

Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit

Gebrauchsanweisung für das Produkt
AS1580

Achtung: Kartuschen vorsichtig handhaben. Folienversiegelungen können scharfkantig sein.

Hinweis: Um das Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit verwenden zu können, muss die Maxwell® CSC Rapid ccfDNA-Methode in das Maxwell® CSC oder Maxwell® CSC 48 Instrument geladen werden.

Maxwell® CSC Rapid ccfDNA 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. Vorbereitung von Plasmaproben.....	5
6. Vorbereitung von Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges.....	6
7. Einrichtung und Betrieb des Maxwell® Instrument	9
8. Nach der Aufreinigung	11
9. Evaluierung der analytischen Leistung	11
9.A. ccfDNA-Quantität- und -Qualität.....	11
9.B. Amplifizierbarkeit und Inhibition (Störsubstanzen)	13
9.C. Quantifizierung von ccfDNA mit Fluoreszenzfarbstoff und qPCR	14
9.D. Reproduzierbarkeit.....	14
9.E. Kreuzkontamination	15
9.F. Kompatibilität mit der Next-Generation-Sequenzierung.....	15
9.G. Kompatibilität mit der Digital-PCR	15
10. Evaluierung der klinischen Leistung.....	16
11. Überlegungen bei der Arbeit mit ccfDNA	16
11.A. Vorbereitung von Plasma	16
11.B. Empfehlungen für die ccfDNA-Quantifizierung	17
12. Fehlerbehebung.....	18
13. Verwandte Produkte.....	19

Das Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit ist nur in bestimmten Ländern erhältlich.

1. Beschreibung

Das Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit bietet in Kombination mit den in Tabelle 1 angegebenen Maxwell® Instruments eine einfache Methode zur effizienten automatisierten Extraktion und Aufreinigung zirkulierender zellfreier DNA (ccfDNA) von 1–4 ml humanen Plasmaproben. Die Maxwell® CSC Instruments wurden im Sinne maximaler Einfachheit und Zweckdienlichkeit für den Einsatz mit vorbereiteten Reagenzien-Kartuschen und vorprogrammierten Extraktionsmethoden entwickelt. Mit der Maxwell® CSC Rapid ccfDNA-Methode können eine oder mehrere Proben (bis zur maximalen Probenanzahl) in weniger als 30 Minuten in Maxwell® Instruments verarbeitet werden. Die extrahierte ccfDNA kann direkt in verschiedensten nachfolgenden Anwendungen, wie beispielsweise Digital-PCR und Next-Generation-Sequenzierung (NGS) verwendet werden.

Tabelle 1. Unterstützte Geräte.

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

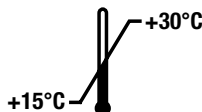
Methodenprinzip

Das Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit reinigt ccfDNA von Plasmaproben mithilfe paramagnetischer Partikel, die für eine mobile feste Phase sorgen, mit der die ccfDNA optimal gewonnen, gewaschen und aufgereinigt wird. Maxwell® Instruments sind Geräte zur magnetischen Partikelhandhabung, welche ccfDNA effizient an die paramagnetischen Partikel in den ersten drei Kammern einer vorgefüllten Kartusche binden. Die Proben werden einer Reihe von Waschungen unterzogen, bevor die ccfDNA 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 Rapid ccfDNA Kit	48 Präparationen	AS1580

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



Inhalt:

- 48 Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges (CSCS)
- 50 CSC/RSC Plungers
- 50 Elution Tubes (0,5 ml)
- 20 ml Elution Buffer (RCFD)
- 1 ml Proteinase K(PK2)-Lösung

Lagerbedingungen: Das Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit ist bei +15 °C bis +30 °C zu lagern.



Sicherheitshinweise: 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.



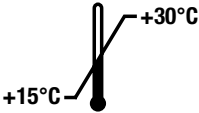
Die Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges (CSCS) sind zum Gebrauch mit potenziell infektiösen Substanzen bestimmt. Bei der Handhabung infektiöser Substanzen ist angemessene Schutzkleidung (z. B. Handschuhe, Schutzbrille) zu tragen. Beim Umgang mit allen infektiösen Substanzen in Verbindung mit diesem 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 Rapid ccfDNA Kit 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

Erklärung der Symbole

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

3. Verwendungszweck des Produkts

Das Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit ist in Kombination mit den Maxwell® CSC Instruments und der Maxwell® CSC Rapid ccfDNA-Methode als Medizinprodukt für die In-vitro-Diagnostik (IVD) zur Durchführung automatisierter Isolierungen zirkulierender zellfreier DNA (ccfDNA) aus humanen Plasmaproben bestimmt. Die aufgereinigte ccfDNA ist für den Einsatz in auf Amplifikation basierenden In-vitro-Diagnostik-Assays geeignet, einschließlich der Digital-PCR.

