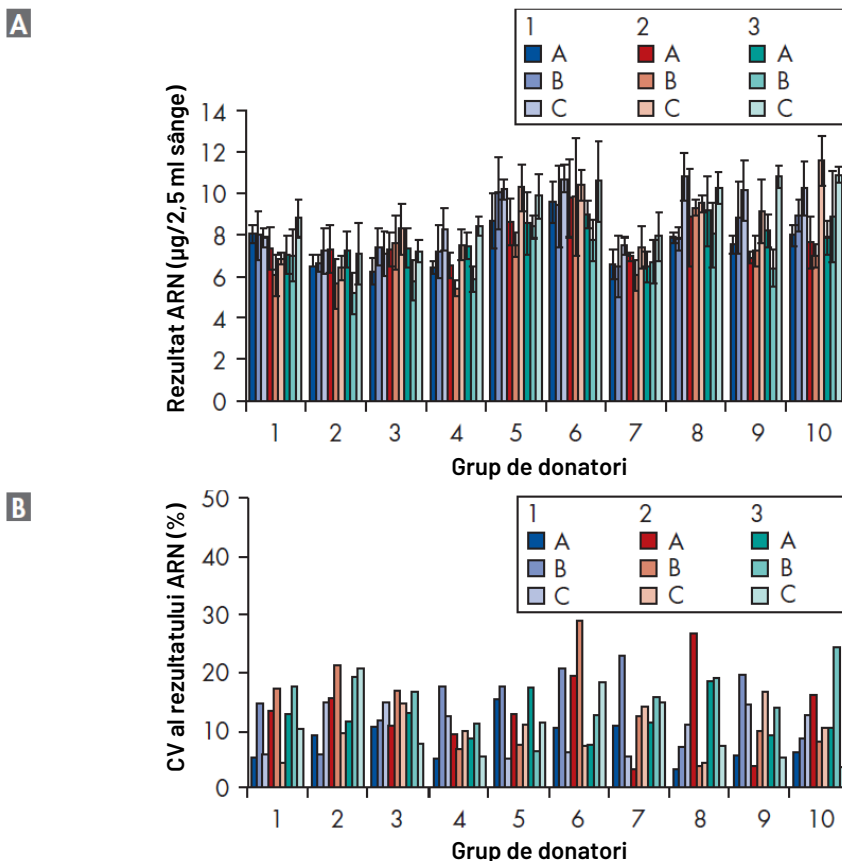


Figura 9: Repetabilitatea și reproductibilitatea rezultatului ARN pentru diferiți operatori și loturi de PAXgene Blood RNA Kit, utilizând probe de sânge comasate. Probe de sânge de la 30 de donatori diferiți au fost recoltate în tuburi PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 tuburi per donator, 360 de tuburi în total). Conținutul tuburilor de la 3 donatori a fost comasat și ulterior divizat din nou în părți alicote în 36 de probe. Aceste 36 de probe per grup de 3 donatori au fost procesate manual de 3 operatori diferiți. Fiecare operator a utilizat 3 loturi diferite de PAXgene Blood RNA Kit pentru izolarea ARN-ului și a procesat probe în cvadruplicat din fiecare dintre cele 10 grupuri de donatori. **[A]** Rezultatul ARN și abaterea standard pentru fiecare combinație operator-lot. Probe de sânge în cvadruplicat de la 10 grupuri de donatori au fost procesate de 3 operatori diferiți (A, B, C) cu fiecare dintre cele 3 loturi de kituri (1, 2, 3). Sunt prezentate rezultatele medii (coloane) și abaterea standard (bare de eroare) per probă în cvadruplicat din același grup de donatori pentru operatori diferiți și loturi diferite de kituri. **[B]** CV al rezultatului ARN per grup de donatori pentru toate combinațiile operator-lot (A, B, C; 1, 2, 3), calculat din rezultatul mediu și abaterea standard a rezultatului, prezentate în Figura 9A.

Tabelul 1A: Reproducibilitatea în cadrul fiecărui lot și în cadrul fiecărui utilizator pentru grupurile de donatori selectate (1, 6, 9, 10)

Combinarea datelor	Grupul de donatori 1 ($5,1 \times 10^6$ celule/ml)			Grupul de donatori 6 ($6,5 \times 10^6$ celule/ml)		
	Rezultat mediu (μg)	SD (μg)	CV (%)	Rezultat mediu (μg)	SD (μg)	CV (%)
Lotul 1, utilizatorul A	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
Lotul 1, utilizatorul B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
Lotul 1, utilizatorul C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
Lotul 2, utilizatorul A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
Lotul 2, utilizatorul B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
Lotul 2, utilizatorul C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
Lotul 3, utilizatorul A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
Lotul 3, utilizatorul B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
Lotul 3, utilizatorul C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
	Grupul de donatori 9 ($8,4 \times 10^6$ celule/ml)			Grupul de donatori 10 ($10,2 \times 10^6$ celule/ml)		
	Rezultat mediu (μg)	SD (μg)	CV (%)	Rezultat mediu (μg)	SD (μg)	CV (%)
Lotul 1, utilizatorul A	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
Lotul 1, utilizatorul B	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Lotul 1, utilizatorul C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Lotul 2, utilizatorul A	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Lotul 2, utilizatorul B	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Lotul 2, utilizatorul C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Lotul 3, utilizatorul A	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Lotul 3, utilizatorul B	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Lotul 3, utilizatorul C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3

Tabelul 1B: Reproducibilitatea în cadrul fiecărui utilizator și între toate loturile pentru grupurile de donatori selectate (1, 6, 9, 10)

Combinarea datelor	Grupul de donatori 1 ($5,1 \times 10^6$ celule/ml)			Grupul de donatori 6 ($6,5 \times 10^6$ celule/ml)		
	Rezultat mediu (μg)	SD (μg)	CV (%)	Rezultat mediu (μg)	SD (μg)	CV (%)
Utilizatorul A, toate loturile	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Utilizatorul B, toate loturile	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Utilizatorul C, toate loturile	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
	Grupul de donatori 9 ($8,4 \times 10^6$ celule/ml)			Grupul de donatori 10 ($10,2 \times 10^6$ celule/ml)		
	Rezultat mediu (μg)	SD (μg)	CV (%)	Rezultat mediu (μg)	SD (μg)	CV (%)
Utilizatorul A, toate loturile	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Utilizatorul B, toate loturile	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Utilizatorul C, toate loturile	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

Tabelul 1C: Reproducibilitatea în cadrul fiecărui lot și între toți utilizatorii pentru grupurile de donatori selectate (1, 6, 9, 10)

Combinarea datelor	Grupul de donatori 1 ($5,1 \times 10^6$ celule/ml)			Grupul de donatori 6 ($6,5 \times 10^6$ celule/ml)		
	Rezultat mediu (μg)	SD (μg)	CV (%)	Rezultat mediu (μg)	SD (μg)	CV (%)
Lotul 1, toți utilizatorii	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Lotul 2, toți utilizatorii	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Lotul 3, toți utilizatorii	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
	Grupul de donatori 9 ($8,4 \times 10^6$ celule/ml)			Grupul de donatori 10 ($10,2 \times 10^6$ celule/ml)		
	Rezultat mediu (μg)	SD (μg)	CV (%)	Rezultat mediu (μg)	SD (μg)	CV (%)
Lotul 1, toți utilizatorii	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Lotul 2, toți utilizatorii	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Lotul 3, toți utilizatorii	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

Tabelul 1D: Reproducibilitatea între toate loturile și toți utilizatorii pentru grupurile de donatori selectate (1, 6, 9, 10)

Combinarea datelor	Grupul de donatori 1 ($5,1 \times 10^6$ celule/ml)			Grupul de donatori 6 ($6,5 \times 10^6$ celule/ml)		
	Rezultat mediu (μg)	SD (μg)	CV (%)	Rezultat mediu (μg)	SD (μg)	CV (%)
Lotul 1, toți utilizatorii	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
	Grupul de donatori 9 ($8,4 \times 10^6$ celule/ml)			Grupul de donatori 10 ($10,2 \times 10^6$ celule/ml)		
	Rezultat mediu (μg)	SD (μg)	CV (%)	Rezultat mediu (μg)	SD (μg)	CV (%)
Lotul 1, toți utilizatorii	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Analiză detaliată a 4 grupuri reprezentative de donatori. Grupurile au fost selectate în funcție de numărul de celule albe și reflectă valorile superioare, medii și inferioare ale intervalului normal al numărului de celule albe ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leucocite/ml). Numărul de celule albe reprezintă valoarea medie a celor 3 numere de celule albe de la cei 3 donatori per grup de donatori.

