

TECHNISCHES HANDBUCH

Maxwell® CSC RNA FFPE Kit

Gebrauchsanweisung für das Produkt
AS1360

Achtung: Kartuschen vorsichtig handhaben. Folienversiegelungen können scharfkantig sein.



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Deutschland



GEBRAUCHSANWEISUNG
FÜR DAS PRODUKT
AS1360



Überarbeitet 11/22
TM404

Maxwell[®] CSC RNA 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 RNA FFPE Cartridges.....	8
6. Gerätelauf	10
7. Nach der Aufreinigung.....	12
8. Evaluierung der analytischen Leistung	13
8.A. RNA-Quantität, -Qualität und -Amplifizierbarkeit	13
8.B. Reproduzierbarkeit	14
8.C. Interferierende Stoffe (Inhibition)	14
8.D. Kreuzkontamination	15
9. Evaluierung der klinischen Leistung	15
9.A. RNA-Menge, Qualität und Amplifizierbarkeit.....	15
9.B. Reproduzierbarkeit	16
9.C. Kreuzkontamination	16
10. Fehlerbehebung	17
11. Erstellen einer ribonukleasefreien Umgebung	19
12. Literaturhinweis	19
13. Verwandte Produkte.....	20
14. Änderungsübersicht	20

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

1. Beschreibung

Das Maxwell® CSC RNA FFPE Kit^(a) kommt in Verbindung mit den Maxwell® CSC Instruments gemäß Tabelle 1 zum Einsatz und bietet eine einfache Methode zur effizienten, automatisierten Aufreinigung von RNA aus humanen formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE)-Gewebeproben der Brust, der Lunge und des Dickdarms. 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 RNA kann direkt in einer Vielzahl von amplifikationsbasierten Folgeanwendungen, wie z. B. der RT-PCR, verwendet werden.

Tabelle 1. Unterstützte Instrumente

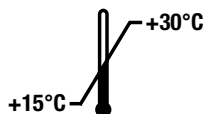
Instrument	Cat.#	Technisches Handbuch
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

Prinzip der Methode: Das Maxwell® CSC RNA FFPE Kit reinigt Nukleinsäure mithilfe paramagnetischer Partikel auf, die für eine mobile feste Phase sorgen, mit der die RNA optimal aus der Probe gewonnen, gewaschen und aufgereinigt wird. Die Maxwell® CSC Instruments sind Geräte zur magnetischen Partikelhandhabung. Dieses System ermöglicht eine effiziente Bindung der RNA 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 in Verbindung mit Systemen für die Handhabung von Flüssigkeiten, wie z. B. verstopfte Spitzen oder Teilübertragungen von Reagenzien, vermieden, die bei anderen häufig verwendeten automatisierten Systemen zu einem suboptimalen Aufreinigungsprozess führen.

2. Produktkomponenten, Lagerbedingungen und Symbolerklärung

PRODUKT	GRÖSSE	CAT.#
Maxwell® CSC RNA FFPE Kit	48 Präparationen	AS1360

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



Beinhaltet:

- 25 ml Mineralöl
- 20 ml Lyse-Pufferlösung
- 2 × 1 ml Proteinase K
- 100 µl Blauer Farbstoff
- 2 × 1 ml MnCl₂, 0,09 M
- 1 ml DNase-Pufferlösung
- 3 Phiolen DNase I (lyophilisiert)
- 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 RNA FFPE Kit bei Umgebungstemperatur (+15 bis +30 °C). Lagern Sie rehydrierte DNase I bei –30 °C bis –10 °C. Mehr als 10 maliges Einfrieren und Wiederauftauen ist nicht zulässig.



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



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



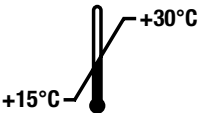













Achtung: Kartuschen vorsichtig handhaben. Folienversiegelungen können scharfkantig sein.

