

TECHNISCHES HANDBUCH

# Maxwell<sup>®</sup> CSC Genomic DNA Kit

Gebrauchsanweisung für das Produkt  
**AS1850**

**Achtung:** Kartuschen vorsichtig handhaben. Folienversiegelungen können scharfkantig sein.

# Maxwell<sup>®</sup> CSC Genomic DNA Kit

Die gesamte technische Literatur ist unter folgender Adresse erhältlich: [www.promega.com/protocols/](http://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](mailto: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.....                                                                        | 5  |
| 5.A. Vorbereiten von Vollblut- und Buffy Coat-Proben .....                                        | 6  |
| 5.B. Vorbereiten von Knochenmarkspirat-Proben .....                                               | 7  |
| 5.C. Vorbereiten von Zellpellet-Proben .....                                                      | 8  |
| 5.D. Vorbereiten von Lysaten aus Vollblut-, Buffy Coat-, Knochenmark- und Zellpellet-Proben ..... | 9  |
| 5.E. Vorbereiten von Lysaten aus Gewebeprobe .....                                                | 10 |
| 5.F. Vorbereiten von Lysaten aus Wangenschleimhaut-Abstrichproben .....                           | 11 |
| 5.G. Vorbereiten der Maxwell <sup>®</sup> CSC Genomic DNA Cartridge .....                         | 13 |
| 6. Maxwell <sup>®</sup> Gerätelauf .....                                                          | 15 |
| 7. Nach der Aufreinigung.....                                                                     | 17 |
| 8. Evaluierung der analytischen Leistung .....                                                    | 17 |
| 8.A. DNA-Ertrag .....                                                                             | 17 |
| 8.B. DNA-Qualität (Reinheit) .....                                                                | 23 |
| 8.C. Reproduzierbarkeit .....                                                                     | 30 |
| 8.D. Amplifizierbarkeit .....                                                                     | 31 |
| 8.E. Inhibition (Interferierende Stoffe) .....                                                    | 40 |
| 8.F. Kreuzkontamination .....                                                                     | 46 |
| 9. Evaluierung der klinischen Leistung .....                                                      | 47 |
| 10. Fehlerbehebung .....                                                                          | 48 |
| 11. Verwandte Produkte.....                                                                       | 51 |

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

## 1. Beschreibung

Das Maxwell® CSC Genomic DNA Kit<sup>(a)</sup> wird mit den in Tabelle 1 angegebenen Maxwell® Instruments verwendet, um ein einfaches Verfahren zur effizienten, automatisierten Probenpräparation und Aufreinigung genomischer DNA (gDNA) aus unterschiedlichen humanen biologischen Proben zu ermöglichen. Die Maxwell® CSC Instruments wurden im Sinne maximaler Einfachheit und Zweckdienlichkeit für den Einsatz mit vorbereiteten Reagenzien-Kartuschen und vorprogrammierten Aufreinigungsmethoden entwickelt. Mit der Maxwell®-Methode für das CSC Genomic DNA Kit können eine oder mehrere Proben (bis zur maximalen Probenanzahl) in 40 Minuten auf dem Maxwell® CSC Instrument verarbeitet werden. Die aufgereinigte DNA kann direkt in unterschiedlichen nachfolgenden Anwendungen, wie beispielsweise in PCR-basierten Assays verwendet werden.

**Tabelle 1. Unterstützte Geräte.**

| Gerät           | Cat.#  | Technisches Handbuch | Maximale Probenzahl |
|-----------------|--------|----------------------|---------------------|
| Maxwell® CSC    | AS6000 | TM457                | 16                  |
| Maxwell® CSC 48 | AS8000 | TM623                | 48                  |

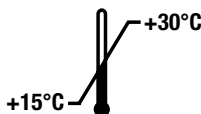
## Methodenprinzip

Das Maxwell® CSC Genomic DNA Kit reinigt Nukleinsäure aus Proben 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® Instruments sind Geräte zur magnetischen Partikelhandhabung, welche die Nukleinsäure effizient an die paramagnetischen Partikel in der ersten Kammer einer vorgefüllten Kartusche binden. Die Proben werden einer Reihe von Waschungen unterzogen, bevor die gDNA eluiert wird. Durch diesen Ansatz der magnetischen 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.

## 2. Produktkomponenten, Lagerbedingungen und Symbolerklärung

| PRODUKT                      | GRÖSSE           | CAT.#  |
|------------------------------|------------------|--------|
| Maxwell® CSC Genomic DNA Kit | 48 Präparationen | AS1850 |

Für den Einsatz in der In-vitro-Diagnostik. Verwendung nur durch Fachpersonal. Enthält genügend Reagenzien für 48 automatisierte Isolationen aus einer Vielzahl humaner biologischer Proben. Die Kartuschen sind nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt.



Inhalt:

- 2 × 1 ml Proteinase K-(PK-)Lösung
- 1 ml RNase A-Lösung
- 20 ml Lyse-Pufferlösung
- 20 ml Lytischer Enhancer (LE2)
- 48 Maxwell® CSC Cartridges (CSCQ)
- 50 CSC/RSC-Stößel
- 50 Elutions-Gefäße (0,5 ml)
- 20 ml Elutions-Pufferlösung

**Lagerbedingungen:** Das Maxwell® CSC Genomic DNA Kit ist bei +15 °C bis +30 °C zu lagern.



**Sicherheitshinweise:** Die Maxwell® CSC Cartridges (CSCQ) enthalten Ethanol und Isopropanol. Diese Substanzen gelten als entflammbar, schädlich und reizend. Ausführliche Sicherheitshinweise finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (SDS). Beim Umgang mit allen chemischen Abfällen in Verbindung mit diesem System und bei deren Entsorgung sind die Richtlinien des Instituts zu befolgen.



Die Maxwell® CSC Cartridges (CSCQ) sind zum Gebrauch mit potenziell infektiösen Substanzen bestimmt. Bei der Handhabung infektiöser Substanzen ist angemessene Schutzkleidung (z. B. Handschuhe, Schutzbrille) zu tragen. Beim Umgang mit allen infektiösen Substanzen in Verbindung mit diesem System und bei deren Entsorgung sind die Richtlinien Ihres Instituts zu befolgen.



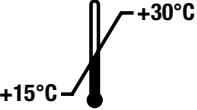















**Achtung:** Kartuschen vorsichtig handhaben. Folienversiegelungen können scharfkantig sein.

**Weitere Informationen:** Die Komponenten des Maxwell® CSC Genomic DNA Kits sind für den gemeinsamen Gebrauch geeignet und haben eine Qualitätskontrollprüfung durchlaufen. Kit-Komponenten verschiedener Chargen dürfen nicht miteinander vermischt werden. Verwenden Sie nur die in dem Kit enthaltenen Komponenten. Weitere Sicherheitsinformationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt unter: [www.promega.com](http://www.promega.com).

## 2. Produktkomponenten, Lagerbedingungen und Symbolerklärung (Fortsetzung)

### Erklärung der Symbole

| Symbol                                                                              | Erklärung                     | Symbol                                                                              | Erklärung                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
|    | In-vitro-Diagnostikum         |    | Bevollmächtigter          |
|    | Bei +15 °C bis +30 °C lagern. |    | Hersteller                |
|    | Gesundheitsrisiko             |    | Ätzend                    |
|    | Reizend                       |    | Leichtentzündlich         |
|    | Europäische Konformität       |    | Ausreichend für „n“ Tests |
|  | Warnung. Quetschgefahr.       |   | Achtung                   |
|  | Chargennummer                 |  | Warnung. Biogefahr.       |
|  | Nicht zur Wiederverwendung    |  | Bestellnummer             |

### 3. Verwendungszweck des Produkts

Das Maxwell® CSC Genomic DNA Kit ist in Kombination mit den Maxwell® CSC Instruments und den Maxwell® CSC und den Maxwell® CSC 48 Genomic DNA-Aufreinigungsmethoden als medizinisches Gerät für die In-vitro-Diagnostik (IVD) zur Durchführung automatisierter Isolierungen genomischer DNA aus humanen biologischen Proben bestimmt. Die aufgereinigte genomische DNA ist für den Einsatz in auf Amplifikation basierenden In-vitro-Diagnostik-Assays geeignet.

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

Das Maxwell® CSC Genomic DNA Kit ist ausschließlich zur Verwendung durch Fachpersonal bestimmt. Diagnostische Ergebnisse, die aus genomischer 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 Genomic DNA Kit wurde anhand von Proben aus humanem Vollblut, Buffy-Coat, Knochenmark und humanen Wangenschleimhaut-Abstrichen, Geweben und Zellen validiert. Seine Verwendung zur Extraktion von DNA aus anderen Probentypen ist vom Benutzer in eigener Verantwortung zu validieren.

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

### 5. Bevor Sie beginnen

#### Vom Nutzer beizubringende Materialien

- Tisch-Vortexmischer
- Pipettierer und Pipettenspitzen für die Übertragung der Proben in die vorgefüllten Reagenzien-Kartuschen
- Es werden 1,5–2,0-ml-Röhrchen für die Probeninkubation empfohlen (z. B. Mikroröhrchen, 1,5 ml [Cat.# V1231]). Andere Röhrchentypen sind durch das Labor zu evaluieren.
- Trockenblock-Heizgerät, Wasserbad- oder Thermomischer, eingestellt auf 56 °C
- Deionisiertes Wasser oder Nuclease-Free Water (Cat.# MC1191) für Zellpellet-Proben (Abschnitt 5.C) und Gewebeproben (Abschnitt 5.E)
- 1X phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) für aus Urin gewonnene Zellpellet-Proben (Abschnitt 5.C)
- **optional:** Clearing Columns (Cat.# Z3871) für Wangenschleimhaut-Abstrichproben (Abschnitt 5.F)
- **optional:** rotierender Röhrchenmischer

## **5.A. Vorbereiten von Vollblut- und Buffy Coat-Proben**

### **Proben-Verarbeitungskapazität**

Der Gesamtertrag an genomischer DNA aus den Vollblut- und den Buffy Coat-Proben ist vom Probenvolumen und der Anzahl der weißen Blutzellen (WBC) pro Milliliter abhängig. Für diese Probentypen kann ein Probenvolumen im Bereich 50–300 µl verwendet werden. Während der Entwicklung wurde aus Vollblut im Bereich  $4 \times 10^6$  bis  $10 \times 10^6$  WBC/ml präpariertes Vollblut und Buffy Coat getestet. Dabei wurde eine akzeptable Leistung festgestellt. Proben außerhalb dieses Bereichs sind ggf. mit der Extraktionschemie kompatibel, sollten jedoch durch das Labor im Hinblick auf die Extraktionsleistung und die Kompatibilität mit nachfolgenden Tests evaluiert werden.

Für Vollblutproben kann ein Elutionsvolumen im Bereich 50–200 µl verwendet werden. Da mit Buffy Coat-Proben im Allgemeinen eine große Menge an genomischer DNA erzielt werden kann, wird das Eluieren mit 200 µl empfohlen, um eine möglichst effektive Elution zu ermöglichen. Elutionsvolumen von 50–200 µl können bei Buffy Coat-Proben zum Einsatz kommen, während Volumen von unter 200 µl u. U. keine optimalen Ergebnisse erzielen.

### **Hinweise:**

- a. Dieses Kit wurde mit aus humanem Vollblut in EDTA-, Citrat- oder Heparinröhrchen präparierten humanen Vollblut- und Buffy Coat-Proben getestet. Die Leistung dieses Kits in Verbindung mit Blutentnahmeröhrchen anderer Typen sollte durch den Benutzer evaluiert werden.
  - b. Dieses Kit wurde mit Blut- und Buffy Coat-Proben getestet, die unter den folgenden Bedingungen gelagert wurden: bei 15–30 °C für bis zu 72 Stunden, bei 2–10 °C für bis zu 7 Tage und bei maximal –65 °C vor der DNA-Aufreinigung. Andere Bedingungen bei der Probenlagerung ermöglichen u. U. eine akzeptable Leistung, sollten jedoch durch das Labor evaluiert werden. Tiefgefrorene Proben sollten vor der Verarbeitung vollständig aufgetaut werden. Alle Blut- und Buffy Coat-Proben sollten vor Gebrauch sorgfältig durchmischt werden.
1. Mischen Sie alle Blut- oder Buffy Coat-Proben mindestens 5 Minuten lang bei 15–30 °C. Dies kann mit einem rotierenden Röhrchenmischer oder intermittierend mit einem Vortexmischer erfolgen.
  2. Für Anweisungen zur Lysatpräparation fahren Sie mit Abschnitt 5.D fort.

## **5.B. Vorbereiten von Knochenmarkaspirat-Proben**

### **Proben-Verarbeitungskapazität**

Der Gesamtertrag an genomischer DNA aus Knochenmarkaspirat-Proben hängt davon ab, wie viele Zellen insgesamt verarbeitet werden. Während der Entwicklung wurden Knochenmarkaspirat-Proben im Volumenbereich 50–300 µl getestet. Dabei wurde eine akzeptable Leistung festgestellt. Proben außerhalb dieses Bereichs sind ggf. mit der Extraktionschemie kompatibel, sollten jedoch durch das Labor im Hinblick auf die Extraktionsleistung und die Kompatibilität mit nachfolgenden Tests evaluiert werden.

Da mit Knochenmarkaspirat-Proben im Allgemeinen eine große Menge an genomischer DNA erzielt werden kann, empfehlen wir das Eluieren mit 200 µl, um eine möglichst effektive Elution zu ermöglichen. Elutionsvolumen von 50–200 µl können bei Knochenmark-Proben zum Einsatz kommen, während Volumen von unter 200 µl u. U. keine optimalen Ergebnisse erzielen.

### **Hinweise:**

- a. Dieses Kit wurde anhand von humanen Knochenmarkaspirat-Proben getestet, die in EDTA-, Citrat- oder Heparinröhrchen entnommen wurden. Die Leistung dieses Kits in Verbindung mit Blutentnahmeröhrchen anderer Typen sollte durch den Benutzer evaluiert werden.
  - b. Dieses Kit wurde anhand von Knochenmarkaspirat-Proben getestet, die vor der DNA-Aufreinigung (bei maximal –65 °C) gefroren gelagert wurden. Andere Bedingungen bei der Probenlagerung ermöglichen u. U. eine akzeptable Leistung, sollten jedoch durch das Labor evaluiert werden. Tiefgefrorene Proben sollten vor der Verarbeitung vollständig aufgetaut werden. Alle Knochenmarkaspirat-Proben müssen vor Gebrauch sorgfältig durchmischt werden.
1. Mischen Sie alle Knochenmarkaspirat-Proben mindestens 30 Minuten lang bei 15–30 °C mit einem rotierenden Röhrchenmischer oder intermittierend mit einem Vortexmischer.
  2. Für Anweisungen zur Lysatpräparation fahren Sie mit Abschnitt 5.D fort.

## 5.C. Vorbereiten von Zellpellet-Proben

### Proben-Verarbeitungskapazität

Zellpellets können aus einer Reihe von Probenotypen wie z. B. aus biologischen Flüssigkeiten (z. B. Urin oder Fruchtwasser), aufgereinigten Zellen (z. B. mononukleare Zellen des peripheren Bluts) oder Zellkulturen erzeugt werden. Durch Zentrifugierung der Probe wird ein Zellpellet erzeugt, und dieses Pellet wird in 300 µl Nuclease-Free Water erneut suspendiert. Wie viel genomische DNA insgesamt aus Zellpellet-Proben gewonnen wird, hängt von der in der Probe enthaltenen Anzahl von Zellen ab. Während der Entwicklung wurden Zellpellets aus bis zu  $5 \times 10^6$  Zellen getestet (siehe Tabelle 2). Dabei wurde eine akzeptable Leistung festgestellt. Proben außerhalb dieses Bereichs sind ggf. mit der Extraktionschemie kompatibel, sollten jedoch durch das Labor im Hinblick auf die Extraktionsleistung und die Kompatibilität mit nachfolgenden Tests evaluiert werden.