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

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

4. Anwendungstechnische Grenzen des Produkts

Die Leistung des Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit wurde anhand von humanen Plasmaproben aus Vollblut gewonnen, die in Streck Cell-Free DNA BCT- und Blutentnahmeröhrchen entnommen und mit K₂EDTA-Antikoagulanz vorbereitet wurden. Der Anwender ist dafür verantwortlich, die Verwendung des Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit für die Aufreinigung von ccfDNA aus Plasma zu validieren, das in anderen Blutentnahmeröhrchen entnommen wurde.

Die Eignung der mithilfe des Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit aufgereinigten Nukleinsäure zur Verwendung bei der Next-Generation-Sequenzierung (NGS) wurde während der Produktentwicklung gezeigt, jedoch nicht validiert.

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

5. Vorbereitung von Plasmaproben

Vom Anwender bereitzustellende Materialien

- Vollblut oder Plasma
- Tischzentrifuge

Bei Vollblut, das in EDTA-Röhrchen entnommen wurde, sollte das Blut sofort nach der Entnahme verarbeitet oder bis zur Plasmaaufbereitung bei +2 °C bis +10 °C gelagert werden. Zentrifugieren Sie Vollblutproben aus EDTA-Röhrchen über ≥ 10 Minuten bei ≥ 2.000 × g, um die roten und weißen Blutkörperchen zu pelletieren. Für Streck Cell-Free DNA BCT®-Röhrchen, siehe die Anweisungen des Herstellers. Nach dem ersten Zentrifugieren der Streck Cell-Free DNA BCT®- oder EDTA-Blutentnahmeröhrchen entfernen Sie mit einer Pipette vorsichtig so viel Plasma wie möglich, ohne den Buffy Coat zu stören, und transferieren Sie es in ein neues Röhrchen. Um sicherzustellen, dass keine weißen Blutkörperchen übertragen werden, zentrifugieren Sie das Plasma ein zweites Mal für ≥ 10 Minuten bei ≥ 2.000 × g und übertragen Sie den Überstand in ein sauberes Röhrchen.

Plasma bei +2 °C bis +10 °C bis zu 1 Woche aufbewahren. Bei längerer Aufbewahrung das Plasma bei –30 °C bis –10 °C (oder unter –65 °C) aufbewahren. Vermeiden Sie es, das Plasma Gefrier-Auftau-Zyklen auszusetzen. Siehe Abschnitt 11.A für Überlegungen bei der Verwendung von gefrorenem Plasma.

6. Vorbereitung von Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges

1. Wechseln Sie die Handschuhe, bevor Sie Maxwell® CSC Cartridges, CSC/RSC Plungers und Elutions Tubes (0,5 ml) handhaben. Platzieren Sie die zu verwendenden Kartuschen in die Maxwell® CSC/RSC-Kartuschenhalterung(en), wobei Kammer 1 (die erste der größten Kammern in der Kartusche) von den Elutions-Röhrchen wegzeigt. Drücken Sie die Kartusche nach unten, bis sie an Ort und Stelle einrastet. Ziehen Sie die Folienversiegelung vorsichtig ab, sodass die gesamte Folie von der Kartusche entfernt wird. Vergewissern Sie sich, dass sämtliche Dichtklebestreifen und etwaige Kleberückstände entfernt sind, bevor Sie die Kartuschen in das Gerät einsetzen.



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

2. Je nach Gesamtvolumen der Plasmaprobe wird das Plasma nur in Kammer 1 (erste der größten Kammern), nur in die Kammern 1 und 3 (erste und dritte der größten Kammern) oder in die Kammern 1, 2 und 3 (die drei größten Kammern) der Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridge übertragen, wie in Tabelle 2 angegeben. Wechseln Sie zwischen den verschiedenen Plasmaproben die Pipettenspitze aus, um Kreuzkontaminationen zu verhindern.

Tabelle 2. Übertragung von Plasmaproben in verschiedene Kammern der Maxwell® CSC Cartridge auf Grundlage des Proben-Ausgangsvolumen.

Probenvolumen (ml)	Anweisungen zur Übertragung von Proben
1,0 ml bis 1,5 ml Plasma	Plasma nur in Kammer 1 geben. Siehe Abbildung 1, Panel A.
> 1,5 ml bis ≤ 3,0 ml Plasma	Gleiche Plasma-Volumen in die Kammern 1 und 3 geben. Siehe Abbildung 1, Panel B.
3,0 ml bis 4,0 ml Plasma	Gleiche Plasma-Volumen in die Kammern 1, 2 und 3 geben. Siehe Abbildung 1, Panel C.