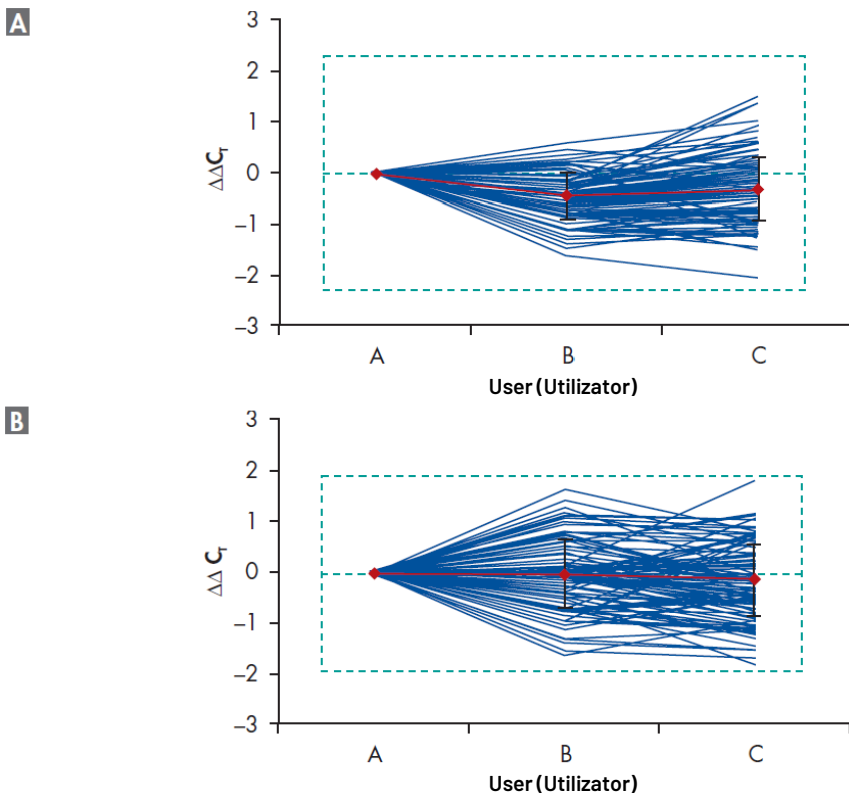


Figura 10: Reproducibilitatea RT-PCR – între utilizatori. ARN-ul purificat în experimentul descris în Figura 9 a fost utilizat pentru real-time RT-PCR. Nivelurile relative de transcripții ale **[A]** FOS și **[B]** IL1B au fost determinate prin real-time RT-PCR duplex, utilizând ARNr 18S ca standard intern. Valorile pentru toate probele sunt reprezentate grafic, în raport cu valorile pentru utilizatorul A (10 grupuri de donatori $\times$ 3 loturi de kituri $\times$ 4 replicare = 120 seturi de date pentru fiecare genă), cu medii (linii roșii) și abateri standard (bare negre) pentru toate probele prezentate. Liniile punctate indică precizia totală de $\pm 3x$ a testelor (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

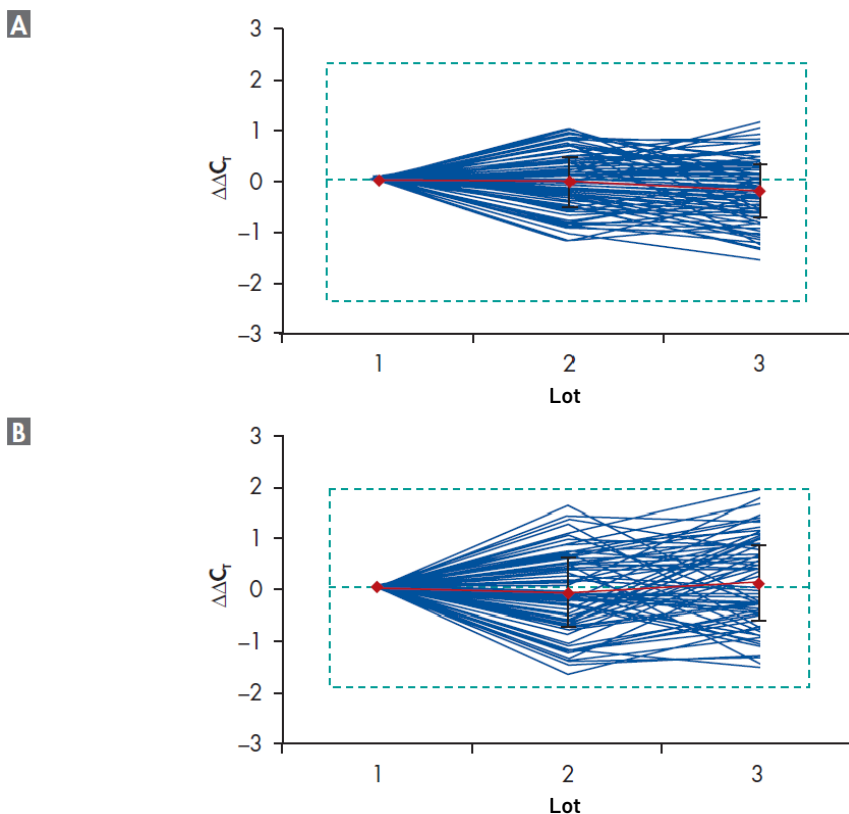


Figura 11: Reproducibilitatea RT-PCR – între loturi de kituri. ARN-ul purificat în experimentul descris în Figura 9 a fost utilizată pentru real-time RT-PCR. Nivelurile relative de transcripții ale **[A]** FOS și **[B]** IL1B au fost determinate prin real-time RT-PCR duplex, utilizând ARNr 18S ca standard intern. Valorile pentru toate probele sunt reprezentate grafic, în raport cu valorile pentru lotul de kituri 1 (10 grupuri de donatori $\times$ 3 utilizatori $\times$ 4 replicare = 120 seturi de date pentru fiecare genă), cu medii (linii roșii) și abateri standard (bare negre) pentru toate probele prezentate. Liniile punctate indică precizia totală de $\pm 3x$ a testelor (FOS: 2,34 C_T ; IL1B: 1,93 C_T).