**Tabelle 2. Evaluation der Zellpellet-Probentypen.**

| Probenotyp                                       | Getesteter Probenbereich                 | Vorgeschlagenes Elutionsvolumen |
|--------------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------|
| Urin                                             | 15–50 ml                                 | 50 µl                           |
| Fruchtwasser                                     | 1–5 ml                                   | 50 µl                           |
| Mononukleare Zellen des peripheren Bluts (PBMCs) | $5 \times 10^4$ – $5 \times 10^6$ Zellen | 50–200 µl                       |
| Zellkulturen                                     | $5 \times 10^2$ – $5 \times 10^6$ Zellen | 50–200 µl                       |

Verwenden Sie für die Zellpellet-Proben ein Elutionsvolumen im Bereich 50–200 µl. Bei der Verarbeitung von Proben, bei denen eine geringe Anzahl von Zellen im Zellpellet erzeugt wird, wird empfohlen, ein Elutionsvolumen von 50 µl zu verwenden. Bei Proben mit mehr Zellen kann ein größeres Elutionsvolumen zu höheren Erträgen an genomischer DNA führen. Labore sollten sich vergewissern, dass das Elutionsvolumen für einen bestimmten Zellpellet-Probentyp eine ausreichende Reinheit und Konzentration für ihren nachfolgenden Assay bietet.

### Hinweise:

- a. Dieses Kit wurde anhand von Zellpellet-Proben getestet, die unmittelbar nach Erzeugung der Zellpellets verarbeitet und vor der DNA-Aufreinigung gefroren gelagert wurden (bei maximal  $-65^\circ\text{C}$ ). Andere Bedingungen bei der Probenlagerung ermöglichen u. U. eine akzeptable Leistung, sollten jedoch durch das Labor evaluiert werden. Tiefgefrorene Proben sollten vor der Verarbeitung vollständig aufgetaut werden.
  - b. Wenn gewünscht wird, dass die Proben eingefroren werden, sollten die Proben nach Erzeugung der Zellpellets gefroren gelagert werden. Die Gewinnung eines Zellpellets aus einer Probe, die gefroren und aufgetaut wurde, kann zu einer geringeren Leistung führen.
1. Zentrifugieren Sie das gewünschte Probenvolumen 20 Minuten lang bei einer Geschwindigkeit von mindestens  $2.000 \times g$ , um ein Zellpellet zu erzeugen.
    - a. Bei Urinproben waschen Sie das Zellpellet, indem Sie es in 750 µl 1X PBS erneut suspendieren.
    - b. Zentrifugieren Sie die in PBS suspendierte Probe, um ein Zellpellet zu erzeugen.
  2. Dekantieren oder aspirieren Sie die Flüssigkeit aus den Zellpellets. Suspendieren Sie das Pellet erneut in 300 µl Nuclease-Free Water.
  3. Für Anweisungen zur Lysatpräparation fahren Sie mit Abschnitt 5.D fort.

## **5.D. Vorbereiten von Lysaten aus Vollblut-, Buffy Coat-, Knochenmark- und Zellpellet-Proben**

1. Bereiten Sie die Inkubationsröhrchen für einen auf 56 °C eingestellten Heizblock vor und etikettieren Sie sie.
2. Geben Sie zu jedem Inkubationsröhrchen 30 µl Proteinase K-(PK)-Lösung hinzu.
3. Übertragen Sie das gewünschte Probenvolumen in die einzelnen Inkubationsröhrchen. Wechseln Sie zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen nach jeder Probenübertragung die Pipettenspitze.  
**Hinweis:** Das Übertragen klumpiger, fettiger oder sonstiger fester Stoffe in das Inkubationsröhrchen kann zu einer schlechten Probenlyse führen. Übertragen Sie nur flüssige Proben in die Inkubationsröhrchen.
4. Verschließen Sie die einzelnen Röhrchen und vortexieren Sie sie 10 Sekunden lang bei maximaler Geschwindigkeit.
5. Geben Sie jedem Inkubationsröhrchen 300 µl Lytischen Enhancer (LE2) hinzu. Wechseln Sie zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen jedes Mal, wenn der Lytische Enhancer (LE2) dispensiert wurde, die Pipettenspitzen.  
**Hinweis:** Fahren Sie ohne zu Mischen oder zu Vortexieren mit Schritt 6 fort.
6. Geben Sie zu jedem Inkubationsröhrchen 300 µl Lyse-Pufferlösung hinzu. Wechseln Sie zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen jedes Mal, wenn die Lyse-Pufferlösung dispensiert wurde, die Pipettenspitzen.
7. Verschließen Sie die einzelnen Röhrchen und vortexieren Sie sie 10 Sekunden lang bei maximaler Geschwindigkeit.  
**Hinweis:** Vergewissern Sie sich, dass das Vortexieren zu einem homogenen Lysat geführt hat.
8. Inkubieren Sie jedes Röhrchen 20 Minuten lang in dem 56 °C-Heizblock. Bereiten Sie während dieser Inkubation, wie in Abschnitt 5.G beschrieben, die Maxwell® CSC Cartridges vor.
9. Vortexieren Sie jedes Röhrchen 10 Sekunden lang bei maximaler Geschwindigkeit.
10. Übertragen Sie jede Lysatprobe aus dem Inkubationsröhrchen in Kammer 1 einer separaten Kartusche und vermischen Sie sie gut mit der Bindungslösung in Kammer 1, indem Sie nach der Übertragung 5–10-mal aspirieren und dispensieren, um eine homogene Mischung herzustellen (Kammer 1 ist die größte Kammer in der Kartusche). Wechseln Sie zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen der Probe nach jeder Probenübertragung die Pipettenspitze.  
**Hinweis:** Wird in Kammer 1 der Kartusche keine homogene Mischung aus Probenlysat und Bindungslösung hergestellt, kann dies zu einem geringeren Ertrag und verminderter Reinheit im endgültigen Eluat führen.

## 5.E. Vorbereiten von Lysaten aus Gewebeproben

### Proben-Verarbeitungskapazität

Der Gesamtertrag an genomischer DNA aus Gewebeproben hängt von der Masse und vom Typ des verarbeiteten Gewebes ab. Für Gewebeproben kann ein Probenvolumen im Bereich 5–50 mg verwendet werden. Während der Entwicklung wurden als Musterbeispiele Herz-, Pankreas-, Hirn- und Brustgewebeproben evaluiert. Dabei wurde eine akzeptable Leistung festgestellt. Es sind ggf. noch weitere Gewebetypen außerhalb dieses Bereichs mit der Extraktionschemie kompatibel. Diese sollten jedoch durch das Labor im Hinblick auf die Extraktionsleistung und die Kompatibilität mit nachfolgenden Tests evaluiert werden.

Für Gewebeproben kann ein Elutionsvolumen im Bereich 50–200 µl verwendet werden. Wie viel Elutions-Puffer benötigt wird, hängt von der Masse und vom Typ des verarbeiteten Gewebes ab. Labore sollten evaluieren, welche Elutionsvolumen bei den verarbeiteten Gewebemassen und -typen in ihren nachfolgenden Tests eine akzeptable Leistung bieten.

**Hinweis:** Dieses Kit wurde anhand von Gewebeproben getestet, die vor der DNA-Aufreinigung gefroren (bei maximal –65 °C) gelagert wurden. Andere Bedingungen bei der Probenlagerung ermöglichen u. U. eine akzeptable Leistung, sollten jedoch durch das Labor evaluiert werden. Tiefgefrorene Proben sollten vor der Verarbeitung vollständig aufgetaut werden.

1. Stellen Sie die Temperatur eines Heizblocks, Wasserbads oder Thermomischers auf 56 °C ein, um die Gewebeproben zu lysieren. Bereiten Sie die Inkubationsröhrchen vor und etikettieren Sie sie.
2. Übertragen Sie 5–50 mg Gewebe in jedes Röhrchen. Wird das Gewebe in kleinere Fragmente zerschnitten, kann sich die Lyse-Zeit verringern. Zentrifugieren Sie das Röhrchen 15 Sekunden lang bei maximaler Geschwindigkeit, um die Gewebestücke am Boden des Röhrchens zu erfassen.
3. Geben Sie 300 µl Nuclease-Free Water (Cat.# MC1191 oder ein gleichwertiges Produkt) zu jedem Inkubationsröhrchen hinzu.
4. Geben Sie zu jedem Inkubationsröhrchen 30 µl Proteinase K-(PK-)Lösung hinzu. Wechseln Sie zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen jedes Mal, wenn die Proteinase K-(PK-)Lösung dispensiert wurde, die Pipettenspitzen.
5. Verschließen Sie die einzelnen Röhrchen und vortexieren Sie sie 10 Sekunden lang bei maximaler Geschwindigkeit.
6. Geben Sie jedem Inkubationsröhrchen 300 µl Lytischen Enhancer (LE2) hinzu. Wechseln Sie zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen jedes Mal, wenn der Lytische Enhancer (LE2) dispensiert wurde, die Pipettenspitzen.
7. Verschließen Sie die einzelnen Röhrchen und vortexieren Sie sie 10 Sekunden lang bei maximaler Geschwindigkeit.
8. Inkubieren Sie jedes Röhrchen bei 56 °C unter Anwendung einer der folgenden Optionen:
  - a. Mit einem Thermomischer, bis zu 2 Stunden lang bei hoher Schüttelgeschwindigkeit (z. B. 1.500 U/min).
  - b. Mit einem Trockenblock-Heizgerät oder einem Wasserbad-Heizgerät, mindestens 16 Stunden lang ohne zu schütteln.
9. Vortexieren Sie jedes Röhrchen 10 Sekunden lang bei maximaler Geschwindigkeit.

10. Zentrifugieren Sie jedes Röhrchen 5 Minuten lang bei maximaler Geschwindigkeit in einer Mikrozentrifuge, um aus nicht ausgeschlossenen Material Pellets herzustellen.
11. Übertragen Sie den gesamten Überstand aus jedem Inkubationsröhrchen in ein neues Röhrchen. Vermeiden Sie es, pelletiertes Material zu übertragen. Falls nach dem Zentrifugieren oben auf der Probe eine deutliche Fettschicht zu erkennen ist, übertragen Sie diese Schicht nicht in das neue Röhrchen.
12. Geben Sie zu jedem neuen Röhrchen 300 µl Lyse-Pufferlösung hinzu. Wechseln Sie zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen jedes Mal, wenn die Lyse-Pufferlösung dispensiert wurde, die Pipettenspitzen.
13. Verschließen Sie die einzelnen Röhrchen und vortexieren Sie sie 10 Sekunden lang bei maximaler Geschwindigkeit.
14. Bereiten Sie die Kartuschen wie in Abschnitt 5.G beschrieben vor.
15. Übertragen Sie die Gewebelysat-Probe aus jedem Röhrchen in Kammer 1 einer separaten Kartusche und vermischen Sie sie gut mit der Bindungslösung in Kammer 1, indem Sie nach der Übertragung 10-mal aspirieren und dispensieren, um eine homogene Mischung herzustellen (Kammer 1 ist die größte Kammer in der Kartusche). Wechseln Sie zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen der Probe nach jeder Probenübertragung die Pipettenspitze.

**Hinweise:**

- a. Wenn Sie das Gewebepellet oder die fettige Schicht aus dem Inkubationsröhrchen in das neue Röhrchen übertragen, kann dies zu einem schlechten Ertrag oder Unreinheiten führen.
- b. Wird in Kammer 1 der Kartusche keine homogene Mischung aus Probenlysat und Bindungslösung hergestellt, kann dies zu einem geringeren Ertrag und verminderter Reinheit im endgültigen Eluat führen.

## **5.F. Vorbereiten von Lysaten aus Wangenschleimhaut-Abstrichproben**

### **Proben-Verarbeitungskapazität**

Wie viel genomische DNA aus Wangenschleimhaut-Abstrichproben gewonnen wird, hängt davon ab, wie gut die Wangenschleimhautzellen auf den Abstrichtupfer übertragen werden. Während der Entwicklung wurden 1 und 2 Wangenschleimhaut-Abstrichproben getestet. Dabei wurde eine akzeptable Leistung festgestellt. Für Wangenschleimhaut-Abstrichproben kann ein Elutionsvolumen im Bereich 50–200 µl verwendet werden. Labore sollten für Wangenschleimhaut-Abstrichproben ein Elutionsvolumen wählen, das eine ausreichende Reinheit und Konzentration für ihren nachfolgenden Assay bietet.

**Hinweis:** Dieses Kit wurde anhand von trockenen Wangenschleimhaut-Abstrichproben getestet, die vor der DNA-Aufreinigung bei 15–30 °C gelagert wurden. Andere Bedingungen bei der Probenlagerung ermöglichen u. U. eine akzeptable Leistung, sollten jedoch durch das Labor evaluiert werden.

1. Bereiten Sie die 1,5–2,0-ml-Inkubationsröhrchen für einen auf 56 °C eingestellten Heizblock vor und etikettieren Sie sie.
2. **Optional:** Platzieren Sie in jedem Inkubationsröhrchen ein Clearing Column (Cat. # Z3871).
3. Platzieren Sie 1–2 Wangenschleimhaut-Abstrichtupferköpfe oder eine Clearing Column in jedem Inkubationsröhrchen. Entfernen Sie das Stäbchen aus den Wangenschleimhaut-Abstrichtupferköpfen, indem Sie das Stäbchen oberhalb des Tupferkopfs abschneiden oder abbrechen, sodass das Röhrchen oder die Clearing Column mit dem Abstrichtupferkopf verschlossen werden kann.

**5.F. Vorbereiten von Lysaten aus Wangenschleimhaut-Abstrichproben (Fortsetzung)**

4. Kombinieren Sie in einem separaten Röhrchen 300 µl Lytischen Enhancer (LE2) mit 30 µl Proteinase K-(PK-) Lösung für jede Probe plus eine Extraprobe. Siehe die nachfolgende Tabelle. Um beispielsweise 16 Proben zu verarbeiten, bereiten Sie einen Master Mix für 17 Reaktionen vor, indem Sie  $300 \mu\text{l} \times 17 = 5.100 \mu\text{l}$  Lytischen Enhancer (LE2) und  $30 \mu\text{l} \times 17 = 510 \mu\text{l}$  Proteinase K kombinieren.

| Reagenz                  | Menge Pro Reaktion | Reaktionen<br>(Probenzahl + 1) | Insgesamt                        |
|--------------------------|--------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Lytischer Enhancer (LE2) | 300 µl             | n+1                            | $300 \times (n + 1) \mu\text{l}$ |
| Proteinase-K-(PK-)Lösung | 30 µl              | n+1                            | $30 \times (n + 1) \mu\text{l}$  |

5. Mischen Sie die Lösung aus Lytischem Enhancer (LE2) und Proteinase K (PK), indem Sie das Röhrchen mindesten 10-mal umdrehen.
6. Geben Sie jeder Probe 330 µl Lösung aus Lytischem Enhancer (LE2) und Proteinase K (PK) hinzu und verschließen Sie das Röhrchen. Wechseln Sie zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen jedes Mal, wenn die Lytische Enhancer-(LE2-)/ K-(PK-)Lösung dispensiert wurde, die Pipettenspitzen.
7. Inkubieren Sie jedes Röhrchen 20 Minuten lang bei 56 °C. Bereiten Sie während dieser Inkubation, wie in Abschnitt 5.G beschrieben, die Kartuschen vor.
8. Verwenden Sie eine der folgenden Optionen, um den Kopf des Abstrichtupfers aus dem Röhrchen zu entfernen:
- Platzieren Sie das Röhrchen bei Verwendung einer Clearing Column in einer Mikrozentrifuge und zentrifugieren Sie es 2 Minuten lang bei maximaler Geschwindigkeit. Nehmen Sie das Röhrchen aus der Mikrozentrifuge. Öffnen Sie das Röhrchen; entfernen Sie die Clearing Column mit den Abstrichtupferköpfen und entsorgen Sie sie.
  - Wenn Sie keine Clearing Column verwenden, entfernen Sie die Abstrichtupferköpfe mithilfe einer Pinzette aus dem Röhrchen und drücken Sie das restliche Lysat vorsichtig aus den Abstrichtupferköpfen. Entsorgen Sie die Abstrichtupferköpfe. Reinigen Sie die Pinzette und wechseln Sie die Handschuhe, nachdem Sie jeweils einen Abstrichtupferkopf entfernt haben, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
9. Geben Sie 300 µl Lyse-Pufferlösung zu Kammer 1 jeder Kartusche hinzu, die Sie verwenden (Kammer 1 ist die größte Kammer in der Kartusche).
10. Übertragen Sie jede Abstrichtupfer-Lysatprobe aus dem Inkubationsröhrchen in Kammer 1 einer separaten Kartusche und vermischen Sie sie mit der Lyse-Pufferlösung und der Bindungslösung in Kammer 1, indem Sie nach der Übertragung 5–10-mal aspirieren und dispensieren, um eine homogene Mischung herzustellen (Kammer 1 ist die größte Kammer in der Kartusche). Wechseln Sie zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen der Probe nach jeder Probenübertragung die Pipettenspitze.