Hinweise:

- **Nicht mehr als 1,5 ml Plasma pro Kammer dispensieren.**
- **Bei Plasmaproben-Ausgangsvolumen von 1,0–1,5 ml darf die gesamte Plasmaprobe nur in die Kammer 1 geladen werden.** Das Laden von Plasma in die Kammern 2 oder 3 beeinträchtigt die Wiederherstellung der ccfDNA.
- **Bei Plasmaproben-Ausgangsvolumen von 1,5–3,0 ml darf das Plasma nur in die Kammern 1 und 3 geladen werden.** Das Einbringen von Plasma in andere Kammerkonfigurationen (z. B. in die Kammern 2 und 3 oder 1 und 2) hat negative Auswirkungen auf die ccfDNA-Wiederherstellung.

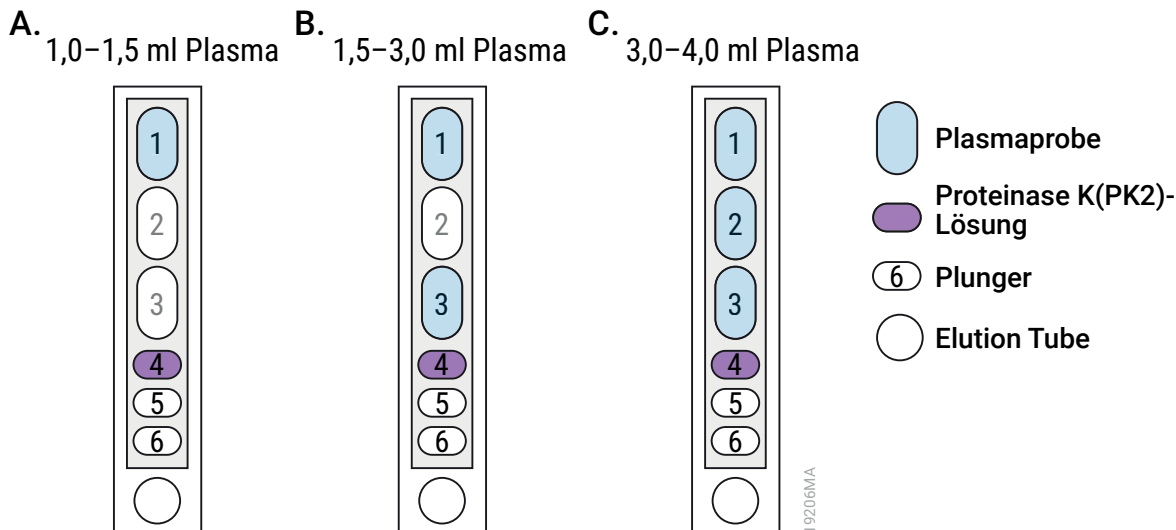


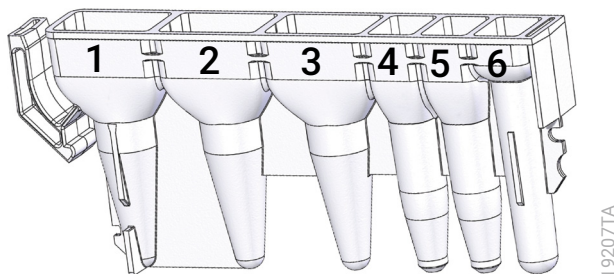
Abbildung 1. Übertragung von Plasmaproben in verschiedene Kammern der Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridge auf der Grundlage des Proben-Ausgangsvolumen. Bei 1,0–1,5 ml Plasma-Ausgangsvolumen die gesamte Probe in Kammer 1 (**Panel A**) übertragen. Bei 1,5–3,0 ml Plasma-Ausgangsvolumen gleiche Plasmavolumen in die Kammern 1 und 3 übertragen (**Panel B**). Bei 3,0–4,0 ml Plasma-Ausgangsvolumen gleiche Plasmavolumen in die Kammern 1, 2 und 3 übertragen (**Panel C**). Dispensieren Sie 10 µl der Proteinase K(PK2)-Lösung in die Kammer 4. Geben Sie in jedes Elution Tube (dargestellt durch den Kreis am Boden jedes Panels) 50 µl Elution Buffer (RCFD). Stellen Sie einen Stößel in Kammer 6.

3. Dispensieren Sie 10 µl der Proteinase K(PK2)-Lösung in die Kammer 4.
4. Stellen Sie einen Stößel in die Kammer 6 jeder Kartusche.
5. Stellen Sie ein leeres Elution Tube an die hierfür vorgesehene Position jeder Kartusche in der Kartuschenhalterung. Geben Sie auf den Boden jedes Elution Tube 50 µl Elution Buffer (RCFD).
6. Fahren Sie mit Abschnitt 7 „Einrichtung und Betrieb des Maxwell® Instrument“ fort.

