

TECHNISCHES HANDBUCH

Maxwell® CSC DNA FFPE Kit

Gebrauchsanweisung für das Produkt
AS1350

Achtung: Kartuschen vorsichtig handhaben. Folienversiegelungen können scharfkantig sein.



GEBRAUCHSANWEISUNG
FÜR DAS PRODUKT
AS1350



PROMEGA
2800 Woods Hollow Rd.
Madison, WI USA



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Deutschland

Maxwell® CSC DNA FFPE Kit

Die gesamte technische Literatur ist unter folgender Adresse erhältlich: www.promega.com/protocols/

Rufen Sie diese Website auf. Dort finden Sie die jeweils aktuelle Version dieses technischen Handbuchs.

Schreiben Sie eine E-Mail an Promega Technical Services, falls Sie Fragen zur Verwendung dieses Systems haben.

Die E-Mail-Adresse lautet: techserv@promega.com

1. Beschreibung.....	2
2. Produktkomponenten, Lagerbedingungen und Symbolerklärung	3
3. Verwendungszweck des Produkts	5
4. Anwendungstechnische Grenzen des Produkts	5
5. Bevor Sie beginnen.....	6
5.A. Vorbereitung von FFPE-Proben	6
5.B. Vorbereitung der Maxwell® CSC DNA FFPE Cartridges	7
6. Gerätelauf	9
7. Nach der Aufreinigung.....	11
8. Evaluierung der analytischen Leistung	11
8.A. Amplifizierbarkeit	12
8.B. Reproduzierbarkeit	15
8.C. Inhibition (Interferierende Stoffe)	17
8.D. Kreuzkontamination	17
9. Evaluierung der klinischen Leistung	18
9.A. Amplifizierbarkeit der DNA	18
9.B. Reproduzierbarkeit	19
9.C. Kreuzkontamination	19
10. Fehlerbehebung	20
11. Literaturhinweis	21
12. Verwandte Produkte.....	21
13. Änderungsübersicht	22

Das Maxwell® CSC DNA FFPE Kit ist nur in bestimmten Ländern erhältlich.

1. Beschreibung

Das Maxwell® CSC DNA FFPE Kit^(a) kommt in Verbindung mit den Maxwell® Instruments gemäß Tabelle 1 zum Einsatz und bietet eine einfache Methode zur effizienten, automatisierten Aufreinigung genomerischer DNA (gDNA) aus FFPE-Gewebepröben (formalinfixiert, in Paraffin eingebettet). Die Maxwell® CSC Instruments wurden im Sinne maximaler Einfachheit und Zweckdienlichkeit für den Einsatz mit vorbereiteten Reagenzien-Kartuschen und zusätzlich mitgelieferten Reagenzien mit vorprogrammierten Aufreinigungsverfahren entwickelt. Die Maxwell® CSC Instruments können in ca. 45 Minuten eine bis maximal die zulässige Anzahl von Proben verarbeiten, und die aufgereinigte DNA kann direkt in amplifikationsbasierten Folge-Assays, wie z. B. PCR, verwendet werden.

Tabelle 1. Unterstützte Geräte.

Gerät	Cat.#	Technisches Handbuch
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

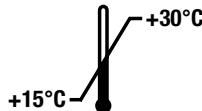
Prinzip der Methode: Das Maxwell® CSC DNA FFPE Kit reinigt Nukleinsäure mithilfe paramagnetischer Partikel auf, die für eine mobile feste Phase sorgen, mit der die gDNA optimal aus der Probe gewonnen, gewaschen und aufgereinigt wird. Die Maxwell® CSC Instruments sind Geräte zur magnetischen Partikel-handhabung. Dieses System ermöglicht eine effiziente Bindung der gDNA an die paramagnetischen Partikel in der ersten Kammer einer vorgefüllten Kartusche, bewegt die Probe durch die Kammern der Kartusche weiter. Durch diesen Ansatz magnetischer Bindung werden häufig auftretende Probleme, wie z. B. verstopfte Spitzen oder Teilübertragungen von Reagenzien, vermieden, die bei anderen häufig verwendeten automatisierten Systemen zu einem suboptimalen Aufreinigungsprozess führen.

Berücksichtigungen für die Probe: Die Aufreinigung der DNA von FFPE-Proben kann aufgrund von Gewebeeigenschaften wie Fibrosität, Lipidzusammensetzung, Nukleaseanteilen und der Zellanzahl, die im Gewebschnitt verfügbar ist, problematisch sein. Darauf hinaus hat die unterschiedliche Behandlung des Gewebes vor und während der Fixierung, einschließlich der Dauer, für die das Gewebe während der Gewebefixierung Formalin ausgesetzt wird, großen Einfluss auf den Grad der Vernetzung und Fragmentierung der Nukleinsäuren im FFPE-Gewebe. Alle diese Merkmale können die Qualität und die Menge der amplifizierbaren Nukleinsäuren beeinflussen, die aus den FFPE-Gewebschnitten aufgereinigt werden können. Während der Entwicklung wurde das Maxwell® CSC DNA FFPE Kit mit unterschiedlichen menschlichen FFPE-Gewebetypen und -formaten (z. B. FFPE-Gewebschnitte auf Objektträgern vs. Curls) beurteilt, um eine optimale Aufreinigung der verfügbaren amplifizierbaren DNA sicherzustellen.

2. Produktkomponenten, Lagerbedingungen und Symbolerklärung

PRODUKT	GRÖSSE	CAT.#
Maxwell® CSC DNA FFPE Kit	48 Präparationen	AS1350

Für den Einsatz in der In-vitro-Diagnostik. Verwendung nur durch Fachpersonal. Ausreichend für 48 automatisierte Isolationen aus FFPE-Proben. Die Maxwell® FFPE Cartridges sind nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt.



Beinhaltet:

- 25 ml Mineralöl
- 20 ml Lyse-Pufferlösung
- 2 × 1 ml Proteinase K (PK)
- 100 µl Blauer Farbstoff
- 1 ml RNase A
- 48 Maxwell® FFPE Cartridges
- 50 CSC/RSC-Stößel
- 50 Elutions-Gefäße (0,5 ml)
- 25 ml Nuclease-Free Water

Lagerbedingungen: Lagern Sie das Maxwell® CSC DNA FFPE Kit bei +15 °C bis +30 °C.



Sicherheitshinweise: Die Kartuschen enthalten Ethanol und Isopropanol. Diese Substanzen gelten als entflammbar, schädlich und reizend.