Weitere Informationen: Die Komponenten des Maxwell® CSC RNA FFPE Kits 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
	In-vitro-Diagnostikum		Bevollmächtigter
	Bei +15 bis +30 °C aufbewahren.		Hersteller
	Achtung		Reizend
	Gesundheitsrisiko		Ausreichend für „n“ Tests
	Europäische Konformität		Warnung. Biogefahr.
	Warnung. Quetschgefahr.		Bestellnummer
	Chargennummer		Nicht zur Wiederverwendung

3. Verwendungszweck des Produkts

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

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

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

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

4. Anwendungstechnische Grenzen des Produkts

Die Leistung des Maxwell® CSC RNA FFPE Kits wurde mithilfe von humanen FFPE-Gewebeproben der Brust, der Lunge und des Dickdarms bestimmt. Es ist nicht für den Einsatz mit anderen als FFPE-Gewebeproben wie frischen oder gefrorenen Gewebeproben bestimmt. Das Maxwell® CSC RNA FFPE Kit ist nicht für den Einsatz mit anderen Arten von Proben, wie z. B. nicht-humanen Proben, oder zur Aufreinigung von DNA bestimmt.


Das Maxwell® CSC RNA 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 RNA FFPE Kits wurde durch Isolation von RNA aus FFPE-Gewebeproben mit einer Größe von 0,1–2,0 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 RNA FFPE Kit aufgereinigte RNA verwendet wird, muss geeignete Kontrollen beinhalten.

5. Bevor Sie beginnen

Vom Nutzer beizubringende Materialien

- Mikrozentrifuge
- Pipettierer und Pipettenspitzen für die Vorbereitung der Proben und deren Übertragung in die vorgefüllten Reagenzien-Kartuschen
- 1,5–2,0-ml-Röhrchen für die Inkubation der Proben (z. B. Microtubes, 1,5 ml, Cat.# V1231)
- Heizblöcke auf 56 °C und 80 °C eingestellt
- FFPE-Proben mit einem Gewebevolumen von insgesamt 0,1–2,0 mm³, die Dicke des Schnitts darf 5 µm nicht überschreiten (**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.)

Erstellen Sie bei Bedarf erneut eine Phiole lyophilisierte DNase I aus 275 µl Nuclease-Free Water. Drehen Sie die Phiole um, um die DNase I von der Unterseite des Deckels zu lösen, und schütteln Sie sie vorsichtig, um den Inhalt zu vermischen; nicht vortexen.

5.A. Vorbereitung von FFPE-Proben

Halten Sie während der Verarbeitung eine RNase-freie Umgebung aufrecht. Verwenden Sie stets RNase-freie und aerosolresistente Pipettenspitzen. Wechseln Sie häufig Ihre Handschuhe, um das Risiko einer RNase-Kontaminierung zu verringern. Einzelheiten finden Sie in Abschnitt 11, Erstellen einer ribonukleasefreien Umgebung.

Vorverarbeitung von Schnittproben

1. Platzieren Sie den Schnitt in einem 1,5-ml-Mikrozentrifugengefäß. Bei Verwendung von Gewebeschnitten 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 µl × (n + 1)
Proteinase K	25 µl	n + 1	25 µl × (n + 1)
Blauer Farbstoff	1 µl	n + 1	1 µl × (n + 1)

5. Geben Sie zu jedem Probengefäß 250 µl Master Mix hinzu und vortexen Sie die Proben 5 Sekunden lang.
6. Zentrifugieren Sie die Probengefäße 20 Sekunden lang bei $10.000 \times g$, um die Schichten zu trennen. Wenn in der wässrigen Schicht (untere, blaue Schicht) ein Pellet vorhanden ist, mischen Sie sie vorsichtig, um das Pellet aufzulösen. Lassen Sie beide Phasen in dem Gefäß.
7. Setzen Sie die Probengefäße in den 56 °C-Heizblock und inkubieren Sie sie 15 Minuten lang.
8. Setzen Sie die Probengefäße in den 80 °C-Heizblock und inkubieren Sie sie 1 Stunde lang.
9. Nehmen Sie die Probengefäße aus dem Heizblock und lassen Sie die Proben 15 Minuten lang auf Raumtemperatur abkühlen. Während die Proben abkühlen, bereiten Sie, wie in Schritt 10 beschrieben, den DNase-Cocktail vor.
10. Bereiten Sie einen Cocktail aus $MnCl_2$, DNase-Pufferlösung und DNase I in der nachfolgend erläuterten Reihenfolge zu:

Reagenz¹	Volumen/Reaktion	Reaktionen (Laufanzahl + 1)	Insgesamt
$MnCl_2$, 0,09 M	26 µl	n + 1	26 µl × (n + 1)
DNase-Pufferlösung ²	14 µl	n + 1	14 µl × (n + 1)
DNase I ³	10 µl	n + 1	10 µl × (n + 1)

¹Wenn die Reagenzien des DNase-Cocktails den Probengefäßen einzeln hinzugegeben werden, achten Sie darauf, sie in der nachfolgend erläuterten Reihenfolge hinzuzugeben. Geben Sie jedes Reagenz durch sorgfältiges Pipettieren hinzu, bevor Sie das nächste Reagenz hinzugeben.

²Lagern Sie die DNase-Pufferlösung bei 15–30 °C; wenn sie bei niedrigeren Temperaturen gelagert wird, können Ablagerungen entstehen. Enthält die Pufferlösung Ablagerungen, lösen Sie diese wieder auf, indem Sie sie für 2 Minuten auf 56 °C erwärmen und anschließend kurz vortexen, um sie zu vermischen.

³Lagern Sie die verbleibende wiederhergestellte DNase I bei –30 bis –10 °C.

11. Geben Sie 50 µl DNase in die blaue wässrige Phase jedes Probengefäßes. Durch 10-maliges Pipettieren mischen.
12. Inkubieren Sie die Probengefäße 15 Minuten lang bei Raumtemperatur (15–30 °C). Bereiten Sie während dieser Inkubation, wie in Abschnitt 5.B beschrieben, die Kartuschen vor.
13. Zentrifugieren Sie sie 5 Minuten lang bei Höchstgeschwindigkeit in einer Mikrozentrifuge.
14. Übertragen Sie die blaue wässrige Phase sofort in Kammer 1 einer Maxwell® CSC RNA FFPE Cartridge.

5.B. Vorbereitung der Maxwell® CSC RNA 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 RNA FFPE Kits enthalten sind. Andere Elutions-Gefäße sind u. U. nicht mit dem Maxwell® CSC Instrument kompatibel und können die RNA-Aufreinigungsleistung beeinträchtigen.

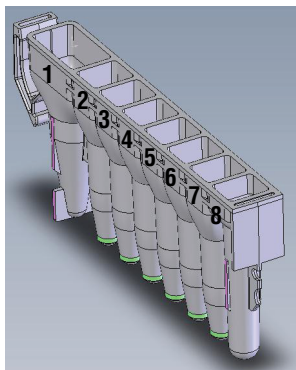
4. Geben Sie unten in jedes Elutions-Gefäß 50 µl Nuclease-Free Water. Die Elutions-Gefäße müssen während der RNA-Aufreinigung offen bleiben.

Hinweis: Verwenden Sie nur das im Lieferumfang des Maxwell® CSC RNA FFPE Kits enthaltene Nuclease-Free Water. Die Verwendung anderer Elutions-Pufferlösungen kann die RNA-Aufreinigungsleistung oder die nachfolgende Verwendung beeinträchtigen.

Hinweise zur Vorbereitung der Maxwell® CSC RNA FFPE Cartridges



Proben- oder Reagenzienspritzer 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 hinzuzugebender Kammerinhalt:

1. Vorverarbeitete Proben
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 RNA FFPE-Verfahren für das Maxwell® CSC Instrument kann von der Promega-Website heruntergeladen werden: **www.promega.com/resources/tools/maxwellcscmethod**. Das Maxwell® CSC RNA FFPE-Verfahren für die Maxwell® CSC 48 Instrument kann von der Promega-Website heruntergeladen werden: **www.promega.com/resources/tools/maxwellcsc48method**

Wenn Sie fürchten, dass Ihr Gerät mit RNase verunreinigt wurde, reinigen Sie das Gerät mit einer Reinigungslösung wie z. B. Steris LpH®, bevor Sie einen Lauf durchführen. Befolgen Sie die Anweisungen im Abschnitt „Reinigung und Wartung“ der *Betriebsanleitung zum Maxwell® CSC Instrument* TM457 oder der *Betriebsanleitung zum Maxwell® CSC 48 Instrument* TM623.