**Hinweis:** Wird in Kammer 1 der Kartusche keine homogene Mischung aus Probenlysat, Lyse-Pufferlösung und Bindungslösung hergestellt, kann dies zu einem geringeren Ertrag und verminderter Reinheit im endgültigen Eluat führen.

## 5.G. Vorbereiten der Maxwell® CSC Genomic DNA Cartridge

1. Wechseln Sie die Handschuhe, bevor Sie Kartuschen, CSC/RSC-Stöbel und Elutions-Gefäße (0,5 ml) handhaben. Die Kartuschen werden in der oder den Kartuschenhalterung(en) außerhalb des Geräts vorbereitet, bevor die Kartuschenhalterung(en) mit den Kartuschen und Proben zur Aufreinigung in das Gerät gestellt werden. 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. Geben Sie 15 µl RNase A-Lösung zu Kammer 3 der Maxwell® CSC Cartridge (CSCQ) hinzu.
3. Platzieren Sie einen Stöbel in Kammer 8 jeder Kartusche.
4. Platzieren Sie in allen Kartuschen ein leeres Elutions-Gefäß an die hierfür vorgesehene Position in der oder den Kartuschenhalterung(en).

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

5. Geben Sie 50–200 µl der Elutions-Pufferlösung unten in jedes Elutions-Gefäß.

**Hinweis:** Verwenden Sie nur die Elutions-Pufferlösung, die im Lieferumfang des Maxwell® CSC Genomic DNA Kits enthalten ist. Die Verwendung anderer Elutions-Pufferlösungen kann die DNA-Aufreinigungsleistung beeinträchtigen.

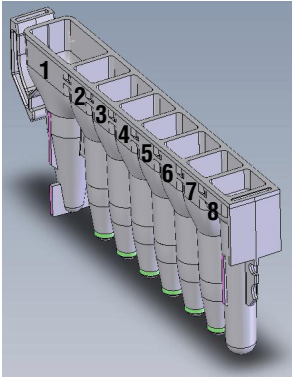
6. Fahren Sie fort mit Abschnitt 6, Maxwell® Gerätelauf.

## 5.G. Vorbereiten der Maxwell® CSC Genomic DNA Cartridge (Fortsetzung)

### Hinweise zur Vorbereitung der Maxwell® CSC Genomic DNA 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 hinzugeben

1. Lysierte Probe
3. 15 µl RNase A-Lösung
8. CSC/RSC-Stößel

**Abbildung 1. Maxwell® CSC Cartridge.** Die lysierte Probe wird zu Kammer 1 hinzugegeben, 15 µl RNase A-Lösung wird zu Kammer 3 hinzugegeben und in Kammer 8 wird ein Stößel gesetzt.



**Abbildung 2. Anordnung und Konfiguration der Kartuschenhalterung(en).** In die Elutions-Gefäße wird, wie angegeben, Elutions-Pufferlösung gegeben. Die abgebildete Kartuschenhalterung gehört zum Maxwell® CSC Instrument (Cat.# AS6000).

## 6. Maxwell® Gerätelauf

Ausführliche Informationen hierzu finden Sie im entsprechenden technischen Handbuch zu Ihrem Maxwell® CSC Instrument. Siehe Tabelle 1.

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 Startbildschirm auf **Start**.
3. Scannen Sie den Barcode auf dem Etikett des Maxwell® CSC Genomic DNA Kit oder geben Sie ihn ein und tippen Sie dann auf **OK**, um das auszuführende Verfahren automatisch auszuwählen (Abbildung 3).

**Hinweis:** Der Verfahrens-Barcode des Maxwell® CSC Genomic DNA 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.** Der Barcode, der gescannt werden muss, um einen Aufreinigungslauf zu starten, ist in der roten Umrandung oben rechts auf dem Kit-Etikett aufgedruckt.

4. Vergewissern Sie sich auf dem Bildschirm „Kartuschen-Einrichtung“, dass die Maxwell® CSC Genomic DNA-Methode oben auf dem Bildschirm angezeigt wird. Tippen Sie 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 Kartuschenposition für die jeweilige Kartuschenhalterung festzulegen oder aufzuheben.

## 6. Maxwell® Gerätelauf (Fortsetzung)

- Überprüfen Sie nach dem Öffnen der Tür, ob alle Elemente der Checkliste Extraktion ausgeführt 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 auf die Maxwell® Instrument Plattform.

**Einsetzen der Maxwell® Kartuschenhalterung(en):** Halten Sie die Kartuschenhalterung an den Seiten fest, damit keine Kartuschen herausfallen. Die Kartuschenhalterung muss so in das Maxwell® Instrument eingesetzt werden, 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.

- Tippen Sie auf die Schaltfläche **Start**, um den Extraktionslauf zu starten. Die Plattform fährt ein, die Tür schließt sich.



**Warnung:** Quetschgefahr.

**Hinweis:** Wenn Sie ein Maxwell® Instrument mit 48 Positionen verwenden und das Vision System aktiviert ist, werden die Kartuschenhalterungen gescannt, sobald die Plattform eingezogen wird. 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.

- Das Maxwell® Instrument beginnt sofort mit dem Aufreinigungslauf. Auf dem Bildschirm werden die aktuell durchgeführten Schritte sowie die ungefähre Restlaufzeit angezeigt.

### **Hinweise:**

- Wenn Sie auf die Schaltfläche **Abbruch** tippen, wird der aktuelle Lauf abgebrochen. Alle Proben aus einem abgebrochenen Lauf gehen verloren.
  - 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.
- 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 Stößel am Ende des Laufs in Kammer 8 der Kartusche befinden. Sind noch Stößel an der Stößelhalterung geladen, befolgen Sie die Anweisungen im entsprechenden technischen Handbuch zu Ihrem Maxwell® Instrument (siehe Tabelle 1) und führen Sie das Verfahren **Reinigung** durch, um die Stößel zu entladen, sofern möglich.
10. Nehmen Sie sofort nach dem Lauf die Kartuschenhalterung(en) aus dem Gerät, um zu verhindern, dass die Eluate verdunsten. Entnehmen Sie die Elutions-Gefäße mit der DNA und verschließen Sie die Gefäße.  
**Hinweis:** Nach dem automatisierten Aufreinigungsverfahren ist bzw. sind die Kartuschenhalterung(en) heiß. Zum Entnehmen einer Kartuschenhalterung aus der Geräteplattform müssen Sie diese an den Seiten halten.  
Entnehmen Sie unbedingt die Proben aus dem Gerät, bevor die UV-Reinigung durchgeführt wird, um zu verhindern, dass die Nukleinsäure Schaden nimmt.
11. Entnehmen Sie die Kartuschen und Stößel aus der oder den Maxwell® Kartuschenhalterung(en). Entsorgen Sie sie gemäß den Richtlinien Ihres Instituts für gefährliche Materialien. 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 DNA-Probe und die Reinheit die eingegebenen Anforderungen für das entsprechende nachfolgende Diagnostik-Assay erfüllen.

## 8. Evaluierung der analytischen Leistung

Die Evaluierung der analytischen Leistung wurde mit dem Maxwell® CSC Genomic DNA Kit und dem Maxwell® CSC Instrument an Humanproben durchgeführt.

### 8.A. DNA-Ertrag

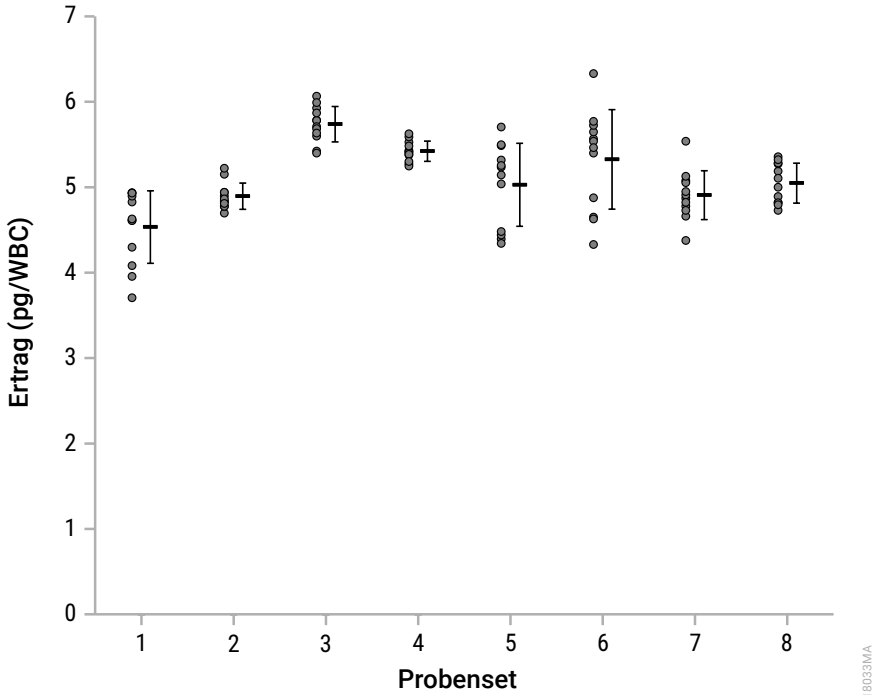
Der DNA-Ertrag wurde anhand von DNA bewertet, die mit dem Maxwell® CSC Genomic DNA Kit aus frischem und gefrorenem Vollblut in EDTA-Röhrchen, aus gefrorenem Vollblut in Citrat- und Heparinröhrchen, frischen und gefrorenen Buffy Coat-Proben aus Vollblut in EDTA-Röhrchen, gefrorenen Buffy Coat-Proben aus Vollblut in Citrat- und Heparinröhrchen mithilfe einer oder zweier mit einer Clearing Column vorverarbeiteter Wangenschleimhaut-Abstriche, aus Herz-, Pankreas- und Hirngewebe, Gewebezellkulturen und gefrorenen Knochenmarkaspiraten in EDTA-, Citrat- und Heparinröhrchen aufgereinigt wurde.

Die Grafiken und Tabellen in diesem Abschnitt stellen den Absorptionsertrag jedes Replikats dar, das für jeden Probentyp aufgereinigt wurde. Jeder Punkt in den Grafiken auf der linken Seite stellt eine einzelne Messung dar, während der Mittelwert mit der Standardabweichung rechts dargestellt ist. Jedes Dataset beinhaltet insgesamt 12 Replikate, und zwar 4 mit dem Maxwell® CSC Instrument aufgereinigte Replikate und 8 mit dem Maxwell® CSC 48 Instrument aufgereinigte Replikate.

In den Tabellen unter den Abbildungslegenden sind die Probeninformationen der einzelnen Probensets beschrieben, die in den zugehörigen Grafiken dargestellt sind.

**8.A. DNA-Ertrag (Fortsetzung)**

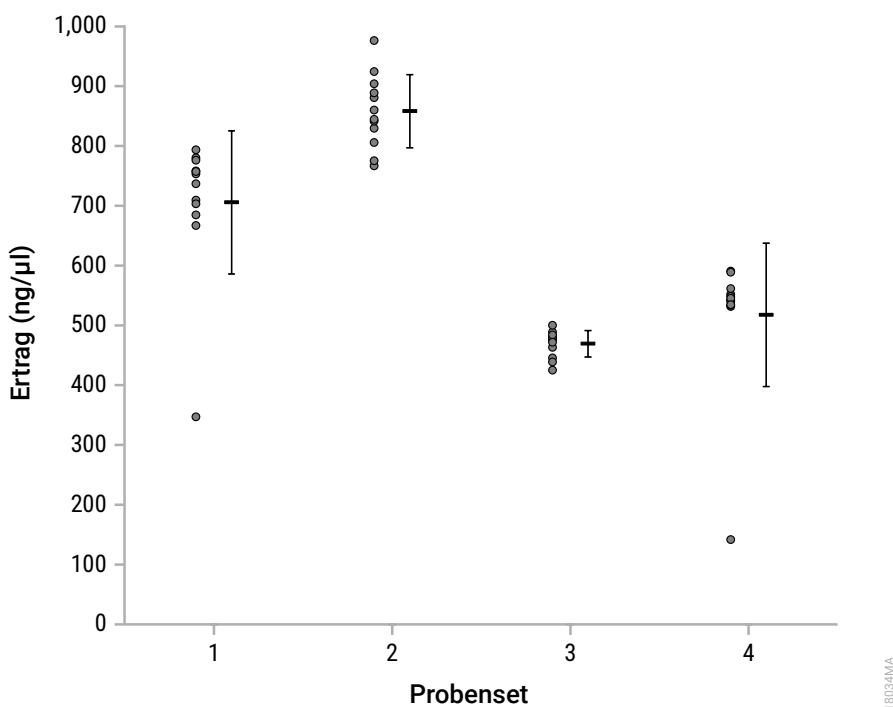
**Vollblut**



**Abbildung 4. Vollblut-DNA-Ertrag.** Bei 300 µl frischer und gefrorener Vollblutproben in EDTA-Röhrchen und gefrorener Vollblutproben in Citrat- und Heparinröhrchen lagen die durchschnittlichen DNA-Erträge im Bereich 4,5–5,7 pg/WBC.

| Probenset | Antikoagulans | Lagerung | Ausgangsvolumen (µl) | Elutionsvolumen (µl) |
|-----------|---------------|----------|----------------------|----------------------|
| 1         | EDTA          | Gefroren | 300                  | 50                   |
| 2         | EDTA          | Gefroren | 300                  | 200                  |
| 3         | EDTA          | Frisch   | 300                  | 50                   |
| 4         | EDTA          | Frisch   | 300                  | 200                  |
| 5         | Citrat        | Gefroren | 300                  | 50                   |
| 6         | Citrat        | Gefroren | 300                  | 200                  |
| 7         | Heparin       | Gefroren | 300                  | 50                   |
| 8         | Heparin       | Gefroren | 300                  | 200                  |

## Buffy Coat

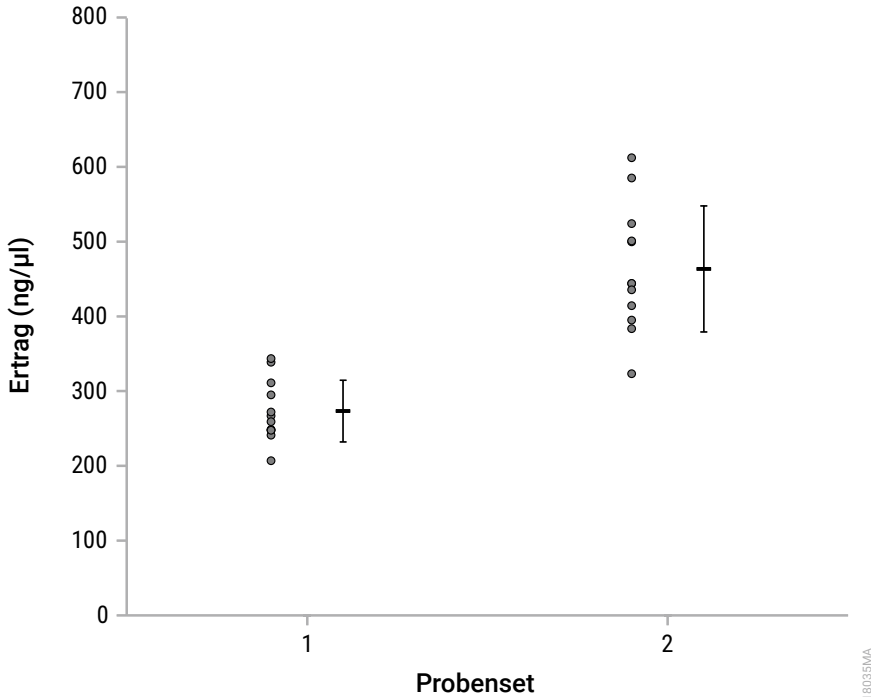


**Abbildung 5. Buffy Coat-DNA-Ertrag.** Bei einem Ausgangsvolumen von 300 µl und einem Elutionsvolumen von 200 µl aus frischen und gefrorenen Buffy Coat-Proben aus Vollblut in EDTA-Röhrchen und gefrorenen Buffy Coat-Proben aus Vollblut in Citrat- und Heparinröhrchen lagen die DNA-Konzentrationen durchschnittlich im Bereich 469,3–858,2 ng/µl.