Tabelul 2: Rezumatul datelor RT-PCR din Figura 10 și Figura 11

Sistem de testare	Testul FOS/ARNr 18S		Testul IL1B/ARNs 18S	
Compararea datelor	Medie ($\Delta\Delta C_T$)	$\pm$ SD ($\Delta\Delta C_T$)	Medie ($\Delta\Delta C_T$)	$\pm$ SD ($\Delta\Delta C_T$)
Reproductibilitatea în cadrul fiecărui utilizator și între toate loturile				
Toți utilizatorii, lotul 1-lotul 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Toți utilizatorii, lotul 1-lotul 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Toți utilizatorii, lotul 1-lotul 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Reproductibilitatea în cadrul fiecărui utilizator și între toate loturile				
Toate loturile, utilizatorul A-utilizatorul A	0,00	0,00	0,00	0,00
Toate loturile, utilizatorul A-utilizatorul B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Toate loturile, utilizatorul A-utilizatorul C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Utilizator: Tehnicianul care a efectuat studiul.
Lot: Numărul lotului de kituri utilizat în acest studiu.
SD: Abatere standard.
Valorile $\Delta\Delta C_T$ medii (N = 120) și abaterile standard sunt prezentate pentru datele din Figura 10 și Figura 11.

Izolarea automată a ARN-ului

Rezultatele ARN din 2,5 ml de sânge integral uman sănătos sunt ≥ 3 μ g pentru ≥ 95 % din probele procesate. Figura 12 (pagina 57) indică rezultate ARN dintr-un total de 216 probe preparate folosind protocolul automat cu 3 loturi de kituri de către 3 operatori. Întrucât pentru aceste studii s-au folosit probe de sânge comasate în loc de tuburi individuale PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), rezultatele nu reflectă rezultatul ARN așteptat din probele individuale ale unor prelevări individuale de sânge. Întrucât rezultatele depind în mare măsură de donator, rezultatele individuale pot varia (Figura 12, pagina 57).

Cel puțin 95 % dintre probe nu prezintă inhibare în RT-PCR atunci când eluatul reprezintă până la 30 % din volumul de reacție RT-PCR. Folosind protocolul automat, contaminarea încrucișată între probe este nedetectabilă, măsurată prin RT-PCR cantitativă, în timp real, a secvențelor transcripțiilor de ABL1 și FOS în probe ARN-

negative (apă) asociate cu probe ARN-pozitive (sânge integral uman) în aceeași rulare.

ARN-ul izolat cu PAXgene Blood RNA System și protocolul automat este pur, așa cum este demonstrat de lipsa inhibării RT-PCR și de valorile A_{260}/A_{280} între 1,8 și 2,2. ADN-ul genomic este prezent la $\leq 1\%$ (procent de masă) în $\geq 95\%$ din toate probele, măsurat prin real-time PCR cantitativă a unei secvențe a genei beta-actină. Figura 13 și Figura 14 (pagina 58) prezintă valorile A_{260}/A_{280} și ADN-ul genomic relativ pentru un total de 216 probe preparate folosind protocolul automat cu 3 loturi de kituri de către 3 operatori.

Rezultat ARN ($\mu\text{g}/2,5\text{ ml}$ sânge) QIAcube Connect MDx

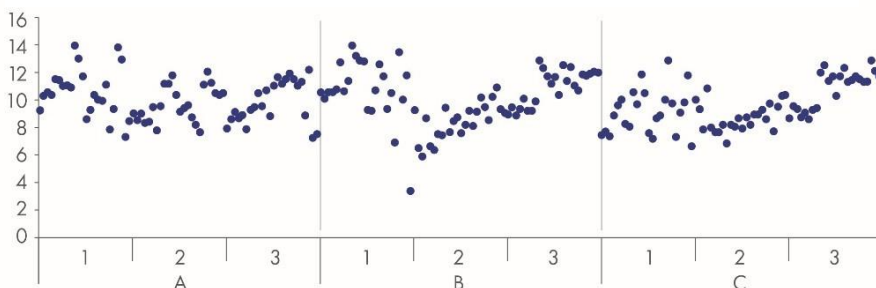


Figura 12: Rezultat ARN — procesare automată cu QIAcube Connect MDx. Probele de sânge de la donatori individuali au fost recoltate în tuburi PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Conținutul tuburilor a fost comasat în 6 grupuri de donatori și ulterior divizat din nou în părți alicote. În total, 216 tuburi (adică 36 per grup) au fost procesate de 3 operatori diferiți (A, B, C). Fiecare operator a utilizat 3 loturi diferite (1, 2, 3) de PAXgene Blood RNA Kit pentru izolarea automată cu QIAcube Connect MDx și a procesat probe în cvadruplicat de la fiecare dintre cele 6 grupuri de donatori. Rezultatele ARN ale tuturor probelor individuale sunt prezentate pentru fiecare combinație operator-lot.

Puritatea ARN-ului (A_{260}/A_{280}) QIAcube Connect MDx

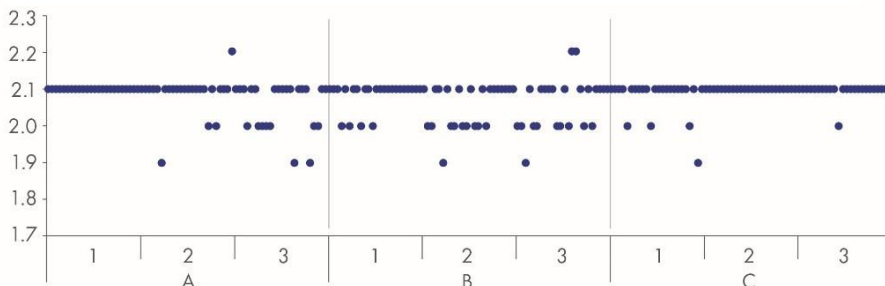


Figura 13: Puritatea ARN-ului (valorile A_{260}/A_{280}) – procesare automată cu QIAcube Connect MDx. ARN-ul a fost purificat de 3 operatori diferiți (A, B, C) folosind 3 loturi diferite (1, 2, 3) de PAXgene Blood RNA Kit cu QIAcube Connect MDx în experimentul descris în Figura 12. Valorile A_{260}/A_{280} ale tuturor probelor individuale sunt afișate pentru fiecare combinație operator-lot.

ADN genomic (procent de masă) [%] QIAcube Connect MDx

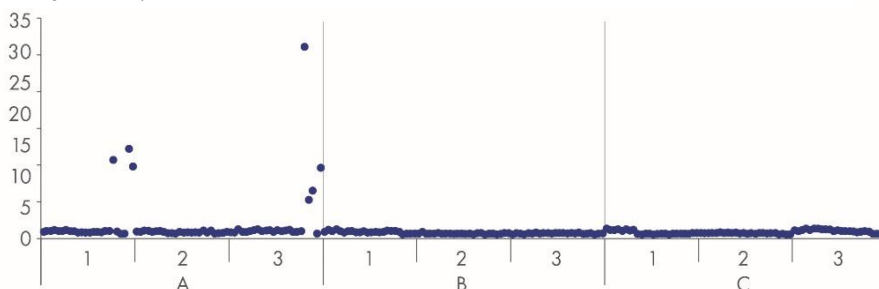


Figura 14: Puritatea ARN-ului (% contaminare cu ADN genomic) – procesare automată cu QIAcube Connect MDx. ARN-ul a fost purificat de 3 operatori diferiți (A, B, C) folosind 3 loturi diferite (1, 2, 3) de PAXgene Blood RNA Kit cu QIAcube Connect MDx în experimentul descris în Figura 12. Cantitățile de ADN genomic (procent de masă) din toate probele individuale sunt prezentate pentru fiecare combinație operator-lot.

Protocolul automat de izolare a ARN-ului utilizând PAXgene Blood RNA System oferă rezultate RT-PCR extrem de reproductibile și repetabile, ceea ce îl face extrem de robust pentru testele de diagnosticare clinică.

Stabilitatea ARN-ului izolat

Probele de ARN izolate din tuburile PAXgene Blood RNA Tubes umplute cu sânge folosind PAXgene Blood RNA Kit sunt stabile timp de 5 ani de depozitare la -20°C și 7 ani de depozitare la -70°C (punctul final al studiilor).