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 RNA FFPE Kits 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 RNA FFPE Kits wird für die RNA-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. Um einen Aufreinigungslauf zu starten, scannen Sie den Barcode, der durch die rote Umrandung, oben rechts auf dem Kit-Etikett, gekennzeichnet ist.

4. Tippen Sie auf dem Bildschirm „Kartuschen-Einrichtung“ auf die Kartuschenpositionen, um für diesen Extraktionslauf Positionen auszuwählen oder 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 Instruments 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 Stöbel in Kammer 8 gesetzt wurden. Setzen Sie die Kartuschenhalterung mit den vorbereiteten Kartuschen in die Maxwell® Instrumentenplattform ein.

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 sich die Kartuschenhalterung 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. Überprüfen Sie, ob 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® Instruments 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. Stöbel 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:

1. Wenn Sie die Schaltfläche **Abbruch** berühren, wird der aktuelle Lauf abgebrochen. Alle Proben aus einem abgebrochenen Lauf gehen verloren.
2. Wird der Lauf vor Beendigung abgebrochen, kann die Aufforderung angezeigt werden, zu prüfen, ob noch Stöbel auf der Stöbelhalterung geladen sind. Wenn Stöbel auf der Stöbelhalterung vorhanden sind, müssen Sie auf Anforderung den Schritt **Reinigung** durchführen. Wenn sich keine Stöbel auf der Stöbelhalterung 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.

6. Gerätelauf (Fortsetzung)

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 Stößel am Ende des Laufs in Kammer 8 der Kartusche befinden. Sind noch Stößel an der Stößelhalterung 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 Stößel zu entladen, sofern möglich.
10. Setzen Sie die Deckel auf die Elutions-Gefäße mit der RNA 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. RNA-Proben können über Nacht bei –30 bis –10 °C oder über einen längeren Zeitraum bei unter –60 °C gelagert werden.



11. Nehmen Sie die Kartuschen und Stößel aus der oder den Maxwell® Kartuschenhalterung(en) und entsorgen Sie sie gemäß den Richtlinien Ihres Instituts für gefährliche Materialien. Kartuschen, Stößel und Elutions-Gefäße sind für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Maxwell® CSC Cartridges, CSC/RSC-Stößel und Elutions-Gefäße dürfen nicht wiederverwendet werden.

7. Nach der Aufreinigung

Stellen Sie fest, ob der Ertrag der aufgereinigten RNA-Probe und die Reinheit die eingegebenen Anforderungen für das entsprechende nachfolgende Diagnostik-Assay erfüllen, bevor Sie sie in diesem Assay verwenden. Die Leistung des Kits wurde basierend auf der Aufreinigung der amplifizierbaren RNA 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 speziellere Verfahren empfehlen, um den Ertrag zu ermitteln (1).

8. Evaluierung der analytischen Leistung

Die analytische Leistung des Maxwell® CSC RNA FFPE Kits wurde mit FFPE-Gewebeproben der Brust, des Dickdarms und der Lunge vom Menschen auf dem Maxwell® CSC Instrument evaluiert. Darüber hinaus wurde das Maxwell® CSC RNA FFPE Kit mit dem Maxwell® CSC 48 Instrument evaluiert, um zu zeigen, dass die Leistung des Kits auf beiden Instrumenten gleichwertig ist.