Hinweise:

- a. 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 Maxwell® Instrument Bleiche.
- b. Verwenden Sie nur die mitgelieferten Elution Tubes mit 0,5 ml aus dem Kit; andere Röhrchen sind möglicherweise nicht mit dem Maxwell® Instrument kompatibel.
- c. Der im Lieferumfang enthaltene Elution Buffer (RCFD) ist für eine effiziente ccfDNA-Gewinnung unerlässlich. Ersetzen Sie den Elution Buffer (RCFD) nicht durch andere Elutionspuffer. Die Verwendung anderer Elutionspuffer wirkt sich negativ auf die ccfDNA-Gewinnung aus.
- d. Höhere ccfDNA-Konzentrationen können mit weniger als 50 µl Elution Buffer (RCFD) erreicht werden, die Gesamtausbeute kann jedoch verringert sein.

6. Vorbereitung von Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges (Fortsetzung)



Vom Anwender in die Kammer zu geben:

1. Plasmaprobe (siehe Tabelle 2 und Abbildung 1 für Details.)
oder
- 1., 3. Plasmaprobe
oder
- 1., 2., 3. Plasmaprobe
4. Proteinase K(PK2)-Lösung
6. CSC/RSC Plunger

Abbildung 2. Maxwell® CSC Cartridge. Die Plasmaprobe wird in Kammer 1 (1,0–1,5 ml Probe), in die Kammern 1 und 3 (1,5–3,0 ml Probe) oder in die Kammern 1, 2 und 3 (3,0–4,0 ml Probe) gegeben, je nach Probenvolumen; 10 µl Proteinase K(PK2)-Lösung wird in Kammer 4 gegeben und ein Stößel in Kammer 6 gestellt.



Abbildung 3. Anordnung und Konfiguration der Kartuschenhalterung(en). In die Elutions-Röhrchen wird, wie angegeben, Elution Buffer (RCFD) gegeben. Die Stößel befinden sich in Kammer 6 der Kartusche. Die abgebildete Kartuschenhalterung gehört zum Maxwell® CSC Instrument (Cat.# AS6000).

7. Einrichtung und Betrieb des Maxwell® Instrument

Ausführliche Informationen hierzu finden Sie in der Betriebsanleitung 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® CSC IVD-mode-Software durch zweimaliges Antippen des Symbols auf dem Desktop. Das Gerät führt einen Selbsttest durch und setzt alle beweglichen Teile zurück.
2. Wählen Sie auf dem Startbildschirm **Start** aus.
3. Scannen Sie den Barcode oben rechts auf dem Etikett des Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit oder geben Sie ihn ein und tippen Sie dann auf **OK**, um das auszuführende Verfahren automatisch auszuwählen (Abbildung 4).

Hinweis: Der Verfahrens-Barcode des Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit wird für die ccfDNA-Aufreinigung auf den Maxwell® CSC Instruments benötigt. Das Etikett des Kits enthält zwei Barcodes. Der Verfahrens-Barcode ist in Abbildung 4 zu sehen. Wenn der Barcode nicht gescannt werden kann, wenden Sie sich bitte an Promega Technical Services.



Abbildung 4. Kit-Etikett mit dem zu scannenden Barcode. Der Barcode, der gescannt werden muss, um einen Aufreinigungslauf zu starten, ist in der blauen Umrandung oben rechts auf dem Kit-Etikett aufgedruckt.

4. Vergewissern Sie sich auf dem Bildschirm „Kartuschen-Einrichtung“, dass das Maxwell® CSC Rapid ccfDNA-Verfahren 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 wählen Sie die Schaltfläche **Fortsetzen** aus, um fortzufahren.

Hinweis: Bei Verwendung des Maxwell® CSC 48 Instrument müssen Sie die Schaltflächen **Vorderseite** oder **Rückseite** auswählen, um die Kartuschenpositionen an jeder Kartuschenhalterung festzulegen oder aufzuheben.

7. Einrichtung und Betrieb des Maxwell® Instrument (Fortsetzung)

5. Überprüfen Sie nach dem Öffnen der Tür, ob alle Elemente der Checkliste Extraktion ausgeführt wurden. Überprüfen Sie, ob die Plasmaproben in die richtigen Kammern der Kartuschen gegeben wurden, ob die Proteinase K(PK2)-Lösung in die Kammer 4 geladen wurde, sich die Stößel in Kammer 6 befinden, die Kartuschen in das Gerät geladen wurden und unverschlossene Elutions-Röhrchen mit Elution Buffer (RCFD) vorhanden sind. Setzen Sie die Kartuschenhalterung(en) mit den vorbereiteten Kartuschen in die Maxwell® Instrument-Plattform ein.

Einsetzen der Maxwell® Kartuschenhalterung(en): 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 sich die Elutions-Röhrchen in nächster Nähe zur Tür befinden. 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. Wählen Sie die Schaltfläche **Start** aus, 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 6, Elutions-Röhrchen 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 beheben. Wählen Sie erneut die Schaltfläche **Start** aus, um den Scan der Kartuschenhalterung zu wiederholen und mit dem Extraktionslauf zu beginnen.