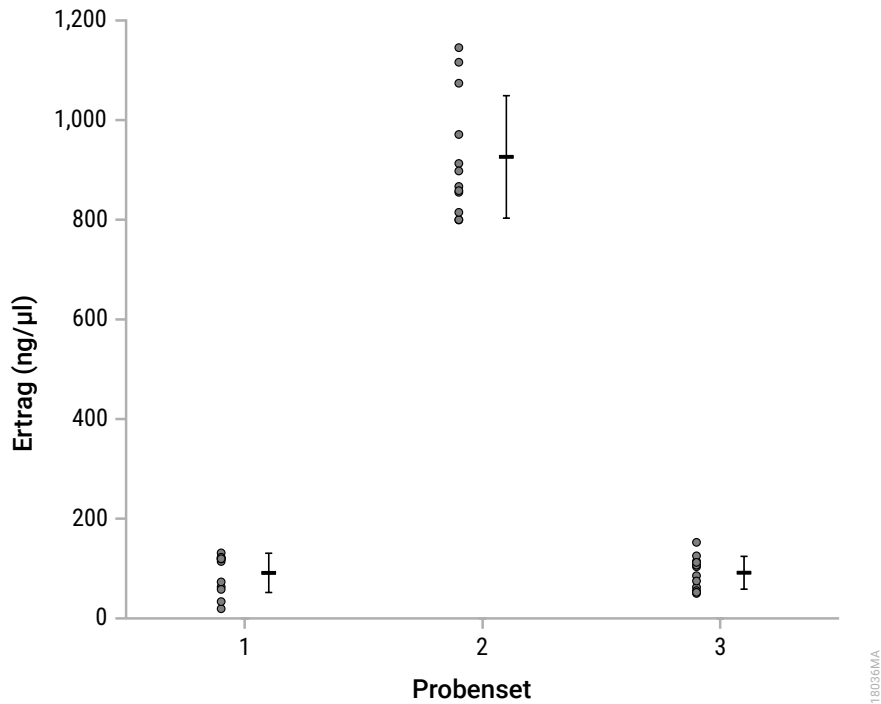
| Probenset | Antikoagulans | Lagerung | Ausgangsvolumen (µl) | Elutionsvolumen (µl) |
|-----------|---------------|----------|----------------------|----------------------|
| 1         | EDTA          | Gefroren | 300                  | 200                  |
| 2         | EDTA          | Frisch   | 300                  | 200                  |
| 3         | Citrat        | Gefroren | 300                  | 200                  |
| 4         | Heparin       | Gefroren | 300                  | 200                  |

### 8.A. DNA-Ertrag (Fortsetzung)

#### Wangenschleimhaut-Abstrich



**Abbildung 6. DNA-Ertrag aus Wangenschleimhaut-Abstrich.** Bei einem oder zwei mit einer Clearing Column vorverarbeiteten Wangenschleimhaut-Abstrichtupfern lagen die DNA-Konzentrationen durchschnittlich im Bereich 273,2–463,5 ng/µl. Probenset 1 bezieht sich auf einen Abstrichtupfer, und Probenset 2 bezieht sich auf zwei Abstrichtupfer. Bei allen Proben wurde ein Elutionsvolumen von 50 µl verwendet.

**Gewebe**


**Abbildung 7. Gewebe-DNA-Ertrag.** Bei 50 mg Herz-, Pankreas- und Hirngewebe mit einem Elutionsvolumen von 200 µl lagen die DNA-Konzentrationen durchschnittlich im Bereich 91,2–926,0 ng/µl. Probenset 1 bezieht sich auf Herzgewebe, Probenset 2 auf Pankreasgewebe und Probenset 3 auf Hirngewebe.

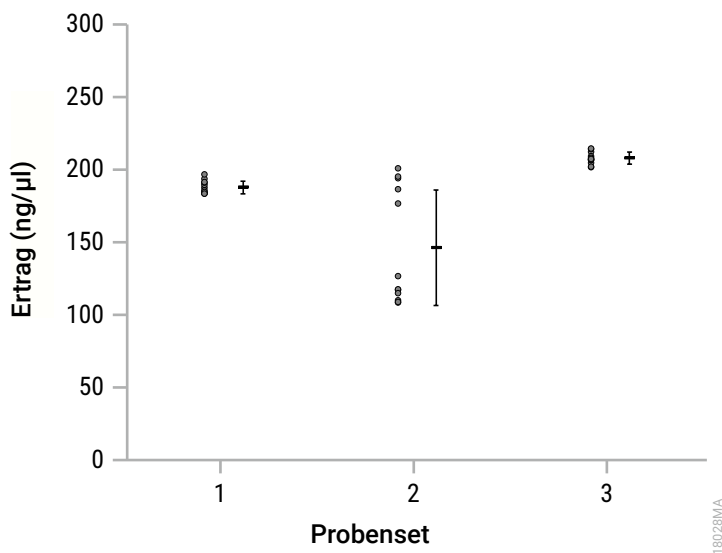
## 8.A. DNA-Ertrag (Fortsetzung)

### Zellen

Bei  $5 \times 10^6$  HEK293-Gewebezellkulturen mit einem Elutionsvolumen von 200  $\mu\text{l}$  betrug die durchschnittliche DNA-Konzentration 550,2 ng/ $\mu\text{l}$ .

| Zelltyp                   | Ausgangs-Zellenzahl | Elutionsvolumen   | Konzentration (ng/ $\mu\text{l}$ ) |
|---------------------------|---------------------|-------------------|------------------------------------|
| HEK293-Gewebezellkulturen | $5 \times 10^6$     | 200 $\mu\text{l}$ | 523,4                              |
|                           |                     |                   | 526,8                              |
|                           |                     |                   | 536,1                              |
|                           |                     |                   | 650,1                              |
|                           |                     |                   | 481,6                              |
|                           |                     |                   | 522,9                              |
|                           |                     |                   | 530,4                              |
|                           |                     |                   | 618,9                              |
|                           |                     |                   | 546,5                              |
|                           |                     |                   | 550,1                              |
|                           |                     |                   | 569,9                              |
| 545,4                     |                     |                   |                                    |
| <b>Durchschnitt</b>       |                     |                   | 550,2                              |

## Knochenmark



**Abbildung 8. Knochenmark-DNA-Ertrag.** Bei 300 µl gefrorenen Knochenmarkaspirats in EDTA-, Citrat- und Heparinröhrchen und bei einem Elutionsvolumen von 200 µl lagen die DNA-Konzentrationen durchschnittlich im Bereich 146,3–207,8 ng/µl. Probenset 1 bezieht sich auf Knochenmarkaspirate in EDTA-Röhrchen, Probenset 2 bezieht sich auf Knochenmarkaspirate in Citrat-Röhrchen, und Probenset 3 bezieht sich auf Knochenmarkaspirate in Heparinröhrchen.

### 8.B. DNA-Qualität (Reinheit)

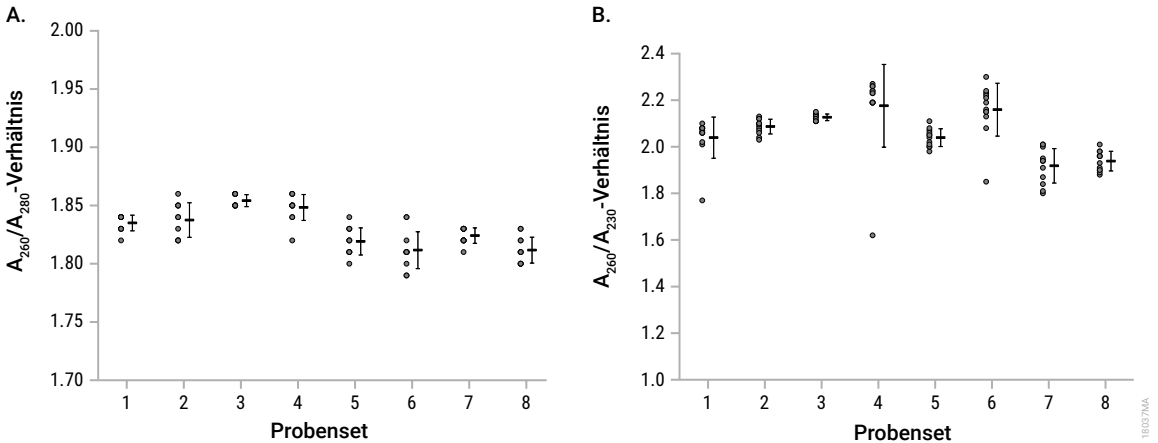
Die DNA-Reinheit wurde anhand von DNA bewertet, die mit dem Maxwell® CSC Genomic DNA Kit aus frischem und gefrorenem Vollblut in EDTA-Röhrchen, aus gefrorenem Vollblut in Citrat- und Heparinröhrchen, frischen und gefrorenen Buffy Coat-Proben aus Vollblut in EDTA-Röhrchen, gefrorenen Buffy Coat-Proben aus Vollblut in Citrat- und Heparinröhrchen mithilfe einer oder zweier mit einer Clearing Column vorverarbeiteter Wangenschleimhaut-Abstriche, aus Herz-, Pankreas- und Hirngeweben, Gewebezellkulturen und gefrorenen Knochenmarkaspiraten in EDTA-, Citrat- und Heparinröhrchen aufgereinigt wurde.

Die Grafiken und Tabellen in diesem Abschnitt stellen Absorptions- $A_{260}/A_{280}$ - und  $A_{260}/A_{230}$ -Reinheitsverhältnisse jedes Replikats dar, das für jeden Probentyp aufgereinigt wurde. Jeder Punkt in den Grafiken auf der linken Seite stellt eine einzelne Messung dar, während der Mittelwert mit der Standardabweichung rechts dargestellt ist. Jedes Dataset beinhaltet insgesamt 12 Replikate, und zwar 4 mit dem Maxwell® CSC Instrument aufgereinigte Replikate und 8 mit dem Maxwell® CSC 48 Instrument aufgereinigte Replikate.

In den Tabellen unter den Abbildungslegenden sind die Probeninformationen der einzelnen Probensets beschrieben, die in den zugehörigen Grafiken dargestellt sind.

## 8.B. DNA-Qualität (Reinheit; Fortsetzung)

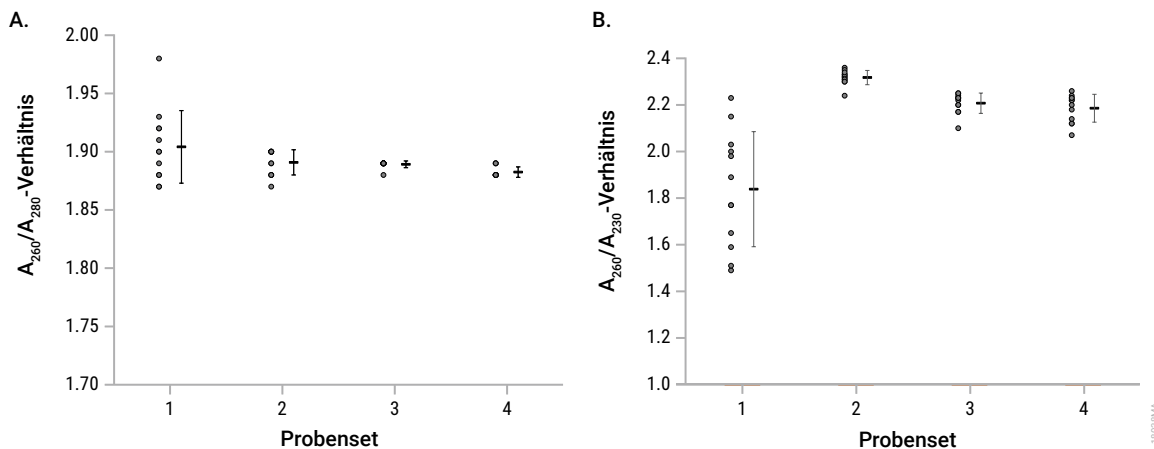
### Vollblut



**Abbildung 9. Vollblut-DNA-Qualität.** Bei 300 µl frischer und gefrorener Vollblutproben in EDTA-Röhrchen und gefrorener Vollblutproben in Citrat- und Heparinröhrchen, lag das  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis durchschnittlich im Bereich 1,8–1,9 (**Bild A**) während das  $A_{260}/A_{230}$ -Verhältnis durchschnittlich im Bereich 1,9–2,2 lag (**Bild B**).

| Probenset | Antikoagulans | Lagerung | Ausgangsvolumen (µl) | Elutionsvolumen (µl) |
|-----------|---------------|----------|----------------------|----------------------|
| 1         | EDTA          | Gefroren | 300                  | 50                   |
| 2         | EDTA          | Gefroren | 300                  | 200                  |
| 3         | EDTA          | Frisch   | 300                  | 50                   |
| 4         | EDTA          | Frisch   | 300                  | 200                  |
| 5         | Citrat        | Gefroren | 300                  | 50                   |
| 6         | Citrat        | Gefroren | 300                  | 200                  |
| 7         | Heparin       | Gefroren | 300                  | 50                   |
| 8         | Heparin       | Gefroren | 300                  | 200                  |

## Buffy Coat

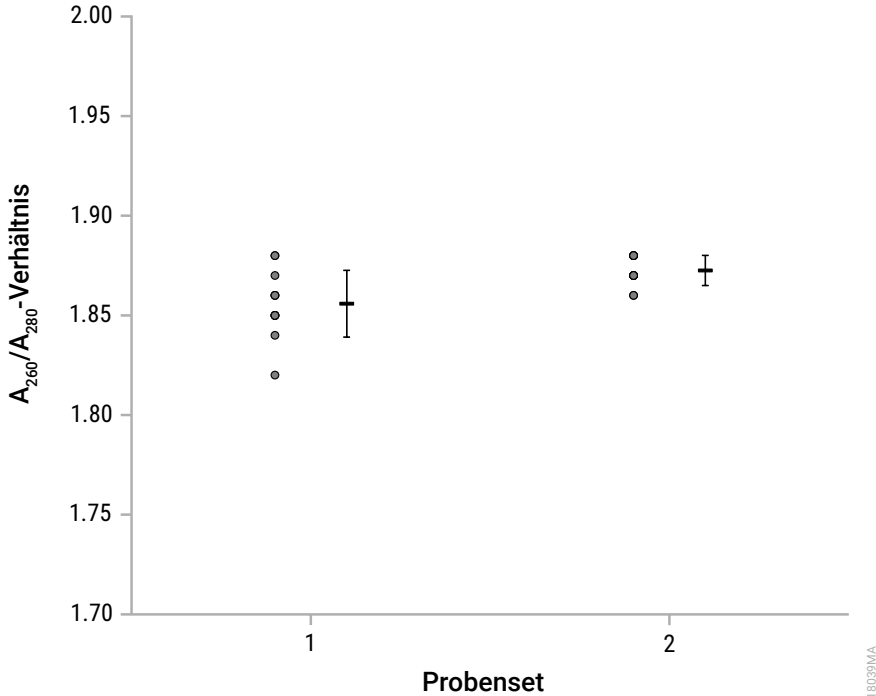


**Abbildung 10. Buffy Coat-DNA-Qualität.** Bei einem Ausgangsvolumen von 300  $\mu$ l und einem Elutionsvolumen von 200  $\mu$ l aus frischen und gefrorenen Buffy Coat-Proben aus Vollblut in EDTA-Röhrchen und gefrorenen Buffy Coat-Proben aus Vollblut in Citrat- und Heparinröhrchen lag das  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis bei durchschnittlich ca. 1,9 (**Bild A**), und das  $A_{260}/A_{230}$ -Verhältnis lag durchschnittlich im Bereich 1,8–2,3 (**Bild B**).