Die Komponenten des Maxwell® CSC DNA FFPE Kit sind für die Verwendung mit potenziell infektiösen Substanzen konzipiert. Bei der Handhabung potenziell infektiöser Substanzen ist angemessene Schutzkleidung (z. B. Handschuhe und Schutzbrille) zu tragen. Beim Umgang mit allen potenziell infektiösen Substanzen in Verbindung mit diesem System und bei deren Entsorgung befolgen Sie die Richtlinien Ihres Instituts.

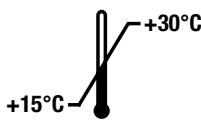


Achtung: Kartuschen vorsichtig handhaben. Folienversiegelungen können scharfkantig sein.

Weitere Informationen: Die Komponenten des Maxwell® CSC DNA FFPE Kit sind für den gemeinsamen Gebrauch geeignet und haben eine Qualitätskontrollprüfung durchlaufen. Es wird nicht empfohlen, Kit-Komponenten verschiedener Chargen miteinander zu vermischen. Verwenden Sie nur die in dem Kit enthaltenen Komponenten. Kartuschen nicht verwenden, wenn die Kartuschenversiegelung bei Erhalt nicht intakt ist.

2. Produktkomponenten, Lagerbedingungen und Symbolerklärung (Fortsetzung)

Erklärung der Symbole

Symbol	Erklärung	Symbol	Erklärung
IVD	In-vitro-Diagnostikum	EC REP	Bevollmächtigter
	Bei +15 °C bis +30 °C aufbewahren.	 PROMEGA 2800 Woods Hollow Rd. Madison, WI USA	Hersteller
	Achtung		Reizend
	Gesundheitsrisiko		Ausreichend für „n“ Tests
	Europäische Konformität		Warnung. Biogefahr.
	Warnung. Quetschgefahr.	REF	Bestellnummer
LOT	Chargennummer		Nicht zur Wiederverwendung

3. Verwendungszweck des Produkts

Das Maxwell® CSC DNA FFPE Kit ist für den Einsatz in Verbindung mit den Maxwell® CSC Instruments und dem Maxwell® CSC DNA FFPE-Aufreinigungsverfahren als medizinisches Gerät für die In-vitro-Diagnostik (IVD) zur automatisierten Isolation von DNA aus formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE-)Gewebeproben bestimmt. Die aufgereinigte DNA ist für den Einsatz in auf Amplifikation basierenden In-vitro-Diagnostik-Assays geeignet.

Das Maxwell® CSC DNA FFPE Kit ist für den Einsatz bei Temperaturen zwischen 15 °C und 30 °C bestimmt. Der Einsatz außerhalb dieses Temperaturbereichs kann zu suboptimalen Ergebnissen führen.

Für den Einsatz mit dem Maxwell® CSC DNA FFPE Kit eignen sich FFPE-Proben, die unter Verwendung von 10%igem neutral gepuffertem Formalin zubereitet wurden.

Das Maxwell® CSC DNA FFPE Kit ist ausschließlich zur Verwendung durch Fachpersonal bestimmt. Diagnos-tische Ergebnisse, die aus DNA gewonnen werden, die mit diesem Gerät aufgereinigt wurde, müssen in Verbindung mit anderen Klinik- oder Labordaten ausgewertet werden.

4. Anwendungstechnische Grenzen des Produkts

Das Maxwell® CSC DNA FFPE Kit ist nur für den Einsatz mit FFPE-Gewebeproben bestimmt. Es ist nicht für den Einsatz mit anderen Proben als FFPE-Gewebeproben wie frischen oder gefrorenen Gewebeproben bestimmt. Das Maxwell® CSC DNA FFPE Kit ist nicht für den Einsatz mit anderen Arten von Proben, wie z. B. nicht-humanen Proben, oder zur Aufreinigung von RNA bestimmt.

Das Maxwell® CSC DNA FFPE Kit ist nicht für den Einsatz mit Gewebeproben bestimmt, die mit anderen Fixiermitteln als 10%igem neutral gepuffertem Formalin zubereitet wurden.

Die Leistung des Maxwell® CSC DNA FFPE Kit wurde durch Isolation von DNA aus FFPE-Gewebeproben mit einer Größe von 0,02–2,0 mm³ bewertet.

Für die Festlegung von Leistungsmerkmalen, die für spätere Diagnostikanwendungen benötigt werden, ist der Benutzer zuständig. Jede nachfolgende Diagnostikanwendung, bei der mit dem Maxwell® CSC DNA FFPE Kit aufgereinigte genomische DNA verwendet wird, muss geeignete Kontrollen beinhalten.

5. Bevor Sie beginnen

Vom Nutzer beizubringende Materialien

- Mikrozentrifuge
- Pipettierer und Pipettenspitzen für die Vorbereitung der Probenübertragung in die vorgefüllten Reagenzien-Kartuschen
- 1,5–2,0-ml-Röhrchen für die Inkubation der Proben (z. B. Mikroröhrchen, 1,5 ml [Cat.# V1231])
- Heizblöcke, die auf 56 °C und 80 °C eingestellt sind (**Hinweis:** Es werden Heizblöcke, die auf 56 °C und 70 °C eingestellt sind, benötigt, wenn die optionale nächtliche Inkubation durchgeführt wird.)
- FFPE-Proben mit einem Gewebevolumen von bis zu 2,0 mm³ (**Hinweis:** Die Proben müssen bei Raumtemperatur [15–30 °C] gelagert werden.)
- ⚠ • Rasierklingen (**Hinweis:** Beim Abnehmen der Probe vom Objektträger mithilfe von Rasierklingen muss vorsichtig vorgegangen werden.)

5.A. Vorbereitung von FFPE-Proben

Vorverarbeitung von Schnittproben

1. Platzieren Sie den Schnitt in einem 1,5-ml-Mikrozentrifugengefäß. Bei Verwendung von Gewebeaufschnitten auf Objektträgern muss der Schnitt mit einer sauberen Rasierklinge vom Objektträger abgenommen werden.
2. Geben Sie 300 µl Mineralöl zu den Probengefäßen hinzu. 10 Sekunden lang vortexen.
3. Erhitzen Sie die Proben 2 Minuten lang auf 80 °C. Halten Sie die Proben auf Raumtemperatur, während Sie den Master Mix zubereiten.
4. Bereiten Sie aus der Lyse-Pufferlösung, der Proteinase K und dem Blauen Farbstoff, wie nachfolgend gezeigt, einen Master Mix vor.