Note importante

Utilizarea QIAcube Connect MDx

Asigurați-vă că sunteți familiarizat cu operarea QIAcube Connect MDx. Citiți manualul de utilizare al instrumentului și orice informații suplimentare furnizate împreună cu instrumentul, acordând o atenție deosebită informațiilor de siguranță, înainte de a începe protocolul automat PAXgene Blood RNA.

Pornirea QIAcube Connect MDx

Închideți capacul QIAcube Connect MDx și porniți instrumentul cu ajutorul comutatorului de alimentare (consultați Figura 15, pagina 61).

Se aude un semnal sonor și apare ecranul de pornire. Instrumentul realizează automat testele de inițializare.



Vedere din față a QIAcube Connect MDx



Ecran tactil extras



Vedere din spate a QIAcube Connect MDx (partea stângă)



Vedere din spate a QIAcube Connect MDx (partea dreaptă)

Figura 15: Caracteristicile externe ale QIAcube Connect MDx.

- | | |
|---|---|
| <p>1 Ecran tactil</p> <p>2 Capacul</p> <p>3 Sertarul Waste (Deșeuri)</p> <p>4 Comutator de alimentare</p> | <p>5 2 porturi USB în partea stângă a ecranului tactil; 2 porturi USB în spatele ecranului tactil (modulul Wi-Fi conectat la 1 port USB)</p> <p>6 Port Ethernet RJ-45</p> <p>7 Mufă cablu de alimentare</p> <p>8 Orificiu de evacuare aer de răcire</p> |
|---|---|

Ecran tactil

QIAcube Connect MDx este controlat prin intermediul unui ecran tactil. Ecranul tactil îi permite utilizatorului să opereze instrumentul și îl ghidează prin configurarea mesei de lucru. În timpul procesării probelor, ecranul tactil afișează starea protocolului și timpul rămas.



Figura 16: Ecranul tactil extras al QIAcube Connect MDx.

Instalarea protocoalelor pe QIAcube Connect MDx

Este posibil să fie necesară o instalare inițială a protocolului înainte de a putea fi efectuată prima rulare de preparare a ARN-ului pe QIAcube Connect MDx. Instalați ambele protocoale, „PAXgene Blood RNA Partea A”, și „PAXgene Blood RNA Partea B”.

Protocoalele pentru QIAcube Connect MDx sunt furnizate la adresa **www.qiagen.com** și trebuie descărcate pe stickul USB livrat împreună cu instrumentul. Aceste protocoale vor fi transferate către instrument prin portul USB.

Portul USB (situat pe partea laterală a ecranului tactil; consultați Figura 15, pagina 61) permite conectarea QIAcube Connect MDx la stickul USB livrat împreună cu instrumentul. Fișierele de date, cum ar fi fișierele jurnal sau fișierele raport, pot fi transferate și prin portul USB de la instrument la stickul USB.



Portul USB este destinat utilizării exclusive cu stickul USB furnizat de QIAGEN. Nu conectați alte dispozitive la acest port.



Nu scoateți stickul USB în timp ce descărcați protocoale sau transferați fișiere de date sau în timpul unei rulări de protocol.

Pentru mai multe detalii despre procesul de încărcare a protocoalelor în QIAcube Connect MDx, consultați manualul de utilizare al instrumentului.

Încărcarea QIAcube Connect MDx

Pentru a economisi timp, încărcarea poate fi efectuată în timpul uneia sau ambelor etape de centrifugare de 10 minute (etapele 3 și 5) din „Protocol: Izolarea automată a ARN-ului total din sângele integral uman recoltat în tuburi PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)”, pagina 33.

Flacoane de reactivi

Înainte de fiecare rulare pe QIAcube Connect MDx, umpleți cu grijă cele 4 flacoane de reactivi cu reactivii enumerați în Tabelul 3 (pagina 60) până la nivelul maxim al indicatorului sau, dacă acest lucru nu este posibil, până la nivelul permis de volumele de soluție tampon furnizate în PAXgene Blood RNA Kit. Etichetați flacoanele și capacele în mod clar cu denumirile soluțiilor tampon și așezați flacoanele de reactivi umplute în pozițiile corespunzătoare de pe suportul pentru flacoane de reactivi. Încărcați suportul pe masa de lucru a instrumentului, așa cum se arată (Figura 17 și Figura 18, paginile 65 și, respectiv, 65).



Volumul furnizat de soluție tampon BR2 nu va umple un flacon de reactivi până la nivelul indicatorului. Este posibil ca soluțiile tampon BR3 și BR4 să nu umple flaconul până la nivelul indicatorului după procesarea mai multor probe în rulările anterioare.



Asigurați-vă că ați scos capacele de pe flacoane înainte de a le așeza pe masa de lucru.



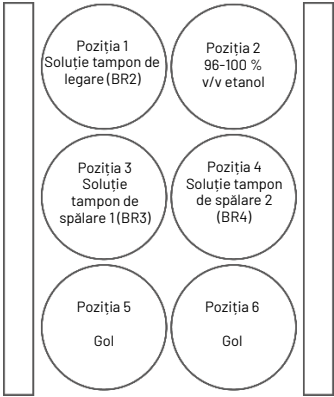
Volumele de soluții tampon furnizate în PAXgene Blood RNA Kit (50) sunt suficiente pentru maximum 7 rulări de preparare a ARN-ului pe QIAcube Connect MDx cu 2 până la 12 probe per rulare. În general, rulările cu un număr mic de probe per rulare ar trebui evitate pentru procesarea unui total de 50 de probe per kit. Mai mult de 7 rulări de preparare a ARN-ului pot duce la volume insuficiente de soluții tampon pentru procesarea ultimelor probe.

Tabelul 3: Poziții în suportul pentru flacoane de reactivi

Poziție	Reactiv
1	Soluție tampon de legare (BR2)
2	Etanol (96–100 % v/v)
3	Soluție tampon de spălare 1 (BR3)
4	Soluție tampon de spălare 2 (BR4)*
5	– (lăsați gol)
6	– (lăsați gol)

* Soluția tampon de spălare 2 (BR4) este furnizată sub formă de concentrat. Înainte de prima utilizare, adăugați 4 volume de etanol (96–100 % v/v, grad de puritate p.a.) așa cum este indicat pe flacon pentru a obține o soluție de lucru.

A



B



Figura 17: Încărcarea suportului pentru flacoane de reactivi. [A] Schemă a pozițiilor și conținutului flacoanelor în suportul pentru flacoane de reactivi. [B] Încărcarea suportului pe QIAcube Connect MDx.