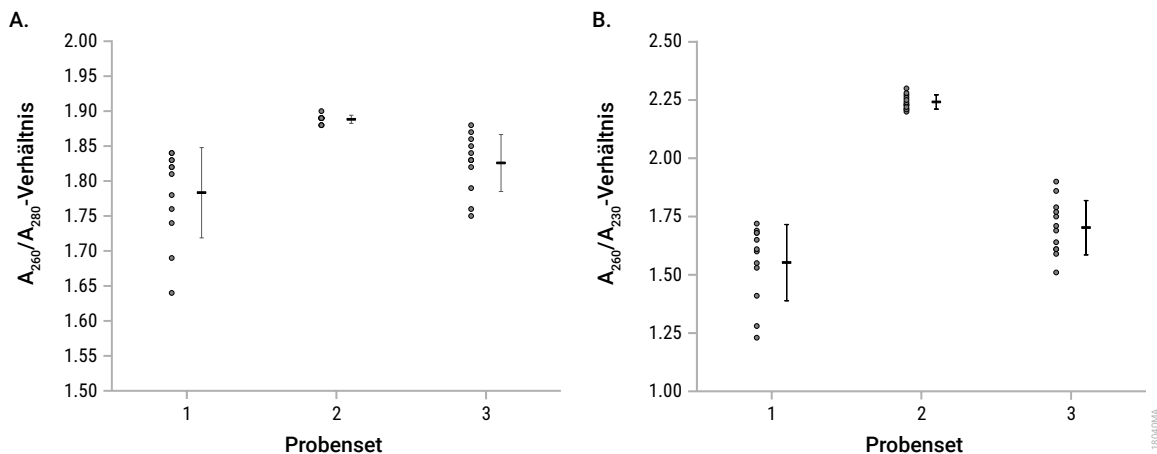
| Probenet | Antikoagulans | Lagerung | Ausgangsvolumen ( $\mu$ l) | Elutionsvolumen ( $\mu$ l) |
|----------|---------------|----------|----------------------------|----------------------------|
| 1        | EDTA          | Gefroren | 300                        | 200                        |
| 2        | EDTA          | Frisch   | 300                        | 200                        |
| 3        | Citrat        | Gefroren | 300                        | 200                        |
| 4        | Heparin       | Gefroren | 300                        | 200                        |

**8.B. DNA-Qualität (Reinheit; Fortsetzung)**

**Wangenschleimhaut-Abstrich**



**Abbildung 11. DNA-Qualität in Wangenschleimhaut-Abstrich.** Bei einem und zwei mit einer Clearing Column vorverarbeiteten Ausgangs-Wangenschleimhaut-Abstrich(en) mit einem Elutionsvolumen von 50  $\mu$ l lag das durchschnittliche  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis im Bereich 1,8–1,9. In der Grafik bezieht sich Probenset 1 auf einen Abstrichtupfer, während sich Probenset 2 auf zwei Abstrichtupfer bezieht.

**Gewebe**


**Abbildung 12. Gewebe-DNA-Qualität.** Bei 50 mg Herz-, Pankreas- und Hirngewebe mit einem Elutionsvolumen von 200  $\mu$ l lag das  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis durchschnittlich im Bereich 1,7–1,9 (**Bild A**), während das  $A_{260}/A_{230}$ -Verhältnis durchschnittlich im Bereich 1,5–2,3 lag (**Bild B**). In der Grafik bezieht sich Probenset 1 auf Herzgewebe, Probenset 2 auf Pankreasgewebe und Probenset 3 auf Hirngewebe.

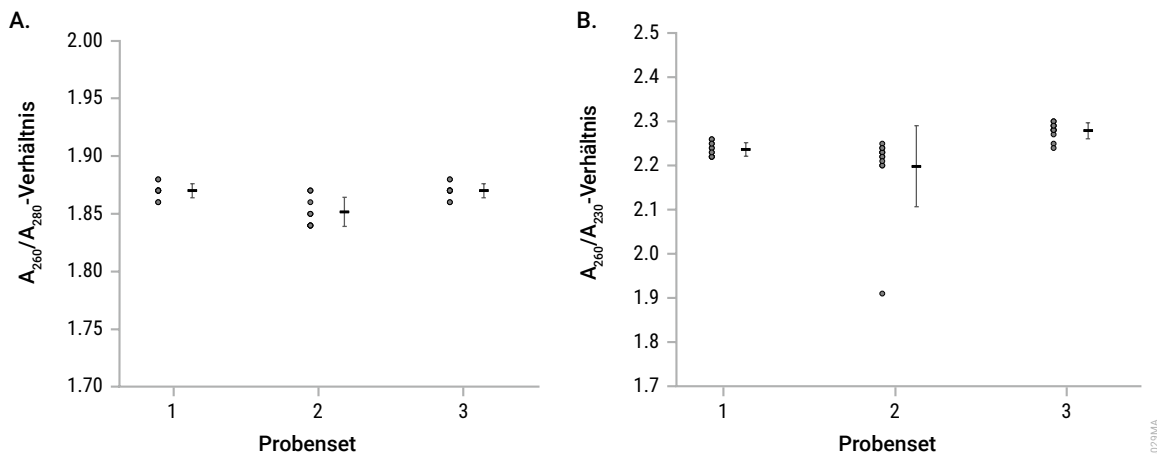
## 8.B. DNA-Qualität (Reinheit; Fortsetzung)

### Zellen

Bei  $5 \times 10^6$  HEK293 Gewebezellkulturen mit einem Elutionsvolumen von 200  $\mu\text{l}$  lag das  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis bei durchschnittlich 1,9 und das  $A_{260}/A_{230}$ -Verhältnis bei durchschnittlich 2,3.

| Zelltyp                   | Ausgangs-Zellenzahl | Elutionsvolumen   | $A_{260}/A_{280}$   | $A_{260}/A_{230}$ |
|---------------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| HEK293-Gewebezellkulturen | $5 \times 10^6$     | 200 $\mu\text{l}$ | 1,9                 | 2,3               |
|                           |                     |                   | 1,9                 | 2,3               |
|                           |                     |                   | 1,9                 | 2,3               |
|                           |                     |                   | 1,9                 | 2,2               |
|                           |                     |                   | 1,9                 | 2,3               |
|                           |                     |                   | 1,9                 | 2,3               |
|                           |                     |                   | 1,9                 | 2,3               |
|                           |                     |                   | 1,9                 | 2,2               |
|                           |                     |                   | 1,9                 | 2,3               |
|                           |                     |                   | 1,9                 | 2,3               |
|                           |                     |                   | 1,9                 | 2,3               |
|                           |                     |                   | <b>Durchschnitt</b> |                   |

## Knochenmark



**Abbildung 13. Knochenmark-DNA-Qualität.** Bei 300  $\mu$ l Knochenmarkaspiraten in EDTA-, Citrat- und Heparin-Röhrchen mit einem Elutionsvolumen von 200  $\mu$ l lag das  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis durchschnittlich im Bereich 1,8–1,9 (**Bild A**), während das  $A_{260}/A_{230}$ -Verhältnis durchschnittlich im Bereich 2,2–2,3 lag (**Bild B**). In der Grafik bezieht sich Probenset 1 auf Knochenmarkaspirate in EDTA-Röhrchen, Probenset 2 auf Knochenmarkaspirate in Citrat-Röhrchen, und Probenset 3 auf Knochenmarkaspirate in Heparinröhrchen.

### 8.C. Reproduzierbarkeit

Zur Bewertung der Präzision der DNA-Aufreinigung in jedem Extraktionslauf wurde die DNA von acht 300- $\mu$ l-Replikaten einer einzigen humanen Vollblutprobe während dreier Geräteläufe mit Gerät 1 und vier 300- $\mu$ l-Replikaten einer einzigen humanen Vollblutprobe während dreier Geräteläufe mit Gerät 2 aufgereinigt. Der DNA-Ertrag wurde durch Absorption quantifiziert, und anschließend wurde der Variationskoeffizient (prozentualer COV) für jeden der drei Läufe für jedes Gerät berechnet. Der DNA-Ertrag mit dem Maxwell<sup>®</sup> CSC Genomic DNA Kit war innerhalb jedes Laufs reproduzierbar, wobei die prozentualen COVs während der Läufe bei Gerät 1 im Bereich 6–9 % und bei Gerät 2 im Bereich 5–12 % lagen.

Zur Ermittlung der Präzision der DNA-Aufreinigung zwischen den verschiedenen Extraktionsläufen wurde die DNA von acht 300- $\mu$ l-Replikaten einer einzigen humanen Vollblutprobe während dreier Geräteläufe mit Gerät 1 und vier 300- $\mu$ l-Replikaten einer einzigen humanen Vollblutprobe während dreier Geräteläufe mit Gerät 2 aufgereinigt. Der DNA-Ertrag wurde durch Absorption quantifiziert, und anschließend wurde der Variationskoeffizient (prozentualer COV) für alle Proben aus allen drei Läufen für jedes Gerät berechnet. Der DNA-Ertrag mit dem Maxwell<sup>®</sup> CSC Genomic DNA Kit war von einem Lauf zum nächsten reproduzierbar, wobei der COV bei Gerät 1 von einem Lauf zum nächsten bei 7 % lag, während er bei Gerät 2 bei 8 % lag.

| Gerät | Lauf-Nr.  | Prozentualer COV während des Laufs | Prozentualer COV von einem Lauf zum nächsten |
|-------|-----------|------------------------------------|----------------------------------------------|
| 1     | 1 (n = 8) | 9 %                                | 7 %                                          |
|       | 2 (n = 8) | 7 %                                |                                              |
|       | 3 (n = 8) | 6 %                                |                                              |
| 2     | 1 (n = 4) | 12 %                               | 8 %                                          |
|       | 2 (n = 4) | 7 %                                |                                              |
|       | 3 (n = 4) | 5 %                                |                                              |

## 8.D. Amplifizierbarkeit

Die Kompatibilität mit der nachgelagerten Amplifikation wurde anhand von DNA bewertet, die aus frischem und gefrorenem Vollblut in EDTA-Röhrchen, aus gefrorenem Vollblut in Citrat- und Heparinröhrchen, frischen und gefrorenen Buffy Coat-Proben aus Vollblut in EDTA-Röhrchen, gefrorenen Buffy Coat-Proben aus Vollblut in Citrat- und Heparinröhrchen mithilfe einer oder zweier mit einer Clearing Column vorverarbeiteter Wangenschleimhaut-Abstriche, aus Herz-, Pankreas- und Hirngeweben, Gewebezellkulturen, Fruchtwasser, Urin und PBMCs und gefrorenen Knochenmarkaspiraten in EDTA-, Citrat- und Heparinröhrchen mit dem Maxwell® CSC Genomic DNA Kit aufgereinigt wurde.

Die DNA-Aufreinigung wurde für jeden Probenotyp mit den größten und geringsten Proben-Ausgangsmengen und -Elutionsvolumen durchgeführt. Bei den Gewebezellkulturen und PBMCs kam auch eine Reihenverdünnung der Zellenanzahl zum Einsatz.

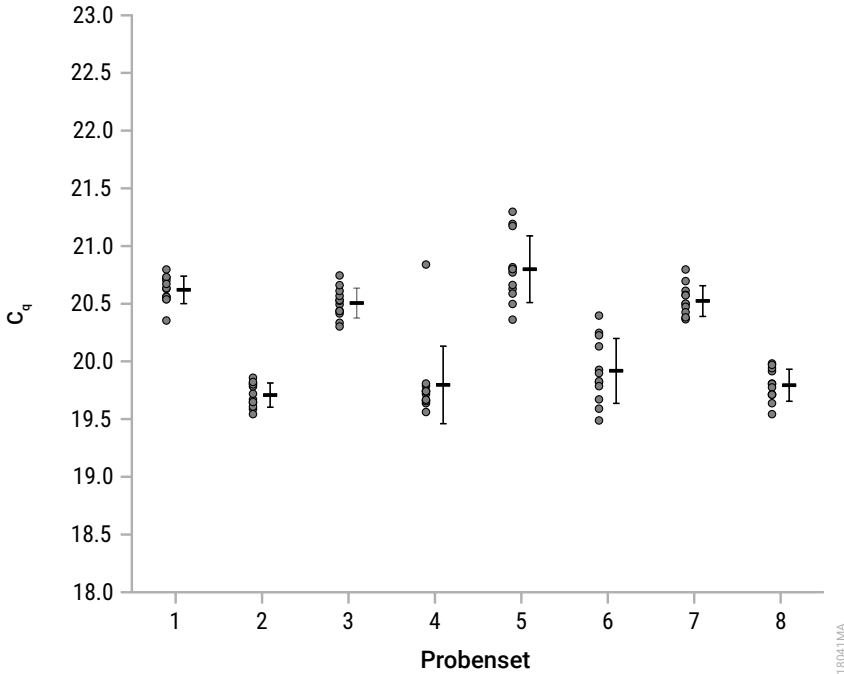
Die aus allen Proben resultierende DNA wurde durch Absorption quantifiziert, bis zu einer Konzentration innerhalb der qPCR-Standardkurve verdünnt und anschließend unter Verwendung des 300-bp-Ziels mit einem qPCR-Assay amplifiziert. Es werden der  $C_q$ -Wert für jede aufgereinigte DNA-Probe und der durchschnittliche  $C_q$ -Wert für drei Replikate der standardmäßigen 0,0032 ng/ $\mu$ l humaner genomischer DNA aus dem qPCR-Assay angegeben.

Die Grafiken in diesem Abschnitt stellen die  $C_q$ -Werte jedes Replikats dar, das für jeden Probenotyp aufgereinigt wurde. Jeder Punkt in den Grafiken auf der linken Seite stellt eine einzelne Messung dar, während der Mittelwert mit der Standardabweichung rechts dargestellt ist. Jedes Dataset beinhaltet insgesamt 12 Replikate, und zwar 4 mit dem Maxwell® CSC Instrument aufgereinigte Replikate und 8 mit dem Maxwell® CSC 48 Instrument aufgereinigte Replikate.

In den Tabellen unter den Abbildungslegenden sind die Probeninformationen der einzelnen Probensets beschrieben, die in den zugehörigen Grafiken dargestellt sind.

### 8.D. Amplifizierbarkeit (Fortsetzung)

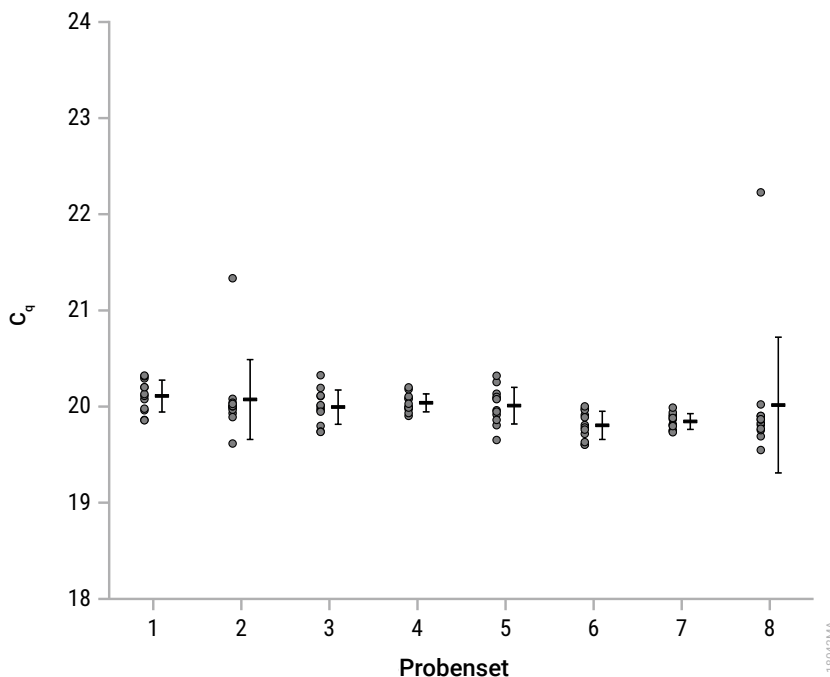
#### Vollblut



**Abbildung 14. Vollblut-DNA-Amplifikation.** Bei frischen und gefrorenen Vollblutproben in EDTA-Röhrchen lagen die  $C_q$ -Werte im Bereich 19,54–20,80 Zyklen, und alle lagen unterhalb des durchschnittlichen  $C_q$ -Wertes für den 0,0032 ng/µl DNA-Standard (33,11 Zyklen). Bei gefrorenen Vollblutproben in Citrat- und Heparinröhrchen lagen die  $C_q$ -Werte im Bereich 19,49–21,30 Zyklen, und alle lagen unterhalb des durchschnittlichen  $C_q$ -Wertes für den 0,0032 ng/µl DNA-Standard (32,88 Zyklen).