Reagenz	Volumen/Reaktion	Reaktionen (Laufanzahl + 1)	Insgesamt
Lyse-Pufferlösung	224 µl	n + 1	224 × (n + 1) µl
Proteinase K	25 µl	n + 1	25 × (n + 1) µl
Blauer Farbstoff	1 µl	n + 1	1 × (n + 1) µl

5. Geben Sie zu jedem Probengefäß 250 µl Master Mix hinzu und vortexen Sie die Proben 5 Sekunden lang.
6. Zentrifugieren Sie die Proben 20 Sekunden lang bei 10.000 × g, um die Schichten zu trennen. Wenn in der wässrigen Schicht (untere, blaue Schicht) ein Pellet vorhanden ist, mischen Sie die wässrige Phase vorsichtig mit einer Pipette.
7. Setzen Sie die Probengefäße in den Heizblock von 56 °C und inkubieren Sie sie 30 Minuten lang.

8. Wählen Sie eine der folgenden Inkubationszeiten und -temperaturen:
 - a. **Standardmethode:** Setzen Sie die Probengefäße in den Heizblock von 80 °C und inkubieren Sie sie 4 Stunden lang.
 - b. **Optionale Methode:** Inkubieren Sie die Probe über Nacht 14–18 Stunden bei 70 °C.

Hinweis: Bei geringeren Probeneingabevolumen (unter 0,1 mm³) ist die optionale nächtliche Inkubation bei 70 °C eventuell nicht optimal. Verwenden Sie die Standardmethode von 4 Stunden bei 80 °C, wenn mit der nächtlichen Inkubation keine ausreichende DNA-Konzentration für Volumenproben mit niedriger Eingabe aufgereinigt werden kann.
9. Setzen Sie die Probengefäße auf den Labortisch und warten Sie 5 Minuten, bis sich die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt haben.
10. Geben Sie 10 µl RNase A in die blaue wässrige Phase jedes Probengefäßes. Mischen Sie den Inhalt durch Pipettieren.
11. Inkubieren Sie ihn 5 Minuten lang bei Raumtemperatur (15–30 °C). Bereiten Sie während dieser Inkubation, wie in Abschnitt 5.B beschrieben, die Kartuschen vor.
12. Zentrifugieren Sie ihn 5 Minuten lang bei Höchstgeschwindigkeit in einer Mikrozentrifuge.
13. Übertragen Sie die blaue wässrige Phase mit der DNA sofort in Kammer 1 einer Maxwell® CSC DNA FFPE Cartridge.

5.B. Vorbereitung der Maxwell® CSC DNA FFPE Cartridges

1. Wechseln Sie die Handschuhe, bevor Sie Maxwell® FFPE Cartridges, CSC/RSC-Stößel und Elutions-Gefäße handhaben. Die Kartuschen werden in der oder den Kartuschenhalterung(en) außerhalb des Geräts vorbereitet und die Kartuschenhalterung(en) mit den Kartuschen und Proben zur Aufreinigung in das Gerät gestellt. Platzieren Sie jede Kartusche in der Kartuschenhalterung so, dass Kammer 1 (die größte Kammer in der Kartusche) am weitesten von den Elutions-Gefäßen entfernt ist (Abbildung 2). Drücken Sie die Kartusche nach unten, bis sie an Ort und Stelle einrastet. Vergewissern Sie sich, dass beide Enden der Kartusche vollständig in der Kartuschenhalterung sitzen. Ziehen Sie die Folienversiegelung vorsichtig ab, sodass die gesamte Folie von der Kartusche entfernt wird. Vergewissern Sie sich, dass sämtliches Versiegelungs-Tape und etwaige Kleberückstände von der Kartusche entfernt worden sind.



Achtung: Gehen Sie vorsichtig mit den Kartuschen um. Folienversiegelungen können scharfkantig sein.

2. Platzieren Sie einen Stößel in Kammer 8 jeder Kartusche.
3. Platzieren Sie ein leeres Elutions-Gefäß an die hierfür vorgesehene Position jeder Kartusche in der oder den Kartuschenhalterung(en).

Hinweis: Verwenden Sie nur die Elutions-Gefäße, die im Lieferumfang des Maxwell® CSC DNA FFPE Kits enthalten sind. Andere Elutions-Gefäße sind u. U. nicht mit dem Maxwell® CSC Instrument kompatibel und können die DNA-Aufreinigungsleistung beeinträchtigen.

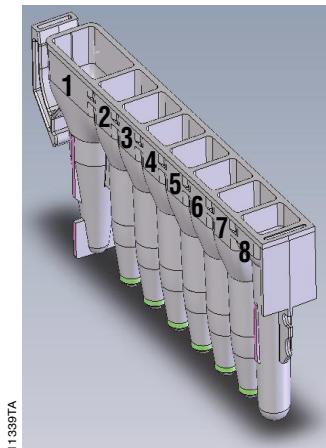
5.B. Vorbereitung der Maxwell® CSC DNA FFPE Cartridges (Fortsetzung)

4. Geben Sie unten in jedes Elutions-Gefäß 50 µl Nuclease-Free Water.

Hinweis: Verwenden Sie nur das im Lieferumfang des Maxwell® CSC DNA FFPE Kit enthaltene Nuclease-Free Water. Die Verwendung anderer Elutions-Pufferlösungen kann die DNA-Aufreinigung beeinträchtigen.

Hinweise zur Vorbereitung der Maxwell® CSC DNA FFPE Cartridges

 Proben- oder Reagenzien spritzer von der gesamten Kartuschenhalterung sind mit einer Lösung aus Wasser und Reinigungsmittel zu reinigen und anschließend mit einem antibakteriellen Spray einzusprühen bzw. abzuwischen und dann mit Wasser abzuwaschen. Verwenden Sie an keinem Teil des Geräts Bleiche.



Vom Benutzer hinzugegebener Kammerinhalt:

1. Vorverarbeitete Probe
8. CSC/RSC-Stößel

Abbildung 1. Maxwell® CSC Cartridge. In Kammer 1 wird eine vorverarbeitete FFPE-Probe gegeben und zu Kammer 8 wird ein Stößel hinzugefügt.



Abbildung 2. Einrichtung und Konfiguration der Kartuschenhalterung. In die Elutions-Gefäße wird, wie angegeben, Nuclease-Free Water gegeben.

6. Gerätelauf

Das Maxwell® CSC DNA FFPE-Verfahren für das Maxwell® CSC Instrument kann von der Promega-Website heruntergeladen werden: www.promega.com/resources/software-firmware/maxwell-maxprep/maxwell-cscsoftware-firmware-methods/. Das Maxwell® CSC DNA FFPE-Verfahren für das Maxwell® CSC 48 Instrument kann von der Promega-Website heruntergeladen werden:

www.promega.com/resources/software-firmware/maxwell-maxprep/maxwell-csc-48-methods/

1. Schalten Sie das Maxwell® Instrument und den Tablet-PC ein. Melden Sie sich bei Ihrem Tablet-PC an und starten Sie die Maxwell® Software im IVD-Modus durch zweimaliges Antippen des Symbols auf dem Desktop. Das Gerät führt einen Selbsttest durch und setzt alle beweglichen Teile zurück.
2. Tippen Sie im Ausgangsbildschirm auf **Start**.
3. Scannen Sie den Barcode auf dem Etikett des Maxwell® CSC DNA FFPE Kit oder geben Sie ihn ein und tippen Sie anschließend auf **OK**, um das auszuführende Verfahren automatisch auszuwählen (Abbildung 3).