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

Hinweise:

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

Ende des Laufs

9. Befolgen Sie am Ende des Verfahrens die Anweisungen auf dem Bildschirm, um die Tür zu öffnen. Vergewissern Sie sich, dass sich die Stößel am Ende des Laufs in Kammer 6 der Kartusche befinden. Sind noch Stößel auf der Stößelhalterung vorhanden, 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-Röhrchen mit der DNA und verschließen Sie die Röhrchen.
Entnehmen Sie unbedingt die aufgereinigten Nukleinsäure-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 Plungers und Elution Tubes dürfen nicht wiederverwendet werden.



8. Nach der Aufreinigung

Bestimmen Sie, ob die aufgereinigte ccf-DNA-Probe die Ausgangsanforderungen für das entsprechende nachfolgende Diagnostik-Assay erfüllt, bevor Sie sie in diesem Assay verwenden. Wenn die eluierten ccfDNA-Proben nicht unmittelbar verarbeitet werden, lagern Sie sie für maximal 7 Tage bei 4 °C. Falls eine längere Lagerung erforderlich ist, frieren Sie die Proben bei –20 °C oder –70 °C und darunter ein. Spezifische Empfehlungen für die Lagerung und Handhabung von Proben finden Sie in der Anleitung für nachfolgende Anwendungen.

9. Evaluierung der analytischen Leistung

Die analytische Leistung des Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit wurde unter Verwendung von in den Maxwell® CSC und Maxwell® CSC 48 Instruments verarbeiteten humanen Plasmaproben bewertet. Um die Zuverlässigkeit und Eignung der mit dem Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit extrahierten ccfDNA für nachgelagerte Anwendungen zu bestätigen, wurden Schlüsselparameter wie ccfDNA-Quantität, -Qualität, -Amplifizierbarkeit, -Reproduzierbarkeit und -Kontamination bewertet.

9.A. ccfDNA-Quantität- und -Qualität

Plasmaproben wurden aus dem Blut von sechs Personen isoliert, die entweder in K₂EDTA-Röhrchen oder in Streck Cell-Free DNA BCT®-Röhrchen entnommen wurden. ccfDNA wurde aus 1–4 ml Plasmaproben mit dem Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit extrahiert. ccfDNA-Quantität und -Qualität wurden mithilfe der TapeStation-Analyse (Agilent Technologies, Inc.) eines biologischen Replikats pro Bedingung bewertet, wobei der Schwerpunkt auf dem prozentualen Anteil zellfreier DNA (cfDNA) und der Größe des größten DNA-Peaks lag, der die Fragmentqualität widerspiegelt. Prozentuale cfDNA bezieht sich auf das Verhältnis von DNA-Fragmenten im Bereich von 50–700 bp im Verhältnis zum Gesamt-DNA-Gehalt in der aufgereinigten Probe, wie durch TapeStation-Analyse bestimmt. Dieser Wert ist ein Maß für die Anreicherung der Probe mit ccfDNA, die in der Regel kleiner ist, da sie aus fragmentierter DNA stammt, die nach dem Zelltod freigesetzt wird.

9.A. ccfDNA-Quantität- und -Qualität (Fortsetzung)

Die TapeStation-Analyse ergab, dass der prozentuale Anteil der cfDNA zwischen 76 und 93 % lag, wobei die größten Peaks zwischen 177 bp und 203 bp in allen aufgereinigten ccfDNA-Proben lagen. Es gab keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Anteils oder der Qualität der ccfDNA, die aus Plasma extrahiert wurde, das in verschiedenen gerinnungshemmenden Röhrchen oder verschiedenen Plasmaprobenvolumen entnommen wurde.

Tabelle 3. TapeStation-Analyse der aufgereinigten ccfDNA mit Angabe des prozentualen Anteils zellfreier DNA und des größten Peaks über verschiedene Plasmaproben-Ausgangsvolumen und Antikoagulanzen hinweg.

Proben-ID (Antikoagulans)	Plasmaproben-Ausgangsvolumen (ml)	Prozent zellfreie DNA	Größter Peak (bp)
1 (K ₂ EDTA)	1,0	81	186
	1,5	79	181
	3,0	80	183
	4,0	79	183
2 (K ₂ EDTA)	1,0	81	177
	1,5	88	178
	3,0	84	179
	4,0	91	175
3 (K ₂ EDTA)	1,0	90	184
	1,5	90	187
	3,0	89	183
	4,0	88	185
4 (Streck)	1,0	93	195
	1,5	76	200
	3,0	89	193
	4,0	84	192