8.A. RNA-Quantität, -Qualität und -Amplifizierbarkeit

RNA-Quantität, -Qualität und -Amplifizierbarkeit wurden für Eluate evaluiert, die aus Brust-, Dickdarm- und Lungen-FFPE-Probenschnitten mithilfe von Maxwell® CSC RNA FFPE Kit und Maxwell® CSC Instrument hergestellt wurden. Proben (2 µl und 8 µl) jedes Eluats wurden in einem RT-qPCR-Assay durch Gen-Targeting eines Haushaltsgens, HPRT1 (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1) getestet. Eingabe von Eluat in das RT-qPCR mit 2 µl und 8 µl wurde verwendet, um die Inhibition zu bewerten, da eine vierfache Eingabedifferenz zu einem C_q -Unterschied von ungefähr 2 Zyklen führen sollte. Alle Proben wurden mit beiden Eingabevolumen erfolgreich amplifiziert.

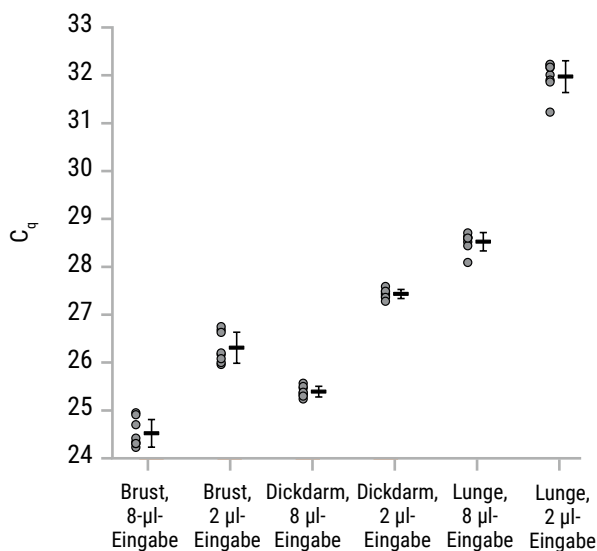


Abbildung 4. RT-qPCR C_q -Werte, Mittelwerte und Standardabweichungen für Eluate, die aus Brust-, Dickdarm- und Lungen-FFPE-Schnitten hergestellt wurden. Bei jedem Probenset stellen Punkte auf der linken Seite die individuellen C_q -Werte der Probe dar, während der Mittelwert mit der Standardabweichung rechts angezeigt wird.

8.B. Reproduzierbarkeit

Tabelle 2. Reproduzierbarkeit über Benutzer hinweg. Um eine Variabilität zwischen Benutzern zu untersuchen, wurden vorverarbeitete FFPE-Gewebeproben gepoolt und dann mithilfe des Maxwell® CSC RNA FFPE Kits und Maxwell® CSC Instruments extrahiert. Eluate wurden im RT-qPCR Assay unter Targeting des HPRT1-Gens amplifiziert und RNA-Konzentrationen aus dem C_q Wert berechnet. Mittelwerte und prozentualer Variationskoeffizient (% CV) für die RNA-Konzentration, die von Eluates von 3 verschiedenen Benutzern erhalten wurden, werden unten gezeigt.

		Konzentration (ng/μl)	Standardabweichung (ng/μl)	% CV
Benutzernummer	1 (n = 8)	1,47	0,123	8,4
	2 (n = 8)	1,45	0,082	5,7
	3 (n = 7)*	1,39	0,100	7,2
Durchschnitt aus drei verschiedenen Benutzern		1,44	0,104	7,2

*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. Interferierende Stoffe (Inhibition)

Tabelle 3. Inhibition durch endogene Substanzen in der Probe. Eluate wurden aus Brust-, Lungen- und Dickdarm-FFPE-Gewebeproben mithilfe des Maxwell® CSC RNA FFPE Kits und Maxwell® CSC Instruments hergestellt. Proben (2 μl und 8 μl) jedes Eluates wurden durch RT-qPCR-Targeting des HPRT-Gens amplifiziert und der ΔC_q (Unterschied zwischen dem durchschnittlichen C_q für jedes Eluat-Eingabevolumen) berechnet. Der ΔC_q zwischen 2 μl- und 8-μl-Eingaben lag zwischen 1,94 und 2,04 Zyklen. Ein ΔC_q zwischen den Volumeneingaben von 2 Zyklen entspricht einer nicht nachweisbaren Inhibition einer DNA-Amplifikation. Es wurde für kein getestetes Gewebe eine Inhibition nachgewiesen.