Hinweis: Der Verfahrens-Barcode des Maxwell® CSC DNA FFPE Kit wird für die DNA-Aufreinigung auf den Maxwell® CSC Instruments benötigt. Das Etikett des Kits enthält zwei Barcodes. Der Verfahrens-Barcode ist in Abbildung 3 zu sehen. Wenn der Barcode nicht gescannt werden kann, wenden Sie sich bitte an Promega Technical Services.



Abbildung 3. Kit-Etikett mit dem zu scannenden Barcode. Zum Starten eines Aufreinigungslaufs scannen Sie den Barcode in der roten Umrandung oben rechts auf dem Kit-Etikett.

4. Tippen Sie auf dem Bildschirm „Kartuschen-Einrichtung“ auf die Kartuschenpositionen, um für diesen Extraktionslauf Positionen auszuwählen/die Auswahl aufzuheben. Geben Sie ggf. erforderliche Probenverfolgungsinformationen ein und tippen Sie auf die Schaltfläche **Fortsetzen**, um fortzufahren.
- Hinweis:** Bei Verwendung des Maxwell® CSC 48 Instrument müssen Sie die Schaltfläche **Vorderseite** oder **Rückseite** drücken, um die Kartuschenpositionen an jeder Kartuschenhalterung festzulegen oder aufzuheben.
5. Überprüfen Sie, ob nach Öffnen der Tür alle Elemente der Extraktions-Checkliste durchgeführt wurden. Überprüfen Sie, ob die Proben zur Kammer 1 der Kartuschen hinzugegeben wurden, ob die Kartuschen in das Gerät geladen wurden, ob offene Elutions-Gefäße mit Elutions-Pufferlösung vorhanden sind und ob die Stößel in Kammer 8 gesetzt wurden. Setzen Sie die Kartuschenhalterung(en) mit den vorbereiteten Kartuschen in die Maxwell® Instrument-Plattform ein.

6. Gerätelauf (Fortsetzung)

Einsetzen der Maxwell® Kartuschenhalterung: Halten Sie die Kartuschenhalterung an den Seiten fest, damit keine Kartuschen herausfallen. Vergewissern Sie sich, dass die Kartuschenhalterung so in das Maxwell® Instrument eingesetzt wurde, dass die Elutions-Gefäße in nächster Nähe zur Tür stehen. Winkeln Sie die Rückseite der Kartuschenhalterung nach unten ab und setzen Sie sie so in das Gerät, dass die Rückseite der Kartuschenhalterung an der Rückseite der Geräteplattform anliegt. Drücken Sie auf die Vorderseite der Kartuschenhalterung, um sie fest in die Geräteplattform einzusetzen. Falls Sie Schwierigkeiten haben, die Kartuschenhalterung in die Plattform zu setzen, überprüfen Sie, ob sie richtig ausgerichtet ist. Stellen Sie sicher, dass die Kartuschenhalterung sich auf der Geräteplattform befindet und vollständig eingesetzt ist.

Hinweis: An Maxwell® Kartuschenhalterungen mit 24 Positionen müssen Sie die Bezeichnung überprüfen, um festzustellen, ob diese an der Vorder- oder Rückseite des Geräts platziert werden müssen.

6. Vergewissern Sie sich, dass alle angegebenen Vorbereitungsschritte ausgeführt wurden, und tippen Sie auf **Start**, um die Gerätetür zu schließen und die Verarbeitung zu starten.

Hinweis: Bei Verwendung eines Maxwell® Instrument mit 48 Positionen werden die Kartuschenhalterungen gescannt, sobald die Tür sich schließt, falls das Vision System aktiviert wurde. Jegliche Fehler beim Einrichten der Kartuschenhalterung (z. B. Stößel nicht in Kammer 8, Elutions-Gefäße nicht vorhanden und offen) führen dazu, dass die Software zum Bildschirm „Kartuschen-Einrichtung“ zurückkehrt und die problematischen Positionen mit einem Ausrufezeichen in einem roten Kreis gekennzeichnet werden. Sie können durch Berühren des Ausrufezeichens eine Beschreibung des Fehlers aufrufen und alle Fehlerzustände später beheben. Berühren Sie erneut die Schaltfläche **Start**, um den Scan der Kartuschenhalterung zu wiederholen und mit dem Extraktionslauf zu beginnen.



Warnung: Quetschgefahr.

7. Das Maxwell® Instrument beginnt sofort mit dem Aufreinigungslauf. Auf dem Bildschirm werden die Schritte angezeigt, die durchgeführt werden, sowie die ungefähre Restlaufzeit.

Hinweise:

- a. Wenn Sie auf die Schaltfläche **Abbruch** tippen, wird der aktuelle Lauf abgebrochen. Alle Proben aus einem abgebrochenen Lauf gehen verloren.
 - b. Wird der Lauf vor Beendigung abgebrochen, kann die Aufforderung angezeigt werden, zu prüfen, ob noch Stößel auf der Stößelhalterung geladen sind. Wenn Stößel auf der Stößelhalterung vorhanden sind, müssen Sie auf Anforderung den Schritt **Reinigung** durchführen. Wenn sich keine Stößel auf der Stößelhalterung befinden, können Sie auf Anforderung den Schritt **Reinigung** überspringen. Die Proben sind dann nicht mehr zu verwenden.
8. Nach Abschluss des Laufs wird auf dem Bildschirm in einer Meldung angezeigt, dass das Verfahren abgeschlossen ist.