| Probenset | Antikoagulans | Lagerung | Ausgangsvolumen (µl) | Elutionsvolumen (µl) |
|-----------|---------------|----------|----------------------|----------------------|
| 1         | EDTA          | Gefroren | 50                   | 50                   |
| 2         | EDTA          | Gefroren | 300                  | 200                  |
| 3         | EDTA          | Frisch   | 50                   | 50                   |
| 4         | EDTA          | Frisch   | 300                  | 200                  |
| 5         | Citrat        | Gefroren | 50                   | 50                   |
| 6         | Citrat        | Gefroren | 300                  | 200                  |
| 7         | Heparin       | Gefroren | 50                   | 50                   |
| 8         | Heparin       | Gefroren | 300                  | 200                  |

## Buffy Coat

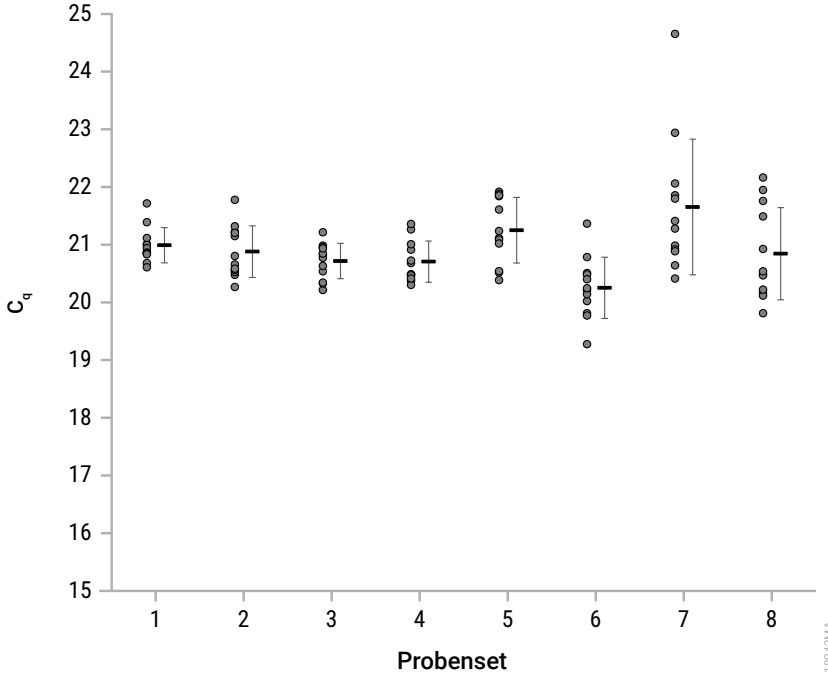


**Abbildung 15. Buffy Coat-DNA-Amplifikation.** Bei frischen und gefrorenen Buffy Coat-Proben aus Vollblut in EDTA-Röhrchen lagen die  $C_q$ -Werte im Bereich 19,62–21,34 Zyklen, und alle lagen unterhalb des durchschnittlichen  $C_q$ -Wertes für den 0,0032 ng/ $\mu$ l DNA-Standard (33,09 Zyklen). Bei gefrorenen Buffy Coat-Proben aus Vollblut in Citrat- und Heparinröhrchen lagen die  $C_q$ -Werte im Bereich 19,55–22,23 Zyklen, und alle lagen unterhalb des durchschnittlichen  $C_q$ -Wertes für den 0,0032 ng/ $\mu$ l DNA-Standard (32,86 Zyklen).

| Probenset | Antikoagulans | Lagerung | Ausgangsvolumen ( $\mu$ l) | Elutionsvolumen ( $\mu$ l) |
|-----------|---------------|----------|----------------------------|----------------------------|
| 1         | EDTA          | Gefroren | 50                         | 50                         |
| 2         | EDTA          | Gefroren | 300                        | 200                        |
| 3         | EDTA          | Frisch   | 50                         | 50                         |
| 4         | EDTA          | Frisch   | 300                        | 200                        |
| 5         | Citrat        | Gefroren | 50                         | 50                         |
| 6         | Citrat        | Gefroren | 300                        | 200                        |
| 7         | Heparin       | Gefroren | 50                         | 50                         |
| 8         | Heparin       | Gefroren | 300                        | 200                        |

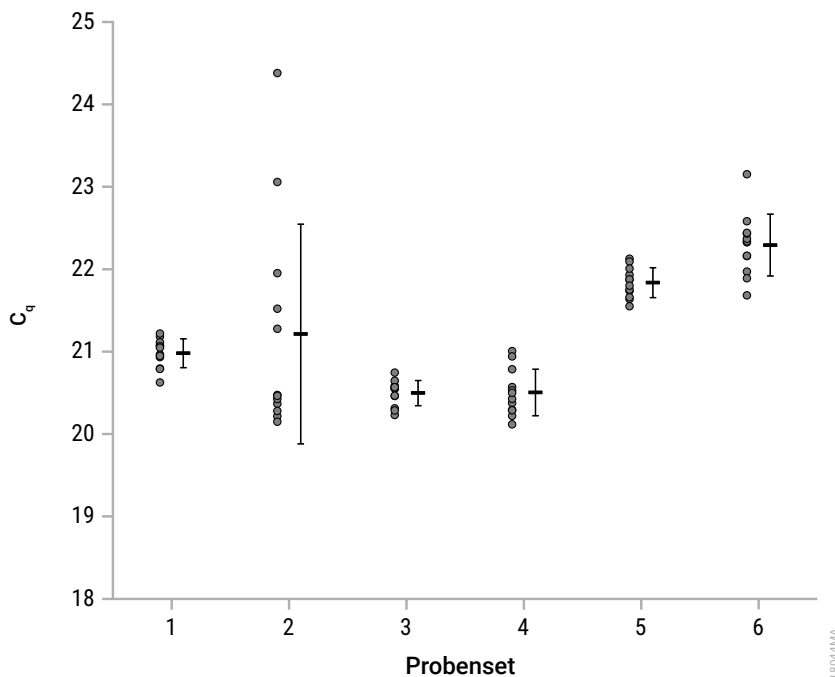
**8.D. Amplifizierbarkeit (Fortsetzung)**

**Wangenschleimhaut-Abstrich**



**Abbildung 16. DNA-Amplifikation in Wangenschleimhaut-Abstrichen.** Bei einem und zwei mit einer Clearing Column vorverarbeiteten Ausgangs-Wangenschleimhaut-Abstrichen lagen die  $C_q$ -Werte im Bereich 20,22–21,78 Zyklen, und alle lagen unterhalb des durchschnittlichen  $C_q$ -Wertes für den 0,0032 ng/ $\mu$ l DNA-Standard (32,45 Zyklen). Bei einem und zwei ohne Clearing Column vorverarbeiteten Ausgangs-Wangenschleimhaut-Abstrichen lagen die  $C_q$ -Werte im Bereich 19,28–24,65 Zyklen, und alle lagen unterhalb des durchschnittlichen  $C_q$ -Wertes für den 0,0032 ng/ $\mu$ l DNA-Standard (32,54 Zyklen).

| Probenset | Abstrichzahl | Vorverarbeitung      | Elutionsvolumen ( $\mu$ l) |
|-----------|--------------|----------------------|----------------------------|
| 1         | 1 Abstrich   | Mit Clearing Column  | 50                         |
| 2         | 1 Abstrich   | Mit Clearing Column  | 200                        |
| 3         | 2 Abstriche  | Mit Clearing Column  | 50                         |
| 4         | 2 Abstriche  | Mit Clearing Column  | 200                        |
| 5         | 1 Abstrich   | Ohne Clearing Column | 50                         |
| 6         | 1 Abstrich   | Ohne Clearing Column | 200                        |
| 7         | 2 Abstriche  | Ohne Clearing Column | 50                         |
| 8         | 2 Abstriche  | Ohne Clearing Column | 200                        |

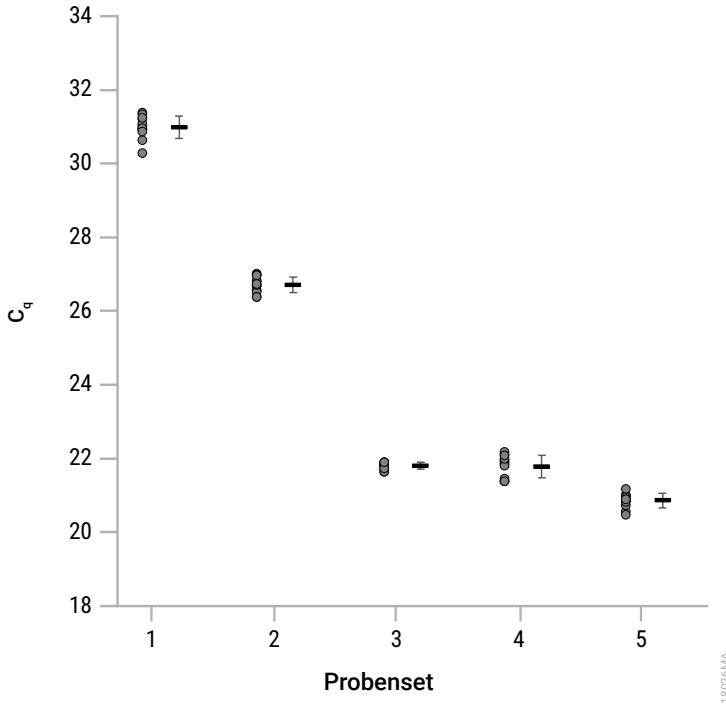
**Gewebe**


**Abbildung 17. Gewebe-DNA-Amplifikation.** Bei Herz- und Pankreasgeweben lagen die  $C_q$ -Werte im Bereich 20,12–24,38 Zyklen, und alle lagen unterhalb des durchschnittlichen  $C_q$ -Wertes für den 0,0032 ng/ $\mu$ l DNA-Standard (32,98 Zyklen). Bei Hirngewebe lagen die  $C_q$ -Werte im Bereich 21,55–23,15 Zyklen, und alle lagen unterhalb des durchschnittlichen  $C_q$ -Wertes für den 0,0032 ng/ $\mu$ l DNA-Standard (33,68 Zyklen).

| Probenset | Gewebetyp | Ausgangsmenge (mg) | Elutionsvolumen ( $\mu$ l) |
|-----------|-----------|--------------------|----------------------------|
| 1         | Herz      | 5                  | 50                         |
| 2         | Herz      | 50                 | 200                        |
| 3         | Pankreas  | 5                  | 50                         |
| 4         | Pankreas  | 50                 | 200                        |
| 5         | Hirn      | 5                  | 50                         |
| 6         | Hirn      | 50                 | 200                        |

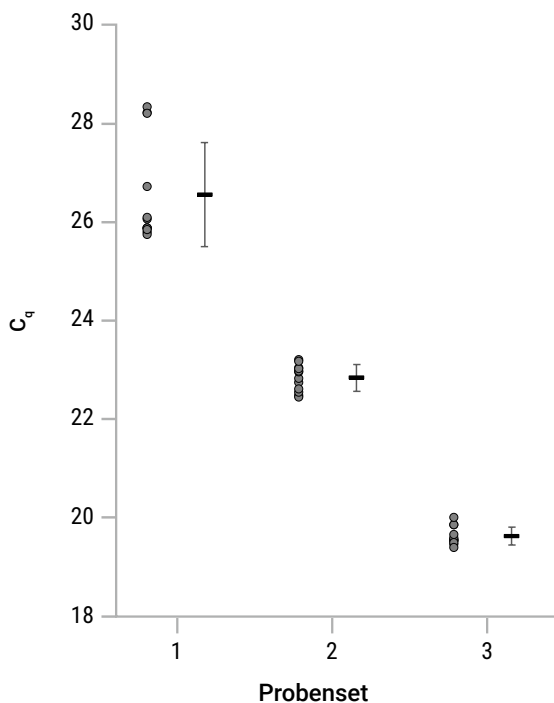
**8.D. Amplifizierbarkeit (Fortsetzung)**

**Zellen**



**Abbildung 18. DNA-Amplifikation von Gewebezellkulturen.** Bei der Reihenverdünnung der HEK293-Gewebezellkulturen lagen die  $C_q$ -Werte im Bereich 20,48–31,38 Zyklen, und alle lagen unterhalb des durchschnittlichen  $C_q$ -Wertes für den 0,0032 ng/ $\mu$ l DNA-Standard (33,04 Zyklen).

| Probenset | Zelltyp                   | Zellenzahl      | Elutionsvolumen ( $\mu$ l) |
|-----------|---------------------------|-----------------|----------------------------|
| 1         | HEK293-Gewebezellkulturen | $5 \times 10^2$ | 50                         |
| 2         | HEK293-Gewebezellkulturen | $5 \times 10^3$ | 50                         |
| 3         | HEK293-Gewebezellkulturen | $5 \times 10^4$ | 50                         |
| 4         | HEK293-Gewebezellkulturen | $5 \times 10^5$ | 200                        |
| 5         | HEK293-Gewebezellkulturen | $5 \times 10^6$ | 200                        |

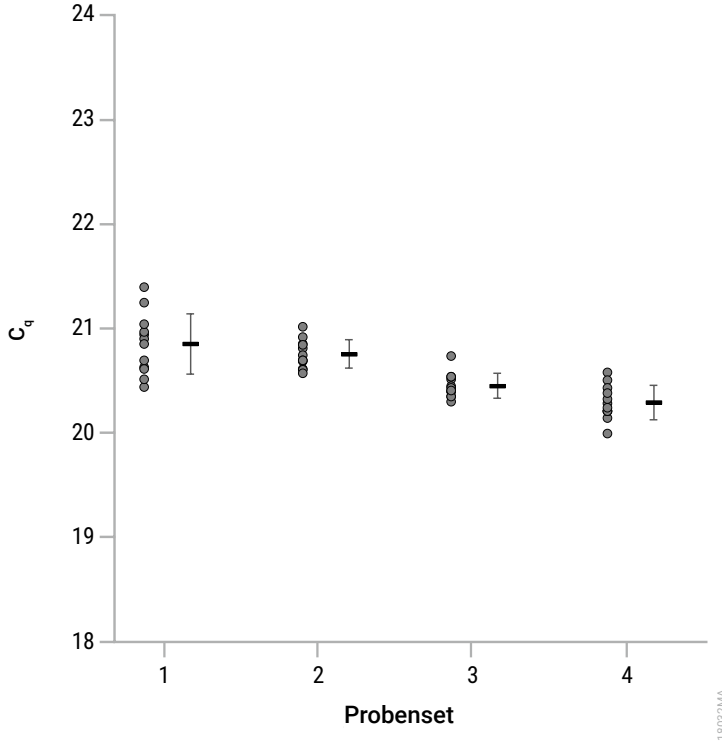


**Abbildung 19. PBMC-DNA-Amplifikation.** Bei der PBMC-Reihenverdünnung lagen die C<sub>q</sub>-Werte im Bereich 19,40–28,33 Zyklen, und alle lagen unterhalb des durchschnittlichen C<sub>q</sub>-wertes für den 0,0032 ng/μl DNA-Standard (32,80 Zyklen).

| Proben set | Zelltyp | Zellenzahl      | Elutionsvolumen (μl) |
|------------|---------|-----------------|----------------------|
| 1          | PBMCs   | $5 \times 10^4$ | 50                   |
| 2          | PBMCs   | $5 \times 10^5$ | 100                  |
| 3          | PBMCs   | $5 \times 10^6$ | 200                  |

**8.D. Amplifizierbarkeit (Fortsetzung)**

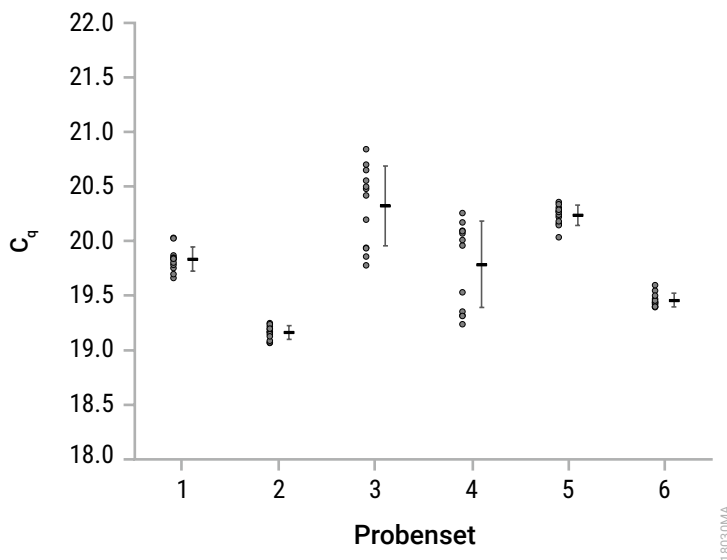
**Zellen (Fortsetzung)**



**Abbildung 20. DNA-Amplifikation aus Urin und Fruchtwasser.** Bei Zellen, die aus Urin- und Fruchtwasserproben gewonnen wurden, lagen die  $C_q$ -Werte im Bereich 20,00–21,40 Zyklen, und alle lagen unterhalb des durchschnittlichen  $C_q$ -Wertes für den 0,0032 ng/µl DNA-Standard (32,71 Zyklen).