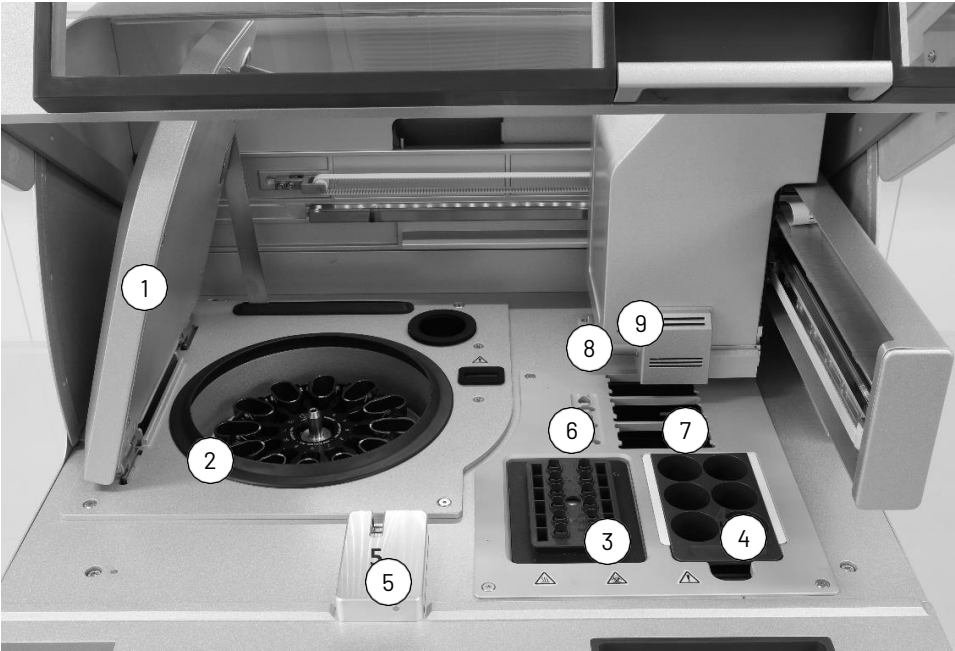


Figura 18: Vedere în interior a QIAcube Connect MDx.

- | | | | |
|---|--------------------------------------|---|--|
| 1 | Capac centrifugă | 6 | Fante pentru MCT |
| 2 | Centrifugă | 7 | 3 fante pentru suporturi pentru vârfuri |
| 3 | Agitator | 8 | Fante de eliminare pentru vârfuri și coloane |
| 4 | Suport pentru flacoane de reactivi | 9 | Braț robotizat (include cap de pipetare cu 1 canal, graifâr, senzor cu ultrasunete și optic și LED UV) |
| 5 | Senzor de vârf și blocarea capacului | | |

Coloane rotative (PSC, PRC), MCT și componente din plastic QIAcube Connect MDx

Așezați 2 suporturi pentru vârfuri umplute cu vârfuri cu filtru de 1000 μ l pe QIAcube Connect MDx (consultați Figura 18, pagina 65). Reumpleți suporturile cu vârfuri atunci când este necesar.



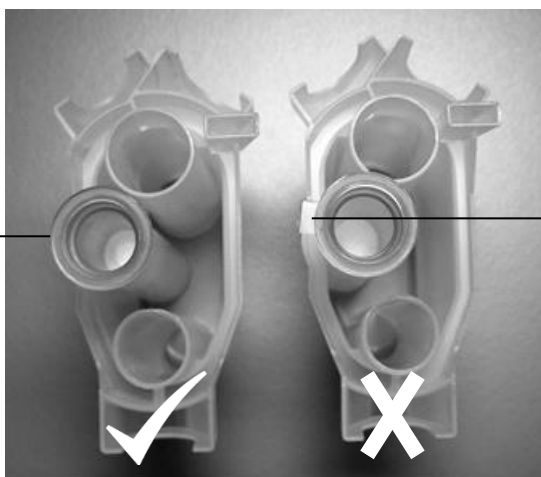
Folosiți doar vârfuri cu filtru de 1000 μ l concepute pentru utilizarea cu QIAcube Connect MDx.

Etichetați adaptoarele rotorului și MCT-ul pentru fiecare probă folosind un marker permanent. Deschideți PSC-ul care urmează să fie utilizat și tăiați complet capacul folosind o foarfecă (consultați Figura 19).



Pentru funcționarea corectă a graifărilor robotizate QIAcube Connect MDx, îndepărtați complet (tăiați) capacele și toate piesele din plastic care conectează capacul de PSC (consultați Figura 19). În caz contrar, graifărilor robotizate nu poate prinde corect PSC-ul.

Capacul coloanei a fost scos corect din PSC.



Capacul coloanei a fost scos incorect. O parte din capac este încă atașată de PSC.

Figura 19: Încărcarea PSC. PSC-ul este încărcat în poziția din mijloc a adaptorului rotorului. Tăiați capacul PSC înainte de încărcarea coloanei.

Încărcați PSC-ul (fără capac, consultați Figura 19, pagina 67), PRC și MCT etichetat în pozițiile corespunzătoare din fiecare adaptor de rotor etichetat, așa cum se arată în Tabelul 4 și Figura 20.

 Asigurați-vă că toate capacele coloanei rotative (PRC) și MCT sunt împinse complet în jos, până la fundul fantelor de la marginea adaptorului rotorului, în caz contrar, capacele se vor rupe în timpul centrifugării.

Tabelul 4: Consumabile din plastic în adaptorul rotorului

Poziție	Reactiv	Poziția capacului
1	Coloană rotativă PAXgene ARN (roșie, PRC)	L1
2	Coloană rotativă PAXgene Shredder (lila, PSC) (tăiați capacul înainte de a-l introduce în adaptorul rotorului)	–
3	MCT*	L3

* Utilizați MCT-ul (1,5 ml) inclus în PAXgene Blood RNA Kit.

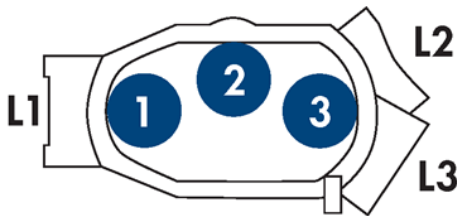


Figura 20: Poziții în adaptorul rotorului. Adaptorul rotorului are 3 poziții pentru tuburi (1–3) și trei poziții pentru capace (L1–L3).

Încărcarea centrifugei

Încărcați adaptoarele de rotor asamblate în cupele centrifugei QIAcube Connect MDx, așa cum se arată în Figura 21 dedesubt.



Dacă procesați mai puțin de 12 probe, asigurați-vă că încărcați rotorul centrifugei echilibrat radial (consultați Figura 22, pagina 69). Toate cupele centrifugei trebuie montate înainte de începerea unei rulări de protocol, chiar dacă trebuie procesate mai puțin de 12 probe. Nu se poate procesa o singură probă (una) sau 11 probe.

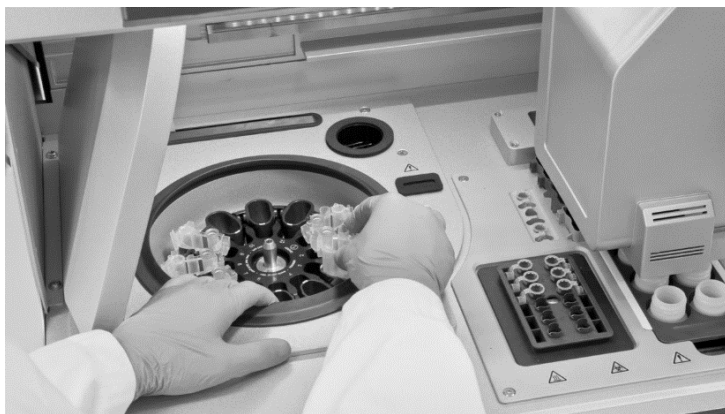


Figura 21: Încărcarea centrifugei pe QIAcube Connect MDx. Încărcați adaptoarele de rotor asamblate în cupele centrifugei.