Ende des Laufs

9. Befolgen Sie am Ende des Verfahrens die Anweisungen auf dem Bildschirm, um die Tür zu öffnen. Vergewissern Sie sich, dass sich die Stöbel am Ende des Laufs in Kammer 8 der Kartusche befinden. Sind noch Stöbel an der Stöbelhalterung geladen, befolgen Sie die Anweisungen in der entsprechenden Betriebsanleitung zu Ihrem Maxwell® Instrument (siehe Tabelle 1) und führen Sie das Verfahren **Reinigung** durch, um die Stöbel zu entladen, sofern möglich.
10. Setzen Sie die Deckel auf die Elutions-Gefäße mit der DNA und entnehmen Sie die Gefäße sofort, um zu verhindern, dass die Eluate verdunsten. Nehmen Sie die Maxwell® Kartuschenhalterung(en) aus dem Gerät.
Hinweis: Halten Sie die Kartuschenhalterung an den Seiten, um sie aus der Geräteplattform zu entnehmen. Entnehmen Sie unbedingt die Proben aus dem Gerät, bevor die UV-Reinigung durchgeführt wird, um zu verhindern, dass die aufgereinigte Nukleinsäure Schaden nimmt. DNA-Proben können bei +4 °C bis zu einer Woche und bei –20 °C bis zu einem Monat gelagert werden.
11. Nehmen Sie die Kartuschen und Stöbel aus der oder den Kartuschenhalterung(en) und entsorgen Sie sie gemäß den Richtlinien Ihres Instituts für gefährliche Materialien. Kartuschen, Stöbel und Elutions-Gefäße sind für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Maxwell® FFPE Cartridges, CSC/RSC-Stöbel und Elutions-Gefäße dürfen nicht wiederverwendet werden.



7. Nach der Aufreinigung

Stellen Sie fest, ob der Ertrag der aufgereinigten DNA-Probe die eingegebenen Anforderungen für das entsprechende nachfolgende Diagnostik-Assay erfüllt, bevor Sie sie in diesem Assay verwenden. Die Leistung des Kits wurde basierend auf der Aufreinigung der amplifizierbaren DNA bewertet. Andere Verfahren zur Quantifizierung, wie die Absorbanz oder die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs, korrelieren u. U. nicht mit der Amplifikation (1). Werden Absorbanzergebnisse der aufgereinigten FFPE-Proben zugrunde gelegt, wird der Ertrag möglicherweise überschätzt, sodass wir andere Verfahren empfehlen, um den Ertrag zu ermitteln (1).

8. Evaluierung der analytischen Leistung

Die analytische Leistung des Maxwell® CSC DNA FFPE Kit wurde mit FFPE-Gewebepräparaten vom Menschen auf dem Maxwell® CSC Instrument evaluiert. Im Rahmen der Entwicklung des Maxwell® CSC DNA FFPE Kit wurde eine gleichwertige Leistung dieses Instruments gegenüber dem Maxwell® CSC 48 Instrument nachgewiesen.

8.A. Amplifizierbarkeit

Tabelle 2. Amplifizierbarkeit von DNA, die aus FFPE-Gewebeschnitten aufgereinigt wurde. DNA wurde aus einzelnen FFPE-Gewebeschnitten typischer Größe mithilfe des Maxwell® CSC DNA FFPE Kit nach standardmäßigen und nächtlichen Vorverarbeitungsmethoden aufgereinigt. Als Quantifizierungsziel wurde die Menge der extrahierten DNA per Echtzeit-PCR mit RNase P (102 bp) bewertet. Zur Bewertung der DNA-Qualität wurde die Amplifikation des TERT-Gens (Telomerase-Reverse-Transkriptase, 164 bp) als größeres Einzelkopie-Genziel gemessen. Dass die Amplifikation bei einigen Proben fehlschlug, wurde einer schlechten Qualität der Eingangsproben zugeschrieben, da bei der Verwendung eines Kits eines Mitbewerbers zur Aufreinigung der DNA aus den Proben eine ähnliche Quote von Fehlschlägen zu beobachten war. Die Daten von Proben minderer Qualität wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Für jeden Satz von Replikaten ist die durchschnittliche DNA-Konzentration angegeben. Alle FFPE-Gewebeschnitte ergaben mindestens 100 Kopien/ μ l RNase P und waren, sofern sie nach der Standard- und der Über-Nacht-Methode aufbereitet wurden, für TERT nachweisbar.

Tabelle 2. Amplifizierbarkeit von DNA, die aus FFPE-Gewebeschnitten aufgereinigt wurde (Fortsetzung).

Gewebe	Vorverarbeitungsbedingungen	Probe 1		Probe 2		Probe 3	
		Konzentration (Exemplare/ μ l) oder Erkennung		Konzentration (Exemplare/ μ l) oder Erkennung		Konzentration (Exemplare/ μ l) oder Erkennung	
		RNase P	TERT	RNase P	TERT	RNase P	TERT
Brust*	Standard	439	Erkannt	2277	Erkannt	5217	Erkannt
	Über Nacht	273	Erkannt				
Dickdarm*	Standard	1313	Erkannt	2277	Erkannt	3064	Erkannt
	Über Nacht	983	Erkannt	1050	Erkannt		
Ösophagus*	Standard	366	Erkannt	1314	Erkannt	1931	Erkannt
	Über Nacht	243	Erkannt	755	Erkannt		
Leber*	Standard	2472	Erkannt	475	Erkannt	404	Erkannt
	Über Nacht	2206	Erkannt	434	Erkannt		
Lunge	Standard	2939	Erkannt	3006	Erkannt	5217	Erkannt
	Über Nacht	1176	Erkannt	1510	Erkannt	3230	Erkannt
Pankreas	Standard	570	Erkannt	738	Erkannt	110	Erkannt
	Über Nacht	454	Erkannt	565	Erkannt	114	Erkannt
Prostata	Standard	936	Erkannt	1003	Erkannt	3064	Erkannt
	Über Nacht	829	Erkannt	634	Erkannt	1931	Erkannt
Magen	Standard	659	Erkannt	548	Erkannt	404	Erkannt
	Über Nacht	454	Erkannt	245	Erkannt	223	Erkannt
Blase	Standard	482	Erkannt	421	Erkannt	296	Erkannt
	Über Nacht	355	Erkannt	331	Erkannt	262	Erkannt
Dünndarm	Standard	741	Erkannt	424	Erkannt	1903	Erkannt
	Über Nacht	441	Erkannt	389	Erkannt	1070	Erkannt
Uterus	Standard	2124	Erkannt	3921	Erkannt	4081	Erkannt
	Über Nacht	1556	Erkannt	3117	Erkannt	2532	Erkannt

*Es wurde Brustgewebe aus einer Probe getestet. Es wurden Dickdarm-, Ösophagus- und Lebergewebe aus zwei verschiedenen Proben getestet. Bei allen anderen Gewebetypen wurden drei verschiedene Proben getestet. Die dunkel schattierten Tabellenzellen stehen für nicht getestete Proben.