Gewebe (n = 8)	C_q für 8-μl-Eingaben (Zyklen)	C_q für 2-μl-Eingaben (Zyklen)	ΔC_q
Brust-FFPE	24,52	26,46	1,94
Dickdarm-FFPE	25,39	27,43	2,04
Lungen-FFPE	28,52	30,49	1,96

8.D. Kreuzkontamination

RNA wurde aus 8 verschiedenen FFPE-Gewebeproben und 8 Negativkontroll-Proben mit dem Maxwell® CSC Instrument und Maxwell® CSC RNA FFPE Kit aufgereinigt. Maxwell® Cartridges mit FFPE-Gewebeproben und Maxwell® Cartridges mit Negativkontrolle (Wasser) wurden in wechselnden Kartuschenpositionen des Maxwell® CSC Instruments verarbeitet und die resultierenden Eluate doppelt durch RT-qPCR-Targeting des HPRT1-Gens getestet, um nach einer RNA-Kontamination der Negativkontrollen durch benachbarte Proben zu suchen. In den Negativkontrollen wurde keine kontaminierende RNA nachgewiesen.

9. Evaluierung der klinischen Leistung

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

9.A. RNA-Menge, Qualität und Amplifizierbarkeit

Tabelle 4. Methodenvergleich. RNA wurde mit dem Maxwell® CSC RNA FFPE Kit und der Standardextraktionsmethode des Labors aus 15 FFPE-Gewebeproben aufgereinigt (Labor-Referenzmethode), und dann durch RT-qPCR-Targeting des HPRT1-Gens amplifiziert und die C_q -Ergebnisse der beiden Methoden verglichen. Mit dem Maxwell® CSC RNA FFPE Kit aufgereinigte RNA konnte in allen Proben amplifiziert werden und ergab C_q Werte zwischen 25,86 und 35,35. Die mit der Labor-Referenzmethode hergestellten Eluate konnten in 3 von 15 getesteten Proben nicht amplifiziert werden. Die 3 Eluate, die nicht amplifiziert wurden, zeigten höhere C_q -Werte als Eluate der gleichen Proben, die mit dem Maxwell® CSC RNA FFPE Kit hergestellt worden waren.

FFPE-Gewebeproben	Mittlerer C_q	
	Maxwell® CSC	Labor-Referenzmethode
1	29,55	33,78
2	35,35	kein C_q
3	25,86	31,37
4	27,75	34,49
5	32,27	kein C_q
6	33,02	34,49
7	32,69	kein C_q
8	27,60	36,49
9	31,43	36,77
10	30,35	34,06
11	33,00	35,83
12	31,71	33,39
13	31,27	35,49
14	30,98	34,75
15	33,18	43,71

9.B. Reproduzierbarkeit

Tabelle 5. Reproduzierbarkeit zwischen Testern. Um die Konsistenz von Ergebnissen zwischen Testern in der typischen Tester-Umgebung zu bestätigen, wurde mithilfe des Maxwell® CSC RNA FFPE Kits und Maxwell® CSC Instruments von zwei verschiedenen Testern RNA aus acht FFPE-Gewebeproben extrahiert. Die gewonnenen Eluate wurden unter Targeting des HPRT1-Gens durch RT-qPCR amplifiziert und die durch jede einzelne Probe erzielten Ergebnisse der beiden Tester verglichen.

FFPE-Gewebeproben	Mittlerer C _q	
	Tester 1	Tester 2
1	29,55	28,30
2	35,35	35,31
3	25,86	26,39
4	27,75	25,92
5	32,64	32,72
6	28,45	27,72
7	31,93	29,70
8	28,09	27,03