Proben-ID (Antikoagulans)	Plasmaproben-Ausgangsvolumen (ml)	Prozent zellfreie DNA	Größter Peak (bp)
5 (Streck)	1,0	92	195
	1,5	92	197
	3,0	90	195
	4,0	89	194
6 (Streck)	1,0	89	183
	1,5	79	182
	3,0	86	203
	4,0	86	203

9.B. Amplifizierbarkeit und Inhibition (Störsubstanzen)

Die Amplifizierbarkeit der aufgereinigten ccfDNA und das Fehlen von Inhibition wurden mit einem qPCR-Assay zur Amplifizierung eines 75-bp-DNA-Ziels und zur Analyse der qPCR-Daten auf etwaige Inhibitionen bewertet. ccfDNA wurde in vierfacher Ausfertigung aus jeder der 4 ml humanen Plasmaproben extrahiert, die von sechs Personen entweder in K₂EDTA-Röhrchen oder in Streck Cell-Free DNA BCT®-Röhrchen entnommen wurden. Jede extrahierte ccfDNA-Probe wurde mit dem qPCR-Assay analysiert. Die Mittelwerte der internen Positivkontrolle (IPC) $|\Delta C_q|$ wurden im Verhältnis zum qPCR-Standard berechnet, dessen Konzentration der der qPCR-amplifizierten ccfDNA-Probe am nächsten lag, um das Ausmaß der Inhibition zu bestimmen.

Die qPCR-Ergebnisse (Tabelle 4) wiesen auf eine minimale oder keine Amplifikationsinhibition hin, wie aus den mittleren IPC $|\Delta C_q|$ -Werten $\leq 0,5$ für alle aufgereinigten ccfDNA-Proben hervorgeht.

Tabelle 4. Bewertung der Inhibition durch Amplifikation von ccfDNA, die aus 4 ml humanen Plasmaproben extrahiert wurde.

Proben-ID (Antikoagulans)	Mittlerer IPC-Wert $ \Delta C_q $
1 (K ₂ EDTA)	0,2
2 (K ₂ EDTA)	0,2
3 (K ₂ EDTA)	0,4
4 (Streck)	0,5
5 (Streck)	0,3
6 (Streck)	0,3

9.C. Quantifizierung von ccfDNA mit Fluoreszenzfarbstoff und qPCR

Die Konsistenz der ccfDNA-Quantifizierung wurde durch den Vergleich der ccfDNA-Konzentrationen unter Verwendung einer doppelsträngigen DNA-spezifischen, auf Fluoreszenzfarbstoff basierenden Methode und einem qPCR-Assay, der ein 75-bp-DNA-Ziel amplifizierte, bewertet. ccfDNA wurde in vierfacher Ausfertigung aus jeder der 4 ml humanen Plasmaproben extrahiert, die von sechs Personen entweder in K₂EDTA-Röhrchen oder in Streck Cell-Free DNA BCT®-Röhrchen entnommen wurden. Das Verhältnis der fluoreszenzbasierten ccfDNA-Quantifizierung zur qPCR-basierten ccfDNA-Quantifizierung wurde berechnet.

Die Ergebnisse zeigten eine starke Korrelation zwischen den beiden Quantifizierungsmethoden, wobei das Verhältnis der ccfDNA-Konzentrationen bei allen Proben zwischen 0,7 und 1,4 lag.

Tabelle 5. Vergleich der ccfDNA-Konzentration mit fluoreszenzbasierten und qPCR-basierten Quantifizierungsmethoden.

Proben-ID (Antikoagulans)	Konzentrationsverhältnis von Fluoreszenz zu qPCR
1 (K ₂ EDTA)	0,7
2 (K ₂ EDTA)	1,3
3 (K ₂ EDTA)	0,9
4 (Streck)	1,3
5 (Streck)	0,9
6 (Streck)	1,4

9.D. Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der ccfDNA-Extraktion mit dem Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit wurde durch die Analyse des prozentualen Variationskoeffizienten (CV) innerhalb und zwischen den Durchläufen für die ccfDNA-Ausbeute bewertet. Unter Verwendung von 4 ml Plasma, das in K₂EDTA-Antikoagulans gesammelt wurde, wurde die ccfDNA in drei aufeinanderfolgenden Extraktionsläufen sowohl mit dem Maxwell® CSC Instrument als auch mit dem Maxwell® CSC 48 Instrument extrahiert. Jeder Extraktionslauf ergab 24 ccfDNA-Eluat. Die ccfDNA-Ausbeute wurde mit einem qPCR-Assay quantifiziert, der ein 75-bp-DNA-Ziel amplifizierte.

Die Ergebnisse zeigten, dass der prozentuale Variationskoeffizient innerhalb der Läufe für das Maxwell® CSC Instrument 11 % und für das Maxwell® CSC 48 Instrument 14 % betrug. Der Variationskoeffizient (% CV) zwischen den Läufen betrug für beide Geräte 5 %.