8.A. Amplifizierbarkeit (Fortsetzung)

Tabelle 3. Reproduzierbarkeit der DNA-Amplifikation. Drei unabhängige Benutzer reinigten mithilfe des Maxwell® CSC DNA FFPE Kit DNA aus FFPE-Gewebeschnitten mit reduzierter Größe auf. Die DNA wurde nach der Standard-Vorverarbeitungsmethode aus 0,02 mm³ und 0,1 mm³ großen Kolon- und Lebergewebeschnitten aufgereinigt. Die DNA-Konzentration wurde durch qPCR in zweifacher Ausführung unter Verwendung eines RNase-P-Targets (102 bp) bestimmt, und die durchschnittliche DNA-Konzentration für jeden Gewebebeschneidung und jeden Gewebetyp wurde für jeden Benutzer berechnet. Die niedrigste durchschnittliche DNA-Konzentration über alle Benutzer und alle Gewebe für 0,02 mm³ und 0,1 mm³ Gewebe betrug 45 Kopien/µl bzw. 260 Kopien/µl.

Gewebe	Benutzerkennung	Größe der Gewebeprobe	Konzentration (Exemplare/µl)
Dickdarm	1	0,10 mm ³	332
		0,02 mm ³	108
	2	0,10 mm ³	445
		0,02 mm ³	188
	3	0,10 mm ³	383
		0,02 mm ³	45
Leber	1	0,10 mm ³	401
		0,02 mm ³	54
	2	0,10 mm ³	307
		0,02 mm ³	73
	3	0,10 mm ³	260
		0,02 mm ³	68

8.B. Reproduzierbarkeit

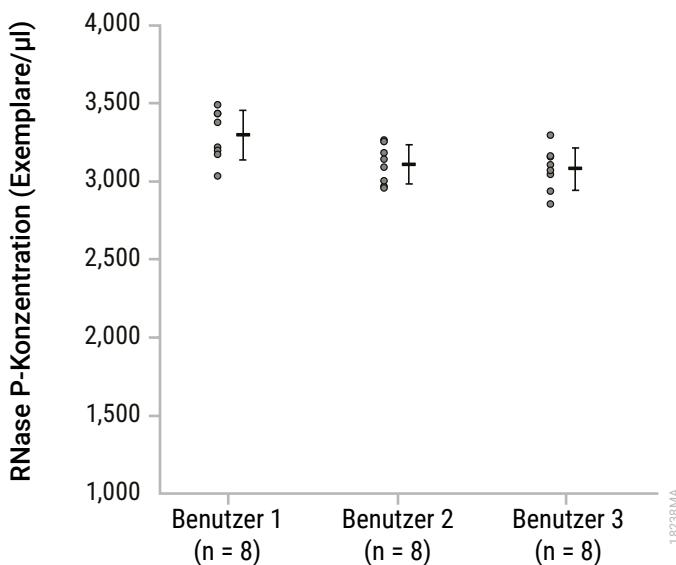


Abbildung 4. Die Reproduzierbarkeit der DNA-Aufreinigung zwischen den Benutzern wurde durch die Aufreinigung von DNA aus seriellen Schnitten einer FFPE-Brustgewebeprobe durch drei Benutzer charakterisiert.

Die Eluate wurden mittels qPCR anhand eines RNase P-Ziels (102 bp) amplifiziert und die durchschnittlichen DNA-Konzentrationen sowie die Inter- und Intra-Run-CV-Werte berechnet. Die Werte für den Intra-Run-CV betrugen 4,9 % (Benutzer 1), 4,0 % (Benutzer 2) und 4,5 % (Benutzer 3); der Inter-Run-CV lag bei allen drei Benutzern bei 5,3 %, was die Reproduzierbarkeit der DNA-Aufreinigung bei jedem Benutzer sowie übergreifend für mehrere Benutzer zeigt. Bei jedem Datensatz stellen Punkte auf der linken Seite die individuellen Werte der Probe dar, während der Mittelwert mit der Standardabweichung rechts angezeigt wird.

8.B. Reproduzierbarkeit (Fortsetzung)

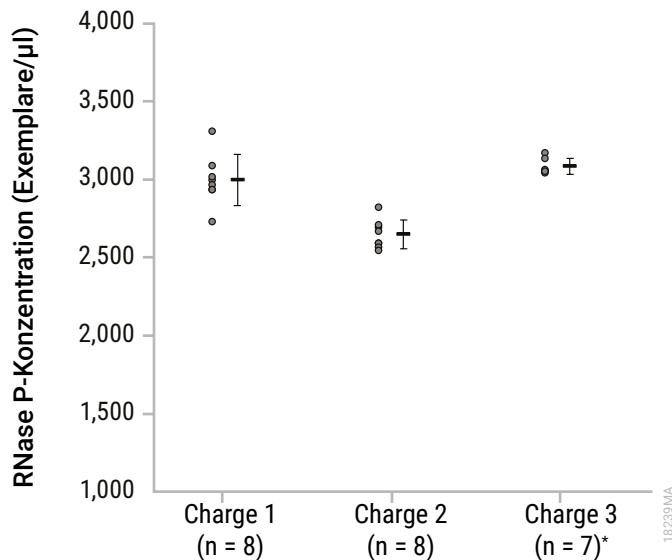


Abbildung 5. Die Reproduzierbarkeit der DNA-Aufreinigung von Charge zu Charge wurde durch einen einzelnen Benutzer charakterisiert, der die DNA aus seriellen Schnitten einer FFPE-Brustgewebeprobe mit drei Chargen des Maxwell® CSC DNA FFPE Kits aufreinigte. Die Eluate wurden mittels qPCR anhand eines RNase P-Ziels (102 bp) amplifiziert und die durchschnittlichen DNA-Konzentrationen berechnet, was die Reproduzierbarkeit der DNA-Aufreinigung mit jeder Charge zeigte. Bei jedem Datensatz stellen Punkte auf der linken Seite die individuellen Werte der Probe dar, während der Mittelwert mit der Standardabweichung rechts angezeigt wird. *Der Dixon-Ausreißertest ließ den Ausschluss eines Replikats in diesem Set als Ausreißer an der 95 %-Konfidenzschwelle zu. Dieses Replikat wurde aus der Analyse ausgeschlossen.

8.C. Inhibition (Interferierende Stoffe)

Tabelle 4. Analyse der aufgereinigten DNA auf störende Substanzen. Die DNA wurde aus einem oder zwei typisch großen, auf einen Objektträger montierten FFPE-Gewebeschnitten des Dickdarms und der Leber unter Verwendung der Standard- und Über-Nacht-Vorverarbeitungsmethode mit dem Maxwell® CSC DNA FFPE Kit gereinigt. Für jede aufgereinigte DNA wurden zwei Amplifikationssätze unter Verwendung von 2 µl und 8 µl DNA-Eingabe zusammengestellt und die Differenz der C_q-Werte (ΔC_q) zwischen beiden DNA-Eingaben berechnet. Bei einer vierfachen Differenz in der DNA-Eingabe wäre ein ΔC_q von 2 zu erwarten. Alle getesteten Bedingungen ergaben ΔC_q -Werte von 2 ± 1 Zyklus; dies belegt, dass potenzielle Störsubstanzen, die mit der DNA co-aufgereinigt wurden, die nachfolgende Amplifikation nicht beeinträchtigten.