9.C. Kreuzkontamination

Um zu bestätigen, dass die Kreuzkontamination zwischen Proben in der üblichen Benutzerumgebung nicht stattfindet, wurde RNA aus 8 unterschiedlichen FFPE-Gewebeproben und 8 Negativkontroll-(Wasser-)Proben mithilfe des Maxwell® CSC Instruments und Maxwell® CSC RNA FFPE Kits aufgereinigt. Maxwell® Cartridges mit FFPE-Gewebeproben und Maxwell® Cartridges mit Negativkontrolle (Wasser) wurden in wechselnden Kartuschenpositionen des Maxwell® CSC Instruments verarbeitet. Probeneluate und Negativkontroll-Eluate wurden doppelt durch RT-qPCR-Targeting des HPRT1-Gens getestet, um zu bestimmen, ob eine Kreuzkontamination der negativen Proben vorhanden war. Acht von 8 negativen Proben ergaben negative Ergebnisse und bestätigten so, dass keine nachweisbare Kreuzkontamination aufgetreten war.

10. Fehlerbehebung

Bei Fragen, die hier nicht angesprochen werden, wenden Sie sich bitte an Ihre Promega-Niederlassung oder Ihren Vertriebspartner vor Ort. Die Kontaktdaten finden Sie unter: **www.promega.com**. E-Mail: **techserv@promega.com**

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
Konzentration der RNA im Eluat niedriger als erwartet (Die amplifizierbare RNA, 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.)	<p>Die Leistung des Kits wurde durch Isolation von RNA aus FFPE-Gewebeproben mit einer Größe zwischen 0,1 mm³ bis 2,0 mm³ bewertet. Verwenden Sie Schnitte, die innerhalb dieses Bereichs liegen.</p> <hr/> <p>Das Kit wurde für den Einsatz mit FFPE-Gewebeproben der Brust, der Lunge und des Dickdarms des Menschen entwickelt. Inkubationszeiten und -temperaturen sind unter Umständen für andere Probentypen nicht optimal.</p> <hr/> <p>Das Kit ist nicht für den Einsatz mit Gewebeproben bestimmt, die mit anderen Fixiermitteln als 10%igem neutral gepuffertem Formalin zubereitet wurden. Vergewissern Sie sich, dass kein anderes Fixiermittel verwendet wurde.</p> <hr/> <p>Möglicherweise wurden während der Probenverarbeitung oder -quantifizierung RNasen eingebracht. Informationen zum Erstellen einer ribonukleasefreien Umgebung finden Sie in Abschnitt 11.</p> <hr/> <p>Das verwendete Gewebe stammt von einem verunreinigten Objektträger oder Schnitt. 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.</p> <hr/> <p>Die Leistung des Kits wurde basierend auf der Aufreinigung der amplifizierbaren RNA bewertet. Andere Verfahren zur Quantifizierung wie die Absorbanz oder die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs korrelieren u. U. nicht mit der Amplifikation. Verwenden Sie ein Amplifikationsquantifizierungsverfahren, um den Ertrag zu bewerten.</p>

10. Fehlerbehebung (Fortsetzung)

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
Qualität geringer als erwartet (Das Eluat enthält stark fragmentierte RNA oder Inhibitoren nachfolgender Assays.)	<p>Die RNA wird durch die Formalinfixierung und das nachfolgende Rückgängigmachen der Vernetzung fragmentiert. Ist die RNA vor der Aufreinigung der Extraktion fragmentiert, wird die fragmentierte RNA mit diesem Kit aufgereinigt. Wiederholen Sie den Vorgang mit einem Nachbarschnitt um zu bewerten, ob ein Problem mit dem Schnitt oder dem Verfahren besteht.</p> <p>Einige Amplifikations-Assays sind besonders empfindlich in Bezug auf 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 allen nachfolgenden Assays kompatibel ist.</p>
In den Eluaten liegt DNA vor. (Die Eluate sind mit DNA kontaminiert, was nachfolgende Assays beeinträchtigen kann.)	<p>Der DNase-Cocktail, der der Probe hinzugegeben wurde, sorgt für übermäßige DNase-Aktivität, wenn er in Verbindung mit FFPE-Gewebeproben mit einer Größe zwischen 0,1 mm³ bis 2,0 mm³ verwendet wird. Er wurde nicht für Proben außerhalb dieses Bereichs entwickelt und ist u. U. nicht optimal. Verwenden Sie Schnitte, die innerhalb dieses Bereichs liegen.</p> <p>Wird während der Vorbereitung keine ausreichende Menge DNase-Cocktail in die Probe gemischt, kann dies zu einer unvollständigen Degradierung der DNA führen. Achten Sie darauf, dass der DNase-Cocktail sorgfältig in die Probe gemischt wird.</p> <p>Wenn die Komponenten des DNase-Cocktails der Probe separat hinzugegeben werden, müssen sie unbedingt in der in Abschnitt 5A, Schritt 10 angegebenen Reihenfolge hinzugegeben werden. Achten Sie außerdem darauf, jede Komponente, sobald sie hinzugegeben wurde, sorgfältig zu vermischen. Werden die Komponenten in einer anderen Reihenfolge hinzugegeben oder unzureichend vermischt, kann die DNase inaktiv werden.</p>