Tabelle 6. Variabilität der ccfDNA-Ausbeute zwischen den Läufen und innerhalb der Läufe.

Gerät	Antikoagulans	Plasmaproben-Ausgangsvolumen (ml)	Prozentualer Variationskoeffizient innerhalb von Läufen.	Prozentualer Variationskoeffizient zwischen Läufen.
Maxwell® CSC	K ₂ EDTA	4	11 %	5 %
Maxwell® CSC 48	K ₂ EDTA	4	14 %	5 %

9.E. Kreuzkontamination

Das Potenzial für Kreuzkontaminationen während der ccfDNA-Extraktion mit dem Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit wurde durch die Verarbeitung von humanen und bovinen Plasmaproben bewertet, die auf abwechselnden Kartuschenhalterungspositionen der Maxwell® CSC und Maxwell® CSC 48 Instruments platziert wurden. ccfDNA-Eluate aus bovinem Plasma wurden mit einem qPCR-Assay, der ein human-spezifisches 75-bp-DNA-Target amplifizierte, auf das Vorhandensein von kontaminierender humaner DNA untersucht, um jegliche Kreuzkontamination zu bestimmen.

Als humane Plasmaproben in den Maxwell® Instrument-Kartuschenhalterungspositionen neben bovinen Plasmaproben verarbeitet wurden, wies keines der bovinen ccfDNA-Eluate quantifizierbare Mengen an humaner DNA im qPCR-Assay auf, was die Abwesenheit einer nachweisbaren Kreuzkontamination bestätigt.

9.F. Kompatibilität mit der Next-Generation-Sequenzierung

Die Kompatibilität von ccfDNA-Eluaten mit Next-Generation-Sequencing-(NGS)-Workflows wurde durch die Präparation von ccfDNA-Bibliotheken mit anschließender TapeStation-Analyse evaluiert. ccfDNA wurde aus Plasmaproben extrahiert, die entweder in K₂EDTA-Röhrchen oder in Streck Cell-Free DNA BCT®-Röhrchen gesammelt wurden, wobei das Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit mit dem Maxwell® CSC oder dem Maxwell® CSC 48 Instrument verwendet wurde. Die erfolgreiche Bibliotheksvorbereitung wurde durch die Beobachtung einer charakteristischen Adapter-Basenpaarverschiebung in der TapeStation-Analyse bestimmt.

Alle ausgewerteten ccfDNA-Bibliotheken wiesen die erwartete Adapter-Basenpaarverschiebung auf, was die erfolgreiche NGS-Bibliotheksvorbereitung bestätigte.

9.G. Kompatibilität mit der Digital-PCR

Die Kompatibilität von ccfDNA-Eluaten mit digitalen PCR-Arbeitsabläufen (dPCR) wurde anhand eines digitalen Tröpfchen-PCR-Assays bewertet. Die Studie umfasste ccfDNA-Proben, die aus humanem Plasma extrahiert wurden, das sowohl in K₂EDTA-Röhrchen als auch in Streck Cell-Free DNA BCT®-Röhrchen mit Plasmaproben-Ausgangsvolumen von 3 ml und 4 ml entnommen wurde. ccfDNA-Eluate wurden mit einem „Copy Number Variation Assay“ (PIK3CA-Gen) bewertet und die Tröpfchenzahl wurde aufgezeichnet.

Die Ergebnisse zeigten eine erfolgreiche Amplifikation über alle getestete ccfDNA-Proben hinweg, wobei die Anzahl der Tröpfchen 15.000 pro Reaktion überstieg.

10. Evaluierung der klinischen Leistung

Die klinische Leistung des Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kits wurde von einem externen klinischen Labor unter Verwendung von humanen Plasmaproben, die mit dem Maxwell® CSC 48 Instrument verarbeitet wurden, bewertet.

In der ersten Studie reinigten zwei Tester unabhängig voneinander ccfDNA aus 1,5 ml humanen Plasmaproben (n = 10), wobei sie sowohl das Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit als auch die vom Labor als Referenz verwendete Standardaufreinigungsmethode verwendeten. Die resultierenden ccfDNA-Eluat wurden mit einem auf Amplifikation basierenden Assay auf den Rhesusfaktor analysiert. ccfDNA, die mit dem Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit aus humanen Plasmaproben extrahiert wurde, zeigte die erwarteten Ergebnisse, die mit den Ergebnissen übereinstimmten, die mit ccfDNA erzielt wurden, die mit der Laborreferenzmethode extrahiert wurde.

In der zweiten Studie reinigten zwei Tester unabhängig voneinander ccfDNA aus 1,5 ml humanen Plasmaproben (n = 10) mit dem Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit auf. Die aufgereinigten ccfDNA-Eluat wurden mit einem auf Amplifikation basierenden Assay auf den Rhesusfaktor untersucht, und die Ergebnisse der beiden Tester stimmten überein.