FFPE- Gewebetyp	Vorverarbeitungs- bedingungen	Anzahl der FFPE- Gewebeschnitte	RNase P		
			Durchschnitt 2 µl C _q (Zyklen)	Durchschnitt 8 µl C _q (Zyklen)	Durchschnitt ΔC_q (Zyklen)
Dickdarm	Standard	1 (n = 3)	26,4	24,5	1,9
		2 (n = 3)	25,7	23,6	2,0
	Über Nacht	1 (n = 2)	28,3	26,0	2,3
		2 (n = 3)	27,5	25,0	2,4
Leber	Standard	1 (n = 3)	25,5	23,5	2,0
		2 (n = 3)	24,5	22,6	1,9
	Über Nacht	1 (n = 3)	26,8	24,7	2,1
		2 (n = 3)	25,8	23,7	2,0

8.D. Kreuzkontamination

Die DNA wurde mithilfe des Maxwell® CSC DNA FFPE Kit aus acht Replikatschnitten einer FFPE-Lungen-gewebeprobe und acht Negativkontrollen (Wasser) extrahiert. Maxwell® CSC Cartridges mit den präparierten FFPE-Proben oder Negativkontrolle (Wasser) wurden in wechselnden Kartuschenpositionen des Maxwell® CSC Instrument verarbeitet. Für die Feststellung, ob es eine Kreuzkontamination zwischen den Proben gab, wurden die resultierenden Eluate in zweifacher Ausfertigung mittels qPCR auf das RNase P (102 bp)-Gen getestet, um eine DNA-Kontamination in den Negativkontrollen aus benachbarten FFPE-Proben nachzuweisen. In den Negativkontrollen wurde keine kontaminierende DNA erkannt.

9. Evaluierung der klinischen Leistung

Die klinische Leistung des Maxwell® CSC DNA FFPE Kit wurde von einem externen klinischen Labor anhand von humanen FFPE-Gewebeproben auf dem Maxwell® CSC Instrument evaluiert.

9.A. Amplifizierbarkeit der DNA

Tabelle 5. Amplifizierbarkeit von aus FFPE-Gewebe extrahierter DNA. Die mit dem Maxwell® CSC DNA FFPE Kit und dem Maxwell® CSC Instrument aus insgesamt 21 FFPE-Gewebeproben extrahierte DNA wurde in einem qPCR-Assay, der auf das Wildtyp-c-KIT-Gen abzielt, mit dem COLD-PCR C-KIT D816V-Test des Testlaboratoriums amplifiziert. Im selben Assay wurde die aus denselben Proben mit der Standard-Nukleinsäure-Reinigungsmethode des Labors (Laborreferenzmethode) extrahierte DNA zu Vergleichszwecken amplifiziert. In der Abbildung wird die Differenz der C_q -Werte (ΔC_q) zwischen der mit dem Maxwell® CSC DNA FFPE Kit und der Laborreferenzmethode aus derselben FFPE-Gewebeprobe aufgereinigten DNA veranschaulicht. Die Amplifizierbarkeit der DNA, die mit dem Maxwell® CSC DNA FFPE Kit aufgereinigt wurde, korreliert mit der Laborreferenzmethode.

FFPE-Gewebeprobe	Maxwell® CSC DNA FFPE Kit	Mittlerer C_q	Labor-Referenzmethode	ΔC_q
1	26,57	27,84		-1,27
2	26,65	27,34		-0,68
3	24,16	25,23		-1,07
4	27,05	28,66		-1,62
5	24,64	25,11		-0,47
6	24,54	26,02		-1,48
7	24,25	25,00		-0,75
8	24,59	24,75		-0,16
9	25,07	25,44		-0,37
10	25,78	25,49		0,29
11	24,85	24,80		0,05
12	27,06	25,17		1,89
13	24,40	24,55		-0,15
14	23,51	24,65		-1,14
15	24,25	24,04		0,22
16	27,13	29,22		-2,09
17	27,03	28,70		-1,68
18	29,34	28,76		0,58
19	26,58	28,54		-1,96
20	26,66	27,70		-1,04
21	26,60	28,20		-1,60

9.B. Reproduzierbarkeit

Tabelle 6. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zwischen Testern. Zur Veranschaulichung der Konsistenz der Ergebnisse zwischen den Testern in einer typischen Benutzerumgebung wurde DNA, die von zwei verschiedenen Testern mithilfe des Maxwell® CSC DNA FFPE Kit aus sieben verschiedenen FFPE-Gewebeproben extrahiert wurde, durch qPCR mit dem Wildtyp c-KIT-Gen unter Verwendung des COLD-PCR C-KIT D816V-Tests des Testlabors amplifiziert. Zur Minderung der Auswirkungen der qPCR-Assay-Variabilität auf die Ergebnisse wurden Eluate aus derselben FFPE-Gewebeprobe mit dem selben Assay getestet. In der Tabelle ist die Differenz der C_q -Werte (ΔC_q) ersichtlich, die mit der von zwei verschiedenen Testern aus derselben FFPE-Gewebeprobe aufgereinigten DNA erzielt wurden. Die ΔC_q -Werte zwischen den Testern lagen zwischen 0,12–0,97, womit die Reproduzierbarkeit der von mehreren Testern amplifizierten DNA bestätigt wurde.

FFPE-Gewebeprobe	Mittlerer C_q -Wert		
	Tester 1	Tester 2	ΔC_q
1	26,57	27,54	0,97
2	26,65	26,53	0,12
3	24,16	24,39	0,23
4	27,05	26,64	0,40
5	24,64	24,29	0,36
6	24,54	24,47	0,07
7	24,25	24,06	0,20

9.C. Kreuzkontamination

Gegenstand der Bewertung war u. a. die Kreuzkontamination, die während der DNA-Extraktion mithilfe des Maxwell® CSC DNA FFPE Kit in einer typischen Benutzerumgebung zwischen den Proben auftrat. Die DNA-Extraktion mithilfe des Maxwell® CSC DNA FFPE Kit wurde im selben Gerätelauf anhand von acht verschiedenen FFPE-Gewebeproben und acht Negativkontrollen (Wasser) durchgeführt. Maxwell® CSC Cartridges mit FFPE-Gewebeproben oder Negativkontrollen (Wasser) wurden in wechselnden, angrenzenden Kartuschenpositionen des Maxwell® CSC Instrument verarbeitet. Die resultierenden Eluate wurden in zweifacher Ausfertigung mittels qPCR auf das Wildtyp-c-KIT-Gen anhand des COLD-PCR C-KIT D816V-Tests des Testlabors getestet, um jegliche kontaminierte DNA in den Negativkontrollen aus den benachbarten FFPE-Proben nachzuweisen. In den acht Negativkontrollen wurde keine kontaminierende DNA erkannt.