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 Mitgliedsstaats, in dem der Benutzer und/oder der Patient niedergelassen ist, melden.

11. Erstellen einer ribonukleasefreien Umgebung

Ribonukleasen sind extrem schwer zu inaktivieren. Achten Sie darauf, dass während und nach der Isolation keine RNase-Aktivität in Ihre RNA-Proben gelangt. Dies ist besonders wichtig, wenn das Ausgangsmaterial nur in begrenzter Menge zur Verfügung steht. Die folgenden Hinweise sollen Ihnen dabei helfen zu verhindern, dass Ihre Proben versehentlich mit RNase kontaminiert werden.

1. Zwei der häufigsten Ursachen für eine RNase-Kontaminierung sind die Hände des Benutzers sowie Bakterien oder Schimmel, die in durch die Luft übertragenen Staubpartikeln vorkommen. Um zu verhindern, dass es aufgrund dieser Ursachen zu Kontaminierungen kommt, wenden Sie bei der Handhabung der im Lieferumfang dieses Systems enthaltenen Reagenzien aseptische Verfahren an. Tragen Sie immer Handschuhe. Wechseln Sie die Handschuhe, sobald Sie in Kontakt mit Ribonukleasen gekommen sind.
2. Verwenden Sie, sofern möglich, sterile Einweg-Kunststoffprodukte für die Handhabung der RNA. Diese Materialien sind in der Regel RNase-frei und müssen nicht vorbehandelt werden, um die RNase zu inaktivieren.
3. Behandeln Sie unsterile Glas- und Kunststoffprodukte, bevor Sie sie verwenden, um sicherzustellen, dass sie RNase-frei sind. Stellen Sie Glasprodukte über Nacht bei 200 °C in den Ofen und spülen Sie Kunststoffprodukte sorgfältig mit 0,1 N NaOH, 1 mM EDTA und anschließend mit RNase-freiem Wasser ab. Sie können auch im Handel erhältliche Produkte zur Entfernung der RNase verwenden, wenn Sie dabei die Herstelleranweisungen beachten.
4. Behandeln Sie Lösungen, die nicht im Lieferumfang des Systems enthalten sind, indem Sie 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) in einem Abzug hinzugeben. Über Nacht inkubieren und dabei bei Raumtemperatur in dem Abzug umrühren. 30 Minuten autoklavieren, um etwaige DEPC-Rückstände zu entfernen.



Achtung: DEPC ist ein mutmaßliches Karzinogen und sollte daher nur in einem Laborabzug verwendet werden. DEPC reagiert schnell mit Aminen und kann nicht für die Tris-Puffer-Behandlung eingesetzt werden.

Hinweis: Bei allen nachfolgenden Anwendungen ist es unerlässlich, dass Sie Ihre RNA-Proben weiterhin vor RNasen schützen.

12. Literaturhinweis

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

13. 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**.

14. Änderungsübersicht

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

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

^(a)US-Pat.-Nr. 7,329,488 und koreanische Pat.-Nr. 10- 0483684.

© 2013–2022 Promega Corporation. Alle Rechte vorbehalten.

Maxwell ist eine Marke der Promega Corporation.

LpH ist eine Marke der Steris 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.