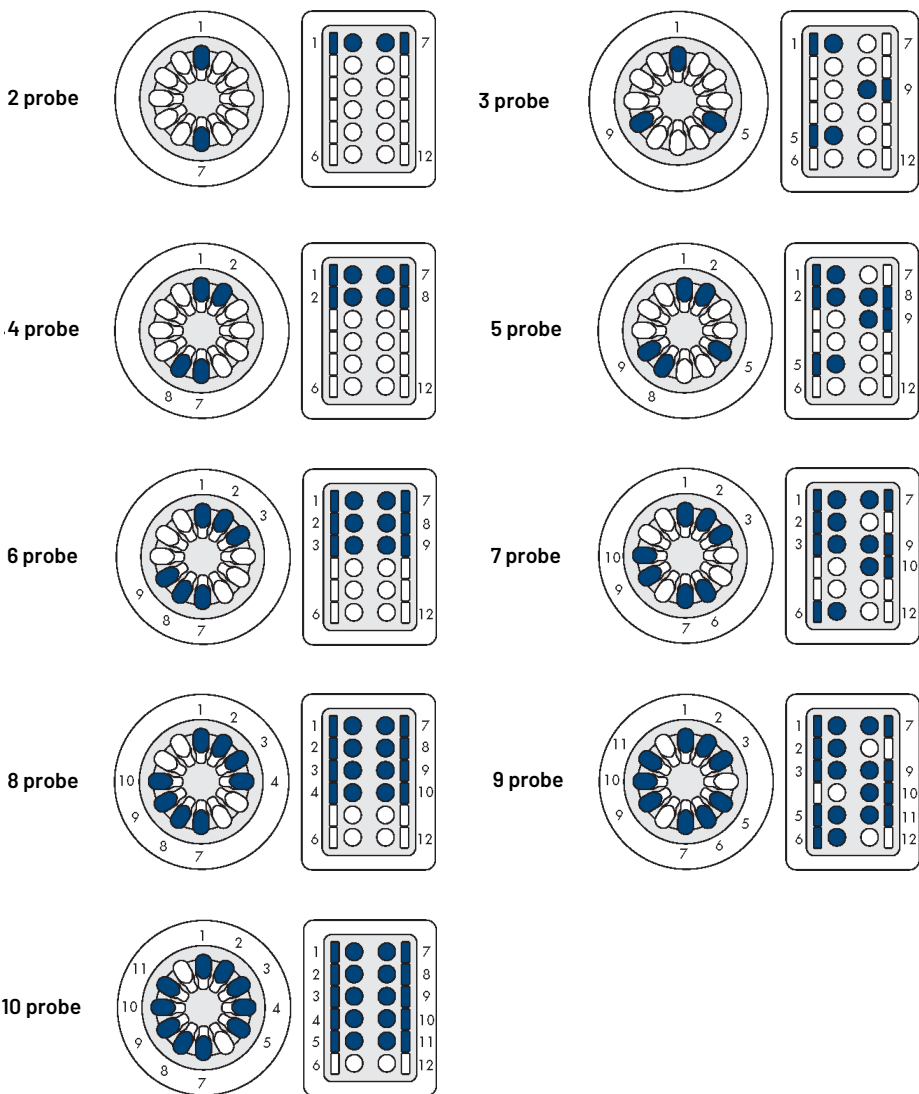


Figura 22: Încărcarea centrifugei și a agitatorului. Pozițiile centrifugei și ale agitatorului sunt indicate pentru procesarea a două (2) până la zece (10) probe. Una (1) sau 11 probe nu pot fi procesate. Pentru procesarea a 12 probe, toate pozițiile centrifugei și ale agitatorului sunt încărcate (imaginea nu este afișată).

Tub de procesare

Îndepărtați orice PT-uri rămase în fantele MCT din rulările anterioare (consultați Figura 18, pagina 65). Umpleți 3 PT-uri cu cantitatea de reactivi indicată în Tabelul 5 în funcție de numărul de probe din rulare.

Pentru amestecul de incubare pentru DNază I, pipetați volumul indicat de soluție tampon de digerare a ADN-ului (RDD) într-un PT și adăugați volumul indicat de soluție standard de DNază I (RNFD). Amestecați pipetând ușor întregul amestec în sus și în jos de 3 ori, folosind un vârf de pipetă de 1000 µl.



Utilizați PT-urile de 2 ml incluse în PAXgene Blood RNA Kit. Etichetați clar tuburile cu denumirile reactivilor și plasați-le în poziția corespunzătoare în fantele MCT, așa cum este indicat în Tabelul 6 (pagina 67).



DNaza I (RNFD) este deosebit de sensibilă la denaturarea fizică. Amestecați doar prin pipetare, folosind vârfuri de pipetă cu diametru larg pentru a reduce probabilitatea de retezare. Nu agitați în agitatorul vortex.

Asigurați-vă că pipetați doar volumul necesar, așa cum este indicat în Tabelul 5 de mai jos.

Tabelul 5: Volumul de reactivi necesar în PT-uri pentru fantele MCT

Numărul de probe	Volumul de reactiv pentru numărul indicat de probe (µl)		
	Proteinază K (PK)	Amestec de incubare DNază I	Soluție tampon de eluție (BR5)
2	126	187 (23 DNază I + 164 soluție tampon RDD)	313
3	170	261 (33 DNază I + 228 soluție tampon RDD)	399
4	213	334 (42 DNază I + 292 soluție tampon RDD)	486
5	256	407 (51 DNază I + 356 soluție tampon RDD)	572
6	299	481 (60 DNază I + 421 soluție tampon RDD)	658
7	342	554 (69 DNază I + 485 soluție tampon RDD)	745
8	386	627 (78 DNază I + 549 soluție tampon RDD)	831
9	429	701 (88 DNază I + 613 soluție tampon RDD)	918
10	472	775 (97 DNază I + 678 soluție tampon RDD)	1004
12	558	921 (115 DNază I + 806 soluție tampon RDD)	1177

Tabelul 6: Fante pentru MCT

	Poziție		
	A	B	C
Conținut	Proteinază K	Amestec de incubare DNază I	Soluție tampon de eluție (BR5)
Recipient	Tub de procesare*	Tub de procesare*	Tub de procesare*

* Utilizați PT-urile de 2 ml incluse în PAXgene Blood RNA Kit.

Eliminare

Pentru eliminarea în siguranță după recoltarea eșantioanelor și izolarea manuală a ARN-ului, consultați informațiile de siguranță și precauțiile de la paginile 18 și, respectiv, 19.

În plus, pentru izolarea automată a ARN-ului folosind QIAcube Connect MDx, consultați Figura 21 și Figura 22, paginile 68 și, respectiv, 69, indicând fantele dedicate pentru vârfuri și coloane utilizate pentru eliminare.

Referințe

Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S, Wyrich R, Ballas C, Schram J, Herdman C, Bankaitis-Davis D, Nicholls N, Trollinger D, Tryon V (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. 48, 1883-90.

Sambrook J and Russell D W (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Organizația Internațională de Standardizare (2019) Examinări de diagnosticare moleculară în vitro. Specificații pentru procesele de examinare preliminară pentru sânge integral venos. Partea 1: ARN celular izolat (standardul ISO nr. 20186-1:2019).

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.

Ghid de depanare

Acest ghid de depanare poate fi util pentru rezolvarea oricăror probleme care pot apărea. Pentru informații suplimentare, consultați pagina Întrebări frecvente din cadrul Centrului nostru pentru asistență tehnică: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Cercetătorii din cadrul Serviciilor Tehnice QIAGEN vă stau întotdeauna la dispoziție pentru a răspunde la orice întrebări pe care le aveți despre informațiile și protocoalele din acest manual sau probă, precum și despre tehnologiile de prelevare și testare (pentru datele de contact, consultați ultima pagină sau vizitați www.qiagen.com).