10. Fehlerbehebung

Bei Fragen, die hier nicht angesprochen werden, wenden Sie sich bitte an Ihre Promega-Niederlassung oder Ihren Vertriebspartner vor Ort. Die Kontaktdaten erhalten Sie hier: www.promega.com

E-Mail: techserv@promega.com

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
Konzentration der DNA im Eluat geringer als erwartet. (Die amplifizierbare DNA, die aus einem typischen FFPE-Schnitt erzielt werden kann, ist von der Größe, der Zellularität und der Formalinfixierung des Gewebes sowie von der Handhabung abhängig.)	Die Leistung des Kits wurde durch Isolation von DNA aus FFPE-Gewebeproben mit einer Größe von bis zu 2,0 mm ³ bewertet. Es wurde nicht für Probengrößen unter 2,0 mm ³ entwickelt. Verwenden Sie nur Abschnitte, die den Größenvorgaben entsprechen.
	Das Kit wurde für den Einsatz mit FFPE-Gewebeproben entwickelt. Es wurde nicht für den Einsatz mit anderen Proben als FFPE-Gewebeproben wie frischen oder gefrorenen Gewebeproben entwickelt. Die Inkubationszeiten und -temperaturen wurden auf optimale Ausbeute getestet.
	Das Kit ist nicht für den Einsatz mit Gewebeproben bestimmt, die mit anderen Fixiermitteln als 10%igem neutral gepuffertem Formalin zubereitet wurden. Befragen Sie das pathologische Labor oder den Lieferanten um sicherzustellen, dass kein anderes Fixiermittel verwendet wurde.
	Es können keine Ansprüche im Hinblick auf verunreinigte Objektträger oder Schnitte gestellt werden. Wiederholen Sie die Aufreinigung mit einem nicht verunreinigten Objektträger bzw. mit einem nicht verunreinigten Schnitt.
	Die Leistung des Kits wurde basierend auf der Aufreinigung der amplifizierbaren DNA bewertet. Andere Verfahren zur Quantifizierung wie die Absorbanz oder die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs korrelieren u. U. nicht mit der Amplifikation. Verwenden Sie eine Amplifikationsquantifizierung, um die Aufreinigung zu bewerten.
	Bei geringeren Probeneingabevolumen (unter 0,1 mm ³) ist die optionale nächtliche Inkubation bei 70 °C eventuell nicht optimal. Verwenden Sie die Standardentnetzung von 4 Stunden bei 80 °C, wenn mit der nächtlichen Inkubation keine ausreichende DNA-Konzentration für Volumenproben mit niedriger Eingabe aufgereinigt werden kann.

Symptome

Qualität geringer als erwartet.

(Das Eluat enthält stark fragmentierte DNA oder Inhibitoren nachfolgender Assays.)

Ursachen und Anmerkungen

Der für die Aufreinigung verwendete Gewebeschnitt kann, bedingt durch die Bedingungen oder die Handhabung der Formalinfixierung, fragmentierte DNA enthalten. Ist die DNA vor der Aufreinigung der Extraktion fragmentiert, wird die fragmentierte DNA mit diesem Kit aufgereinigt. Wiederholen Sie den Vorgang mit einem Nachbarschnitt um zu bewerten, ob ein Problem mit dem Schnitt oder dem Verfahren besteht.

Einige amplifikationsbasierte Assays sind besonders empfindlich gegenüber Inhibitoren. Es sollte mithilfe nachfolgender Assay-Kontrollen festgestellt werden, ob ein Amplifikationsinhibitor im Eluat vorhanden ist. Es liegt in der Verantwortung des Benutzers zu überprüfen, ob dieses Produkt mit nachfolgenden Assays kompatibel ist.

Jeder schwerwiegende Vorfall in Zusammenhang mit dem Produkt, der zum Tod oder zu schweren Verletzungen eines Benutzers oder Patienten geführt hat oder führen könnte, ist dem Hersteller unverzüglich zu melden. Benutzer mit Sitz in der Europäischen Union sollten alle schwerwiegenden Vorfälle zudem der zuständigen Behörde des Mitgliedsstaat, in dem der Benutzer und/oder der Patient niedergelassen ist, melden.

11. Literaturhinweis

1. Bonin, S. *et al.* (2010) Multicentre validation study of nucleic acids extraction from FFPE tissues. *Virchows Arch.* **457**, 309–17.

12. Verwandte Produkte

Geräte und Zubehör

Produkt	Größe	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument*	jeweils 1	AS6000
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	jeweils 1	SP6019
Maxwell® CSC 48 Instrument*	jeweils 1	AS8000
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	jeweils 1	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	jeweils 1	AS8402
Microtube 1,5 ml	1.000/Pck.	V1231

*Für den Einsatz in der In-vitro-Diagnostik. Dieses Produkt ist nur in bestimmten Ländern erhältlich.

Maxwell® CSC Reagent Kits

Eine Liste der verfügbaren Maxwell® CSC Purification Kits finden Sie unter www.promega.com.

13. Änderungsübersicht

Folgende Änderungen wurden an der Version dieses Dokuments vom Oktober 2022 vorgenommen:

1. Abschnitt 3 wurde zu Verwendungszweck des Produkts.
2. Abschnitt 8 und 9 hinzugefügt.
3. Dokument zwecks Einhaltung der Verordnung (EU) 2017/746 über In-vitro-Diagnostika aktualisiert.

^(a)US-Pat. Nr. 7,329,488 und S. Korean Pat. Nr. 100483684.

© 2013–2022 Promega Corporation. Alle Rechte vorbehalten.

Maxwell ist eine Marke der Promega Corporation.

Die Produkte können angemeldeten oder erteilten Patenten oder bestimmten Einschränkungen unterliegen. Weitere Informationen finden Sie auf unserer Website.

Alle Preise und technischen Daten können ohne vorherige Ankündigung geändert werden.

Änderungen zu Produktansprüchen bleiben vorbehalten. Bitte wenden Sie sich an Promega Technical Services oder rufen Sie den Online-Katalog von Promega auf, um die aktuellsten Informationen zu Promega-Produkten zu erhalten.