| Probenset | Zelltyp      | Ausgangsvolumen (ml) | Elutionsvolumen (µl) |
|-----------|--------------|----------------------|----------------------|
| 1         | Urin         | 15                   | 50                   |
| 2         | Urin         | 50                   | 50                   |
| 3         | Fruchtwasser | 1                    | 50                   |
| 4         | Fruchtwasser | 5                    | 50                   |

## Knochenmark



**Abbildung 21. Knochenmark-DNA-Amplifikation.** Bei gefrorenen Knochenmarkaspiraten in EDTA- und Citratröhrchen lagen die  $C_q$ -Werte im Bereich 19,07–20,84 Zyklen, und alle lagen unterhalb des durchschnittlichen  $C_q$ -Wertes für den 0,0032 ng/µl DNA-Standard (32,42 Zyklen). Bei Knochenmarkaspiraten in Heparinröhrchen lagen die  $C_q$ -Werte im Bereich 19,40–20,36 Zyklen, und alle lagen unterhalb des durchschnittlichen  $C_q$ -Wertes für den 0,0032 ng/µl DNA-Standard (32,82 Zyklen).

| Probenset | Antikoagulans | Ausgangsvolumen (µl) | Elutionsvolumen (µl) |
|-----------|---------------|----------------------|----------------------|
| 1         | EDTA          | 50                   | 50                   |
| 2         | EDTA          | 300                  | 200                  |
| 3         | Citrat        | 50                   | 50                   |
| 4         | Citrat        | 300                  | 200                  |
| 5         | Heparin       | 50                   | 50                   |
| 6         | Heparin       | 300                  | 200                  |

### **8.E. Inhibition (Interferierende Stoffe)**

Die Inhibition der Amplifikation wurde anhand von DNA bewertet, die aus frischem und gefrorenem Vollblut in EDTA-Röhrchen, aus gefrorenem Vollblut in Citrat- und Heparinröhrchen, frischen und gefrorenen Buffy Coat-Proben aus Vollblut in EDTA-Röhrchen, gefrorenen Buffy Coat-Proben aus Vollblut in Citrat- und Heparinröhrchen mithilfe einer oder zweier mit einer Clearing Column vorverarbeiteter Wangenschleimhaut-Abstriche, aus Herz-, Pankreas- und Hirngewebe, Gewebezellkulturen, Fruchtwasser, Urin und PBMCs und gefrorenen Knochenmarkaspiraten in EDTA-, Citrat- und Heparinröhrchen mit dem Maxwell® CSC Genomic DNA Kit aufgereinigt wurde.

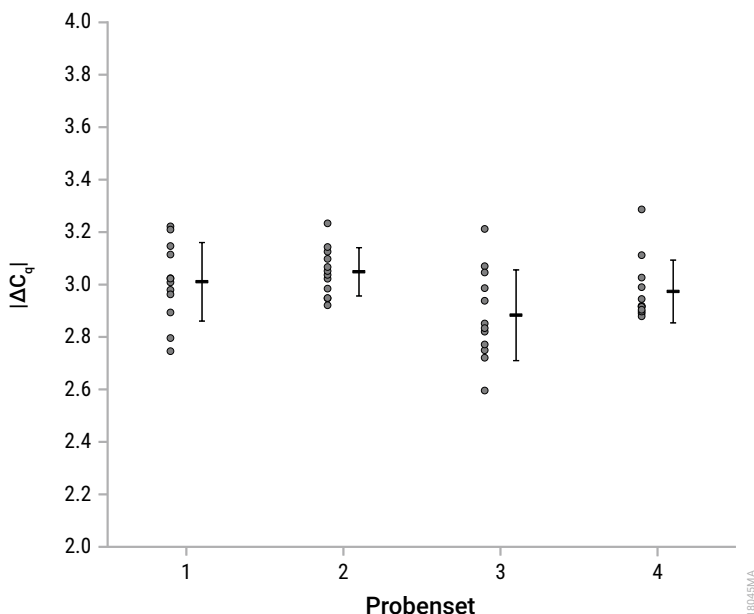
Bei jedem Probenotyp wurde eine DNA-Aufreinigung durchgeführt. Für diese Analyse wurden die Proben-Ausgangsmengen und -Elutionsvolumen ermittelt, bei denen das geringste Maß an Verdünnung für die in der qPCR zu verwendenden Proben erforderlich sein würde.

Die DNA wurde quantifiziert und auf eine Konzentration innerhalb der qPCR-Standardkurve verdünnt; anschließend wurde eine Aliquote jeder DNA-Probe zusätzlich achtfach verdünnt. Die anfänglichen DNA-Verdünnungen und die achtfachen Verdünnungen wurden unter Verwendung eines qPCR-Assays amplifiziert. Die Differenz in den  $C_q$ -Werten ( $|\Delta C_q|$ ) für die 300-bp-Zielsequenz ist angegeben. Eine  $|\Delta C_q|$  von  $3 \pm 1$  Zyklen entspricht der Nicht-Inhibition der DNA-Amplifikation aufgrund von endogenen und exogenen Substanzen, die in den Proben vorliegen können.

Die Grafiken in diesem Abschnitt stellen die  $|\Delta C_q|$  jedes Replikats dar, das für jeden Probenotyp aufgereinigt wurde. Jeder Punkt in den Grafiken auf der linken Seite stellt eine einzelne Messung dar, während der Mittelwert mit der Standardabweichung rechts dargestellt ist. Jedes Dataset beinhaltet insgesamt 12 Replikate, und zwar 4 mit dem Maxwell® CSC Instrument aufgereinigte Replikate und 8 mit dem Maxwell® CSC 48 Instrument aufgereinigte Replikate.

In den Tabellen unter den Abbildungslegenden sind die Probeninformationen der einzelnen Probensets beschrieben, die in den zugehörigen Grafiken dargestellt sind.

## Vollblut

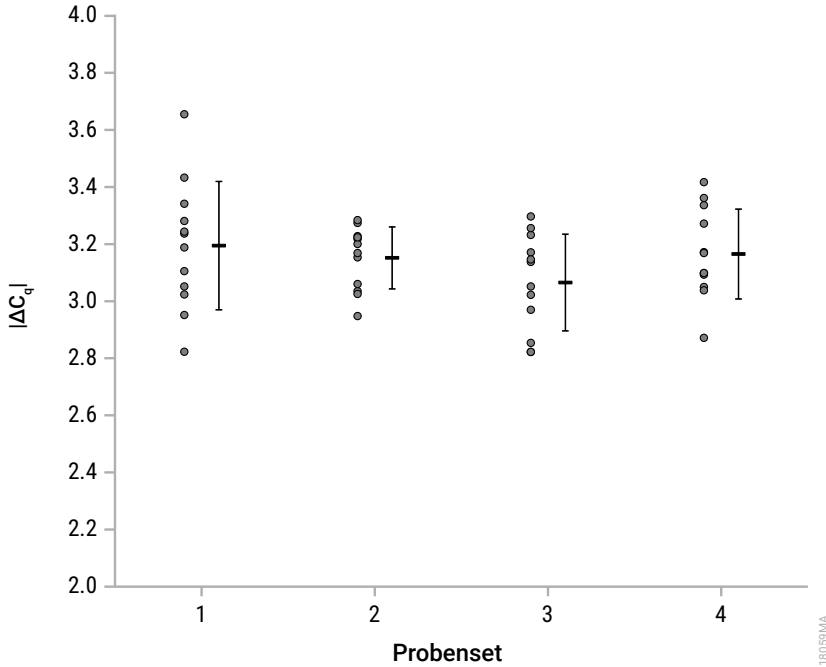


**Abbildung 22. Test auf Inhibition der Vollblut-DNA-Amplifikation.** Bei frischen und gefrorenen Vollblutproben in EDTA-Röhrchen lagen die  $|\Delta C_q|$ -Werte zwischen 2,75 Zyklen und 3,23 Zyklen. Bei gefrorenen Vollblutproben in Citrat- und Heparinröhrchen lagen die  $|\Delta C_q|$ -Werte zwischen 2,60 Zyklen und 3,29 Zyklen.

| Proben set | Antikoagulans | Lagerung | Ausgangsvolumen (μl) | Elutionsvolumen (μl) |
|------------|---------------|----------|----------------------|----------------------|
| 1          | EDTA          | Gefroren | 50                   | 50                   |
| 2          | EDTA          | Frish    | 50                   | 50                   |
| 3          | Citrat        | Gefroren | 50                   | 50                   |
| 4          | Heparin       | Gefroren | 50                   | 50                   |

**8.E. Inhibition (Interferierende Stoffe; Fortsetzung)**

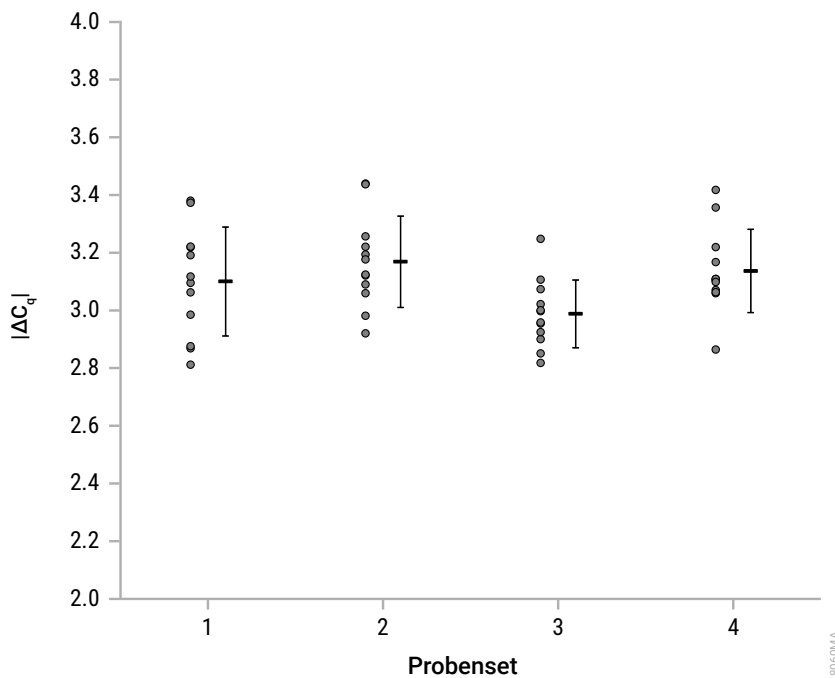
**Buffy Coat**



**Abbildung 23. Test auf Inhibition der Buffy Coat-DNA-Amplifikation.** Bei frischen und gefrorenen Buffy Coat-Proben aus Vollblut in EDTA-Röhrchen lagen die  $|\Delta C_q|$ -Werte zwischen 2,82 Zyklen und 3,65 Zyklen. Bei gefrorenen Buffy Coat-Proben aus Vollblut in Citrat- und Heparinröhrchen lagen die  $|\Delta C_q|$ -Werte zwischen 2,82 Zyklen und 3,42 Zyklen.

| Probenet | Antikoagulans | Lagerung | Ausgangsvolumen (µl) | Elutionsvolumen (µl) |
|----------|---------------|----------|----------------------|----------------------|
| 1        | EDTA          | Gefroren | 50                   | 50                   |
| 2        | EDTA          | Frisch   | 50                   | 50                   |
| 3        | Citrat        | Gefroren | 50                   | 50                   |
| 4        | Heparin       | Gefroren | 50                   | 50                   |

## Wangenschleimhaut-Abstrich

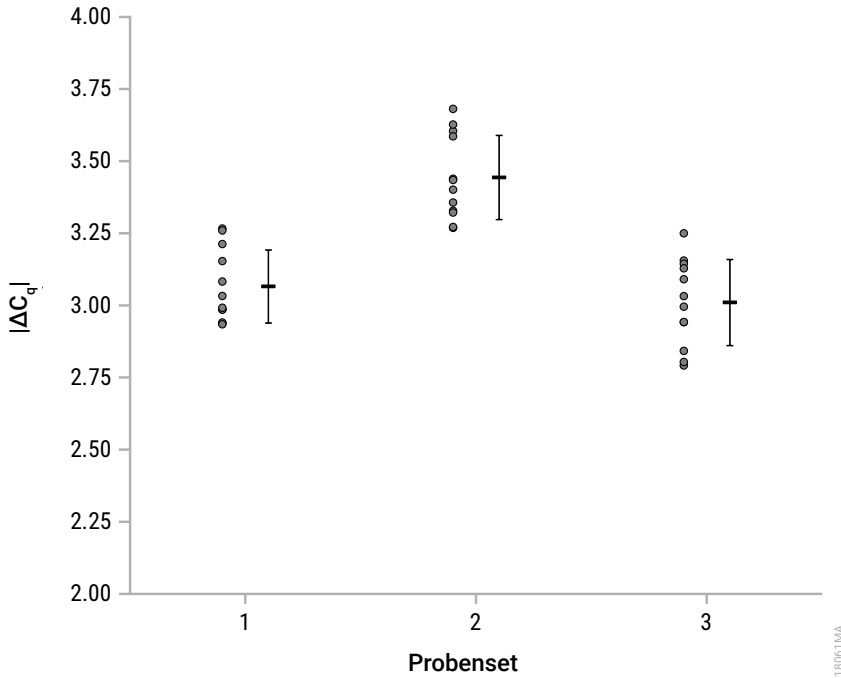


**Abbildung 24. Test auf Inhibition der DNA-Amplifikation in Wangenschleimhaut-Abstrichen.** Bei einem oder zwei mit einer Clearing Column vorverarbeiteten Ausgangs-Wangenschleimhaut-Abstrichen lagen die  $|\Delta C_q|$ -Werte zwischen 2,81 Zyklen und 3,44 Zyklen. Bei einem oder zwei ohne Clearing Column vorverarbeiteten Ausgangs-Wangenschleimhaut-Abstrichen lagen die  $|\Delta C_q|$ -Werte zwischen 2,82 Zyklen und 3,42 Zyklen.

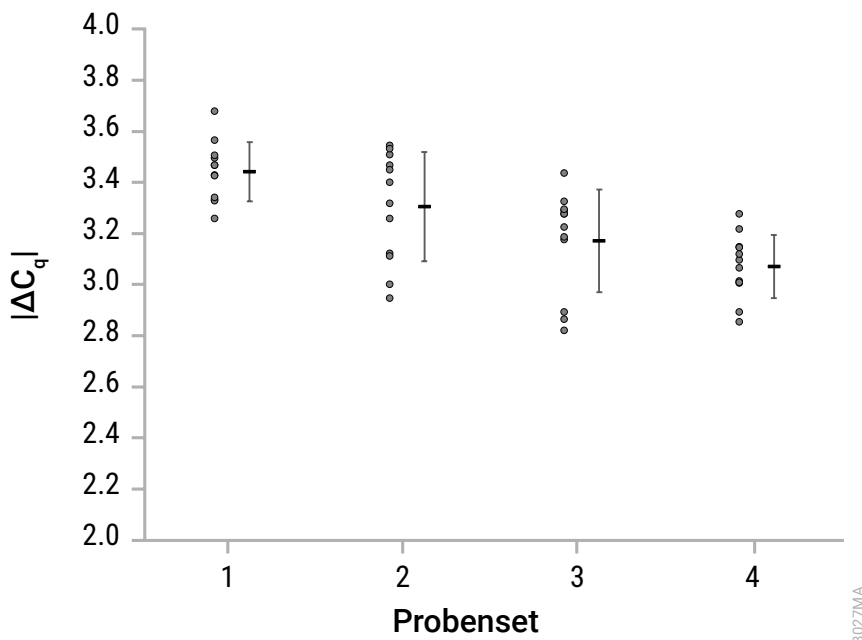
| Probenet | Abstrichzahl | Vorverarbeitung      | Elutionsvolumen (µl) |
|----------|--------------|----------------------|----------------------|
| 1        | 1 Abstrich   | Mit Clearing Column  | 50                   |
| 2        | 2 Abstriche  | Mit Clearing Column  | 50                   |
| 3        | 1 Abstrich   | Ohne Clearing Column | 50                   |
| 4        | 2 Abstriche  | Ohne Clearing Column | 50                   |

**8.E. Inhibition (Interferierende Stoffe; Fortsetzung)**

**Gewebe**



**Abbildung 25. Test auf Inhibition der Gewebe-DNA-Amplifikation.** Bei 5 mg Herz- und Pankreasgewebe lagen die  $|\Delta C_q|$ -Werte zwischen 2,93 Zyklen und 3,68 Zyklen. Bei 5 mg Hirngewebe lagen die  $|\Delta C_q|$ -Werte zwischen 2,79 Zyklen und 3,25 Zyklen. Bei allen Proben wurde ein Elutionsvolumen von 50  $\mu$ l verwendet. In der Grafik bezieht sich Probenstet 1 auf Herzgewebe, Probenstet 2 auf Pankreasgewebe und Probenstet 3 auf Hirngewebe.