Comentarii și sugestii	
ARN degradat	
a) Contaminarea cu RNază	 Aveți grijă să nu introduceți RNaze în reactivi în timpul procedurii sau al manipulării ulterioare (consultați Anexa A, pagina 79).
Rezultat ARN slab	
b) Mai puțin de 2,5 ml de sânge recoltat în PAXgene Blood RNA Tube (BRT)	 Asigurați-vă că se recoltează 2,5 ml de sânge în PAXgene Blood RNA Tube (BRT; consultați <i>Manualul PAXgene Blood RNA Tube</i>)
c) Concentrația de ARN măsurată în apă	 ARN-ul trebuie diluat în 10 mM Tris-HCl, pH 7,5* pentru o cuantificare precisă (consultați Anexa B, pagina 81).
d) Reziduuri celulare transferate în PRC în etapele 9 și 10 ale protocolului manual	 Evitați transferul particulelor mari la pipetarea lichidului supernatant în etapa 7 a protocolului manual (transferul de reziduuri mici nu va afecta procedura).
e) Lichidul supernatant nu a fost îndepărtat complet în etapa 3	 Asigurați-vă că întregul lichid supernatant este îndepărtat. Dacă lichidul supernatant este decantat, îndepărtați picăturile de pe marginea PAXgene Blood RNA Tube (BRT) prin tamponare pe un prosop de hârtie. Luați măsurile de precauție adecvate pentru a preveni contaminarea încrucișată.

* Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvați. Pentru informații suplimentare, consultați fișele cu date de securitate (Safety Data Sheets, SDS) corespunzătoare, disponibile de la furnizorul produsului.

Comentarii și sugestii	
f) După recoltarea în PAXgene Blood RNA Tube (BRT), sângele este incubat timp de mai puțin de 2 ore	 Incubați sângele în PAXgene Blood RNA Tube (BRT) timp de cel puțin 2 ore după recoltare.
Valoare A_{260}/A_{280} scăzută	
g) Apa utilizată pentru diluarea ARN-ului pentru măsurarea A_{260}/A_{280}	 Folosiți 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 pentru a dilua ARN-ul înainte de măsurarea purității.* (consultați Anexa B, pagina 81).
h) Spectrofotometrul nu este adus corect la zero	 Aduceți la zero spectrofotometrul folosind un blank constând din aceeași proporție de soluție tampon de eluție (BR5) și 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, ca și în probele care urmează să fie măsurate. Soluția tampon pentru eluție (BR5) are o absorbanță ridicată la 220 nm, ceea ce poate genera niveluri mari ale absorbției în fundal, dacă spectrofotometrul nu este adus la zero în mod corespunzător.
Defecțiune a instrumentului	
i) QIAcube Connect MDx nu a funcționat corect	Citiți <i>Manualul de utilizare QIAcube Connect MDx</i> , acordând o atenție deosebită secțiunii Depanarea. Asigurați-vă că instrumentul este întreținut corespunzător, așa cum este descris în manualul de utilizare.

* 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.

Simboluri

În instrucțiunile de utilizare sau pe ambalaj și pe etichete pot apărea următoarele simboluri. Simbolurile suplimentare sunt explicate în Conținutul kitului (pagina 6).

Simbol	Definiția simbolului
V<N1>	Versiunea <N1> a produsului
 <N2>	Conține reactivi suficienți pentru <N2> testări
	Consultați instrucțiunile de utilizare
	Data de expirare
IVD	Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro
REF	Număr de catalog
LOT	Număr de lot
MAT	Număr material
COMP	Componente
NUM	Număr
KU	Unități Kunitz
ADD	Adăugare
CONT	Conține
RCNS	Standardul
DNase	Dezoxiribonuclează I

EtOH

Etanol

GITC

Izotiocianat de guanidină

RNase-Free DNase Set

Set de DNază fără RNază

GTIN

Numărul global de articol comercial (GTIN)



Limită de temperatură



Limita superioară de temperatură



Producător

EC **REP**

Reprezentanță europeană autorizată, în conformitate cu Regulamentul (UE) 2017/746



Notă importantă



Adăugarea de etanol



Marcaj CE. Acest produs îndeplinește cerințele Regulamentului (UE) 2017/746 privind dispozitivele medicale pentru diagnostic in vitro.

UDI

Identificator unic dispozitiv



Atenție



AVERTISMENT: Suprafață fierbinte

Date de contact

În cadrul QIAGEN, respectăm standarde înalte în ceea ce privește calitatea și disponibilitatea asistenței tehnice. Departamentele noastre de Servicii tehnice sunt formate din cercetători cu experiență având cunoștințe practice și teoretice extensive în domeniul biologiei moleculare și al utilizării produselor PreAnalytiX. Dacă aveți întrebări despre PAXgene Blood RNA Kit, nu ezitați să ne contactați.

Pentru asistență tehnică și informații suplimentare, consultați Centrul nostru pentru asistență tehnică la adresa **www.qiagen.com/Support**, apălați numărul de telefon 00800-22-44-6000 sau contactați Departamentele de Servicii tehnice ale QIAGEN sau distribuitorii locali (consultați coperta a patra sau vizitați **www.qiagen.com**).

Anexa A: Observații generale privind manipularea ARN

Manipularea ARN-ului



Ribonucleazele (RN-aze) sunt enzime foarte stabile și active care, în general, nu au nevoie de cofactori pentru a funcționa. Deoarece RNazele sunt dificil de inactivat, iar pentru degradarea ARN-ului sunt suficiente cantități infime, nu utilizați nici un material din plastic sau sticlă fără a elimina mai întâi o posibilă contaminare cu RNaze. Trebuie să acționați cu mare grijă pentru a evita introducerea din greșeală a RNazelor în proba de ARN în timpul sau după procedura de izolare. Pentru a crea și a menține un mediu lipsit de RNaze, trebuie luate măsuri de precauție în timpul pretratării și al utilizării recipientelor și soluțiilor (de unică folosință sau nu) atunci când se lucrează cu ARN.

Manipularea generală



Atunci când se lucrează cu ARN, trebuie să se utilizeze întotdeauna o tehnică microbiologică aseptică adecvată. Măinile și particulele de praf sunt purtătoare de bacterii și mușcături și sunt cele mai frecvente surse de contaminare cu RNaze. Purtați întotdeauna mănuși de latex sau de vinil în timpul manipulării reactivilor și a probelor de ARN pentru a preveni contaminarea cu RN-aze de la suprafața pielii sau de la echipamentul de laborator prăfuit. Schimbați frecvent mănușile și țineți eprubetele închise ori de câte ori este posibil. Păstrați ARN purificat pe gheață atunci când părțile alicote sunt pipetate pentru aplicații în aval.

Protocoalele pentru îndepărtarea contaminării cu RNază din materialele din sticlă și soluții pot fi găsite în ghiduri generale de biologie moleculară, cum ar fi Sambrook, J.

and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Anexa B: Cuantificarea și determinarea calității ARN-ului total

Cuantificarea ARN-ului

Concentrația ARN-ului trebuie determinată prin măsurarea absorbantei la 260 nm (A_{260}) într-un spectrofotometru. Pentru a asigura semnificația, citirile trebuie să fie în intervalul liniar al spectrofotometrului. O absorbanță de 1 unitate la 260 nm corespunde la 44 µg de ARN per ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$). Această relație este valabilă numai pentru măsurători în 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.* Prin urmare, dacă este necesar să se dilueze proba de ARN, acest lucru trebuie făcut în 10 mM Tris-HCl. După cum se discută mai jos (consultați „Puritatea ARN-ului”, pagina 82), raportul dintre valorile absorbantei la 260 și 280 nm oferă o estimare a purității ARN-ului. Când măsurați probe de ARN, asigurați-vă că în cuvete nu există RNază. Aduceți la zero spectrofotometrul folosind un blank constând din aceeași proporție de soluție tampon de eluție (BR5) și soluție tampon Tris-HCl ca și în probele care urmează să fie măsurate. Soluția tampon pentru eluție (BR5) are o absorbanță ridicată la 220 nm, ceea ce poate genera niveluri mari ale absorbantei în fundal, dacă spectrofotometrul nu este adus la zero în mod corespunzător. Un exemplu de calcul implicat în cuantificarea ARN-ului este prezentat mai jos.