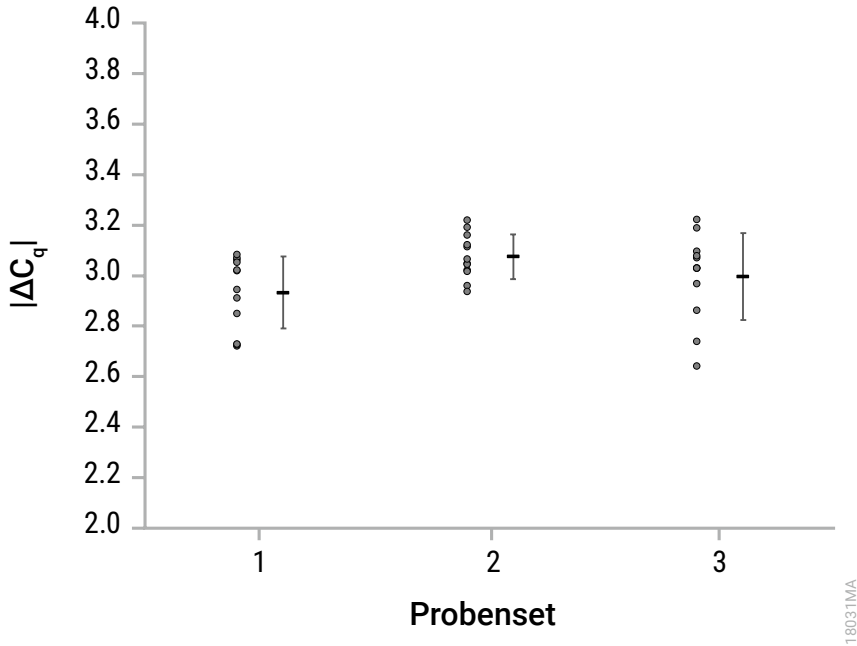
**Zellen**


**Abbildung 26. Test auf Inhibition der Zell-DNA-Amplifikation.** Bei  $5 \times 10^4$  HEK293-Gewebezellkulturen mit einem Elutionsvolumen von 50 µl lagen die  $|\Delta C_q|$ -Werte zwischen 3,26 Zyklen und 3,68 Zyklen. Bei  $5 \times 10^5$  PBMCs mit einem Elutionsvolumen von 100 µl lagen die  $|\Delta C_q|$ -Werte zwischen 2,95 Zyklen und 3,55 Zyklen. Bei Zellen mit einem Elutionsvolumen von 50 µl, die aus Proben von 50 ml Urin und 5 ml Fruchtwasser gewonnen wurden, lagen die  $|\Delta C_q|$ -Werte zwischen 2,82 Zyklen und 3,44 Zyklen.

| Probenstet | Zelltyp                   | Ausgangsmenge          | Elutionsvolumen (µl) |
|------------|---------------------------|------------------------|----------------------|
| 1          | HEK293-Gewebezellkulturen | $5 \times 10^4$ Zellen | 50                   |
| 2          | PBMCs                     | $5 \times 10^5$ Zellen | 100                  |
| 3          | Urin                      | 50 ml                  | 50                   |
| 4          | Fruchtwasser              | 5 ml                   | 50                   |

## 8.E. Inhibition (Interferierende Stoffe; Fortsetzung)

### Knochenmark



**Abbildung 27. Test auf Inhibition der Knochenmark-DNA-Amplifikation.** Bei 50 µl Knochenmarkaspiraten in EDTA- und Citratröhrchen lagen die  $|\Delta C_q|$ -Werte zwischen 2,72 Zyklen und 3,22 Zyklen. Bei 50 µl Knochenmarkaspiraten in Heparinröhrchen lagen die  $|\Delta C_q|$ -Werte zwischen 2,64 Zyklen und 3,22 Zyklen. Bei allen Proben wurde ein Elutionsvolumen von 50 µl verwendet. In der Grafik bezieht sich Proben set 1 auf Knochenmarkaspirate in EDTA-Röhrchen, Proben set 2 auf Knochenmarkaspirate in Citrat-Röhrchen, und Proben set 3 auf Knochenmarkaspirate in Heparinröhrchen.

### 8.F. Kreuzkontamination

Es wurden männliche (300 µl) und weibliche (50 µl) Buffy Coat-Proben in abwechselnden Kartuschenpositionen der Maxwell® Instruments verarbeitet. Die resultierenden aufgereinigten weiblichen DNA-Proben wurden unter Verwendung eines Y-chromosomalen DNA-Ziels mit einem qPCR-Assay amplifiziert. Dieses Y-chromosomale Ziel in den weiblichen Proben wurde verwendet, um potenzielle Kreuzkontaminationen aus benachbarten Proben zu identifizieren. Wenn weibliche Buffy Coat-Proben in Kartuschenpositionen neben männlichen Buffy Coat-Proben verarbeitet wurden, wies keine der weiblichen DNA-Proben einen C<sub>q</sub>-Wert für das Y-chromosomale DNA-Ziel auf.

## **9. Evaluierung der klinischen Leistung**

Die Evaluierung der klinischen Leistung wurde mit dem Maxwell® CSC Genomic DNA Kit und dem Maxwell® CSC 48 Instrument an Humanproben durchgeführt.

### **Vollblut**

Zwei Tester aus einem externen Labor reinigten DNA aus 200 µl humaner Vollblutproben mit einem Elutionsvolumen von 100 µl von 12 einzelnen Spendern mit dem Maxwell® CSC Purification System sowie mit einer Laborreferenz-Extraktionsmethode auf. Die daraus resultierenden Eluate wurden durch Amplifizierung des HCP5-Haushaltsgens der Positivkontrolle im HLA-B27-Assay analysiert. Alle 12 mit dem Maxwell® CSC Genomic DNA Kit aufgereinigten DNA-Proben wiesen eine Konkordanz zwischen den beiden Testern und zu der Laborreferenz-Extraktionsmethode auf.

### **Wangenschleimhaut-Abstrich**

Ein Tester aus einem externen Labor reinigte DNA von einer mit einer Clearing Column vorverarbeiteten humanen Wangenschleimhaut-Abstrichprobe mit einem Elutionsvolumen von 100 µl von 12 einzelnen Spendern mit dem Maxwell® CSC Purification System sowie mit einer Laborreferenz-Extraktionsmethode auf. Die daraus resultierenden Eluate wurden durch Amplifizierung des HCP5-Haushaltsgens der Positivkontrolle im HLA-B27-Assay analysiert. Alle 12 mit dem Maxwell® CSC Genomic DNA Kit aufgereinigten DNA-Proben wiesen eine Konkordanz zu der Laborreferenz-Extraktionsmethode auf.

### **Gewebe**

Ein Tester aus einem externen Labor reinigte DNA aus 10–25 mg humaner Gewebeproben mit einem Elutionsvolumen von 200 µl von 12 einzelnen Spendern mit dem Maxwell® CSC Purification System sowie mit einer Laborreferenz-Extraktionsmethode auf. Die daraus resultierenden Eluate wurden durch Amplifizierung des HCP5-Haushaltsgens der Positivkontrolle im HLA-B27-Assay analysiert. Alle 12 mit dem Maxwell® CSC Genomic DNA Kit aufgereinigten DNA-Proben wiesen eine Konkordanz zu der Laborreferenz-Extraktionsmethode auf.

## 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

DNA Konzentration niedriger als erwartet

### Ursachen und Anmerkungen

Die DNA in Proben, die mehrmals eingefroren und wieder aufgetaut wurden, ist möglicherweise degradiert. Die Probenrichtlinien zur Entnahme und Lagerung sind bei den einzelnen Probentypen aufgeführt.

Die Probe enthielt eine geringe Menge genomischer DNA. Der Ertrag der genomischen DNA hängt von der Größe der verarbeiteten Probe und vom DNA-Gehalt dieser Probe ab.

Es wurde keine Proteinase K-Lösung hinzugegeben, es wurde eine zu geringe Menge an Proteinase K-Lösung hinzugegeben oder die Proteinase K-Lösung wurde nicht richtig mit der Probe vermischt. Lyse und Ertrag sind von der vollständigen Extraktion mit Proteinase K abhängig.

Die Ausgangsprobe wurde vor der Verarbeitung nicht vermischt. Die Proben müssen vor der Verarbeitung unbedingt vermischt werden.

Das für die Extraktion verwendete Elutionsvolumen war zu groß für die zu verarbeitende Probe. Reduzieren Sie das anfängliche Elutionspuffervolumen, um die eluierte DNA-Konzentration zu erhöhen.

Es wurde eine zu große Probenmenge oder eine Probe mit zu viel genomischer DNA verarbeitet. Eine zu große Probe oder zu viel genomische DNA können dazu führen, dass die chemische Extraktion fehlschlägt, was zu einer Eluatkonzentration führt, die nicht mit der Menge der verarbeiteten Probe korreliert.

Das Lysat wurde nicht durch 5–10-maliges Aspirieren und Dispensieren nach der Übertragung zwecks Herstellung einer homogenen Mischung mit der Bindungslösung in Kammer 1 vermischt. Wird in Kammer 1 der Kartusche keine homogene Mischung aus Probenlysat und Bindungslösung hergestellt, kann dies zu einem geringeren Ertrag und verminderter Reinheit im endgültigen Eluat führen.

## Symptome

## Ursachen und Anmerkungen

DNA Konzentration niedriger als erwartet (Fortsetzung)

Die Proben wurden während der Verarbeitung nicht angemessen oder nicht in den richtigen Schritten vermischt. Werden die Reagenzien und Proben nicht angemessen im Inkubationsröhrchen vermischt, kann die Leistung beeinträchtigt werden.

Lyse-Pufferlösung und Lytischer Enhancer (LE2) wurden synonym verwendet, im falschen Schritt oder mit dem falschen Volumen. Verarbeiten Sie die Proben erneut und verwenden Sie dafür Lyse-Pufferlösung und Lytischen Enhancer (LE2) gemäß Anweisung.

Reinheit geringer als erwartet

Es wurde keine Proteinase K-Lösung hinzugegeben, es wurde eine zu geringe Menge an Proteinase K-Lösung hinzugegeben oder die Proteinase K-Lösung wurde nicht richtig mit der Probe vermischt. Lyse und Ertrag sind von der vollständigen Extraktion mit Proteinase K abhängig.

Das Lysat wurde nicht durch 5–10-maliges Aspirieren und Dispensieren nach der Übertragung zwecks Herstellung einer homogenen Mischung mit der Bindungslösung in Kammer 1 vermischt. Wird in Kammer 1 der Kartusche keine homogene Mischung aus Probenlysat und Bindungslösung hergestellt, kann dies zu einem geringeren Ertrag und verminderter Reinheit im endgültigen Eluat führen.

Die DNA in Proben, die mehrmals eingefroren und wieder aufgetaut wurden, ist möglicherweise degradiert. Verwenden Sie Proben, die gemäß den unter dem jeweiligen Probentyp aufgeführten Richtlinien entnommen und gelagert wurden.

Bei Vollblut-, Buffy Coat- und Knochenmarkproben kann das Übertragen von klumpigem oder fettigem Material in das Inkubationsröhrchen dazu führen, dass die Probe unzulänglich lysiert wird. Übertragen Sie für die Aufreinigung nur flüssige Proben.

Lyse-Pufferlösung und Lytischer Enhancer (LE2) wurden synonym verwendet, im falschen Schritt oder mit dem falschen Volumen. Verarbeiten Sie die Proben erneut und verwenden Sie dafür Lyse-Pufferlösung und Lytischen Enhancer (LE2) gemäß Anweisung.

## 10. Fehlerbehebung (Fortsetzung)

### Symptome

### Ursachen und Anmerkungen

Reinheit geringer als erwartet (Fortsetzung)

Bei einigen Gewebetypen kann es zu Reinheitswerten kommen, die geringer sind als erwartet. Wenn höhere Reinheitswerte gewünscht sind, reduzieren Sie die Ausgangsmenge des verarbeiteten Gewebes.

Die Proben wurden während der Verarbeitung nicht angemessen oder nicht in den richtigen Schritten vermischt. Werden die Reagenzien und Proben nicht angemessen im Inkubationsröhrchen vermischt, kann die Leistung beeinträchtigt werden.

Wenn Feststoffe in Kammer 1 der Kartusche übertragen werden, kann dies dazu führen, dass Feststoffe und Kontaminanten gemeinsam aufgereinigt werden. Entfernen Sie die Feststoffe, bevor Sie die lysierte Probe in die Kartusche übertragen.

RNA-Kontamination

Es wurde keine RNase A-Lösung zu Kammer 3 der Kartusche hinzugegeben, oder es wurde ein unvollständiges Volumen an RNase A-Lösung hinzugegeben. Verarbeiten Sie die Probe erneut mit RNase A-Lösung, oder behandeln Sie die extrahierte gDNA-Probe mit RNase A.

Harzübertragung

Die Proben wurden während der Verarbeitung nicht angemessen oder nicht während der richtigen Schritte vermischt. Werden die Reagenzien und Proben im Inkubationsröhrchen oder in Kammer 1 nicht richtig zusammengemischt, kann dies die Harzübertragung in der Kartusche und im Elutions-Gefäß beeinträchtigen.

Es wurde eine zu große Probenmenge oder eine Probe mit zu viel genomischer DNA verarbeitet. Eine zu große Probe kann zur Übertragung einer zu großen Menge an Harz in der Kartusche oder im Elutions-Gefäß führen.

Etwas Harzübertragung ist normal und beeinträchtigt nicht die Wirksamkeit nachfolgender Prozesse. Falls erforderlich, benutzen Sie einen Elutions-Magneten ([Cat.# AS4017, Cat.# AS4018 oder beides]; getrennt lieferbar) für die Übertragung des Eluats in ein neues Gefäß. Siehe Abschnitt 11, Verwandte Produkte.

## 11. Verwandte Produkte

### Geräte und Zubehör

| Produkt                                                 | Größe       | Cat.#  |
|---------------------------------------------------------|-------------|--------|
| Maxwell® CSC 48 Instrument*                             | jeweils 1   | AS8000 |
| Maxwell® CSC Instrument*                                | jeweils 1   | AS6000 |
| Maxwell® RSC/CSC Kartuschenhalterung                    | jeweils 1   | SP6019 |
| Vordere Kartuschenhalterung für den Maxwell® RSC/CSC 48 | jeweils 1   | AS8401 |
| Hintere Kartuschenhalterung für den Maxwell® RSC/CSC 48 | jeweils 1   | AS8402 |
| RSC/CSC-Stößel                                          | 50/Packung  | AS1331 |
| Elutions-Gefäße (0,5 ml)                                | 50/Packung  | AS6201 |
| Elutions-Magnet, 16 Positionen                          | jeweils 1   | AS4017 |
| Elutions-Magnet, 24 Positionen                          | jeweils 1   | AS4018 |
| Clearing Columns                                        | je 50 Stück | Z3871  |
| RNase A-Lösung                                          | 1 ml        | A7973  |
|                                                         | 5 ml        | A7974  |
| Proteinase K-(PK-)Lösung                                | 4 ml        | MC5005 |
| Nuclease-Free Water                                     | 25 ml       | MC1191 |

\*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](http://www.promega.com).

<sup>(a)</sup>US-Pat. Nr. 7,329,488 und S. Korean Pat. Nr. 100483684.

© 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.