Volumul probei de ARN	=	80 µl
Diluție (1/15)	=	10 µl de probă de ARN + 140 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Măsurați absorbanta probei diluate într-o cuvetă (fără RNază).		
A_{260}	=	0,3
Concentrația probei	=	$44 \times A_{260} \times \text{factor de diluție}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 µg/ml
Rezultat total	=	concentrație × volumul probei în mililitri

* Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvați. Pentru informații suplimentare, consultați fișele cu date de securitate (Safety Data Sheets, SDS) corespunzătoare, disponibile de la furnizorul produsului.

$$= 198 \mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml}$$

$$= 15,8 \mu\text{g ARN}$$

Puritatea ARN-ului

Raportul dintre citirile la 260 și 280 nm (A_{260}/A_{280}) oferă o estimare a purității ARN-ului în raport cu contaminanții absorbiți în UV, cum ar fi proteinele. Totuși, raportul A_{260}/A_{280} este influențat considerabil de pH. Un pH mai scăzut are ca rezultat un raport A_{260}/A_{280} mai mic și o sensibilitate redusă la contaminarea cu proteine.* Pentru valori precise, se recomandă măsurarea absorbantei în 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. ARN-ul pur are un raport A_{260}/A_{280} de 1,8-2,2 în 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Aduceți la zero spectrofotometrul folosind un blank constând din aceeași proporție de soluție tampon de eluție (BR5) și soluție tampon Tris-HCl ca și în probele care urmează să fie măsurate. Soluția tampon pentru eluție (BR5) are o absorbantă ridicată la 220 nm, ceea ce poate genera niveluri mari ale absorbantei în fundal, dacă spectrofotometrul nu este adus la zero în mod corespunzător.

* 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.

Anexa C: Manipularea tuburilor PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Următoarele recomandări de la BD pot fi utile la manipularea tuburilor PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Consultați *Manualul PAXgene Blood RNA Tube* pentru mai multe informații despre tuburile PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Instrucțiuni pentru îndepărtarea capacului BD Hemogard

1. Prindeți PAXgene Blood RNA Tube (BRT) cu o mână, plasând degetul mare sub capacul BD Hemogard. (Pentru o stabilitate sporită, așezați brațul pe o suprafață solidă.) Cu cealaltă mână, răsușiți capacul BD Hemogard, împingând simultan în sus doar cu degetul mare al celeilalte mâini, până când dopul tubului este slăbit.
2. Îndepărtați degetul mare înainte să ridicați capacul. Nu folosiți degetul mare pentru a împinge capacul de pe PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Atenție: Dacă PAXgene Blood RNA Tube (BRT) conține sânge, există un risc de expunere. Pentru a preveni accidentarea în timpul îndepărtării capacului, este important ca degetul mare folosit pentru a împinge în sus capacul să nu mai intre în contact cu PAXgene Blood RNA Tube (BRT) imediat ce capacul BD Hemogard este slăbit.
3. Ridicați capacul de pe PAXgene Blood RNA Tube (BRT). În cazul puțin probabil în care protecția din plastic se desprinde de dopul de cauciuc, nu puneți capacul la loc. Îndepărtați cu grijă dopul de cauciuc de pe PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Instrucțiuni pentru inserarea capacului secundar BD Hemogard

1. Puneți la loc capacul peste PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Răsuciți și împingeți ferm în jos până când dopul este așezat complet. Reintroducerea completă a dopului este necesară pentru fixarea în siguranță a capacului pe PAXgene Blood RNA Tube (BRT) în timpul manipulării.

Informații pentru comandă

Produs	Cuprins	Nr. cat.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 de coloane rotative PAXgene, 50 de coloane rotative Shredder, tuburi de procesare, DNază I fără RNază, reactivi și soluții tampon fără RNază. A se utiliza împreună cu tuburile PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 de tuburi de recoltare a sângelui	762165
Produse similare care pot fi comandate de la QIAGEN pentru izolarea automată a ARN-ului pe QIAcube		
Starter Pack, QIAcube	Pachetul include: suporturi pentru flacoane de reactivi (3); benzi de etichetare a suportului (8); vârfuri cu filtru de 200 µl (1024); Vârfuri cu filtru de 1000 µl (1024); vârfuri cu filtru de 1000 µl, cu diametru larg (1024); flacoane de reactivi de 30 ml (18); adaptoare de rotor (240); suport pentru adaptorul rotorului	990395
Filter-Tips, 1000 µL (1024)	Vârfuri cu filtru sterile, de unică folosință, pe suport	990352
Reagent Bottles, 30 mL (6)	Flacoane de reactivi (30 ml) cu capace; pachet de 6; pentru utilizare cu suportul pentru flacoane de reactivi QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 × 24)	Pentru 240 de preparări: 240 de adaptoare de rotor de unică folosință; pentru utilizare cu QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Suport pentru 6 flacoane de reactivi de 30 ml pe masa de lucru QIAcube	9026197
Rotor Adapter Holder	Suport pentru 12 adaptoare de rotor de unică folosință; pentru utilizare cu QIAcube	990392
Produse similare care pot fi comandate de la BD pentru recoltarea sângelui cu tuburi PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)*		
BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set	Ac 21G, 0,75 inch (0,8 × 19 mm), tub de 12 inch (305 mm) cu adaptor luer; 50 per cutie, 200 per lădiță	367286/ 367281

Produs	Cuprins	Nr. cat.
BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set	Ac 21G 3/4 inch (0,8 × 19 mm), tub de 12 inch (305 mm) cu adaptor luer. 50/cutie, 200/lădiță	367344
BD Vacutainer One-Use Holder	Numai lădiță pentru diametre de 13 mm și 16 mm; 1000/lădiță	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	Recipient de 13 × 75 mm, 4,0 ml, cu capac BD Hemogard roșu și etichetă de hârtie; 100/cutie, 1000/lădiță	368975/ 367812
BD Vacutainer EST Tube	Recipient de 13 × 75 mm 3,0 ml cu capac BD Hemogard transparent și etichetă transparentă; 100/cutie, 1000/lădiță	362725
BD Vacutainer No Additive (Z) Tube	Recipient de 13 × 75 mm, 3,0 ml, cu capac BD Hemogard transparent și etichetă de hârtie; 100/cutie, 1000/lădiță	366703

* Aceste accesorii de recoltare a sângelui reprezintă produse tipice care pot fi utilizate cu tuburile PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Pentru a afla mai multe despre aceste accesorii, inclusiv despre cum să le comandați, vizitați www.preanalytix.com.

Istoricul revizuirilor documentului

Data	Modificări
[R1] aprilie 2022	Ediție IVDR inițială
[R2] februarie 2023	Adresa PreAnalytiX GmbH s-a schimbat din „Feldbachstrasse” în „Garstligweg 8”. Produse BD adăugate în Informații pentru comandă. Informații de siguranță actualizate.

Note



Pentru informații actualizate privind licențele și clauzele de declinare a răspunderii specifice produselor, consultați ghidul sau manualul de utilizare al kitului PreAnalytiX sau QIAGEN respectiv. Ghidurile și manualele de utilizare ale kiturilor PreAnalytiX și QIAGEN sunt disponibile la adresele www.preanalytix.com și www.qiagen.com sau pot fi solicitate de la Serviciile tehnice QIAGEN sau distribuitorul dvs. local.

Better samples
More to explore

 **PreAnalytiX**
A QIAGEN / BD Company

Explorați mai multe la: www.preanalytix.com

HB-3009-002 02/2023