11. Überlegungen bei der Arbeit mit ccfDNA

11.A. Vorbereitung von Plasma

Ein mögliches Problem bei der Reinigung von ccfDNA ist das Vorhandensein von kontaminierender genomischer DNA aus lysierten weißen Blutkörperchen. Das Plasma wird in der Regel zweimal zentrifugiert; beim ersten Schleudern werden die roten und weißen Blutkörperchen entfernt, beim zweiten Schleudern werden die restlichen weißen Blutkörperchen entfernt. Wenn die Blutprobe über längere Zeit bei Raumtemperatur inkubiert oder eingefroren und vor der Verarbeitung aufgetaut wurde, können einige weiße Blutkörperchen lysiert worden sein, wodurch genomische DNA in das Plasma gelangt ist.

Wenn die Plasmaprobe eingefroren wurde, kann nach dem Auftauen Kryopräzipitat vorhanden sein. Während Kryopräzipitat keinen Einfluss auf die Aufreinigung von ccfDNA mit dem Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit hat, kann es das Pipettieren von Plasma beeinträchtigen. Um das Kryopräzipitat zu pelletieren, zentrifugieren Sie die Plasmaprobe bei $\geq 1.000 \times g$ für ≥ 5 Minuten vor der Verarbeitung.

11.B. Empfehlungen für die ccfDNA-Quantifizierung

Die geringe Konzentration und die Fragmentierung der ccfDNA stellen besondere Herausforderungen dar. Im Plasma gesunder Menschen sind Ausbeuten von 5–30 ng ccfDNA pro Milliliter Plasma typisch. Die meisten ccfDNA-Fragmente haben eine Länge von ca. 160–200 bp, mit zusätzlichen Fragmenten von ca. 340 bp und 510 bp.

UV-Quantifizierung

Die genaue Bestimmung der ccfDNA-Konzentration mithilfe der 260-nm-Extinktion ist aufgrund der geringen Konzentration schwierig. Einige Produkte verwenden eine Träger-RNA, um die ccfDNA-Aufreinigung zu verbessern. Die Träger-RNA ist in viel größerer Menge vorhanden als die ccfDNA und kopurifiziert. Dies kann einen falschen A_{260} -Wert und drastisch höhere scheinbare ccfDNA-Konzentrationen ergeben. Für eine genaue Quantifizierung sind Fluoreszenzfarbstoffe oder PCR zu verwenden.

Fluoreszenzbasierte Quantifizierung

Die hohe Sensitivität von doppelsträngigen DNA-spezifischen Farbstoffen macht sie zu einer besseren Wahl für die Quantifizierung von ccfDNA, aber es gibt zwei Bedenken. Der erste betrifft die Träger-RNA. Während doppelsträngige DNA-spezifische Farbstoffe eine viel größere Spezifität für DNA als für RNA aufweisen, kann der hohe Anteil an Träger-RNA in anderen ccfDNA-Kits die Werte der relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) aufblähen, wodurch die ccfDNA-Konzentrationen höher erscheinen als ihre tatsächlichen Konzentrationen.

Ein zweiter Faktor ist, dass die mit Fluoreszenzfarbstoffen verwendeten Standards in der Regel hochmolekulare genomische oder Lambda-DNA sind. ccfDNA ist stark fragmentiert und hat ein relativ geringes Molekulargewicht. Daher bindet sie Fluoreszenzfarbstoffe nicht so effektiv wie hochmolekulare DNA, was zu niedrigeren scheinbaren Konzentrationen führt. Verwenden Sie nach Möglichkeit DNA-Standards mit einem geringeren Molekulargewicht, um eine genauere Quantifizierung zu erhalten.

Amplifikationsbasierte Quantifizierung

Mit der qPCR oder Digital-PCR lässt sich die ccfDNA am genauesten quantifizieren. Neben der Empfindlichkeit kann die amplifikationsbasierte Quantifizierung die Eignung von Proben für nachgeschaltete Anwendungen auf Amplifikationsbasis anzeigen.

12. 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
Gerät kann Stößel nicht aufnehmen	Stellen Sie sicher, dass Sie ein Maxwell® CSC-spezifisches Chemie-Kit verwenden; die Stößel für die Maxwell® CSC Kits sind für die unterstützten Maxwell® Instruments spezifisch (siehe Tabelle 1).
Geringer ccfDNA-Ertrag	Das Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit kann eine Plasmaprobe von maximal 4 ml aufnehmen. Wiederholen Sie die Extraktion mit bis zu 4 ml Plasma. Wenn weniger als 1 ml Plasma verwendet wird, kann die ccfDNA-Gewinnung beeinträchtigt werden. Vergewissern Sie sich, dass das richtige Volumen der Proteinase K(PK2)-Lösung in Kammer 4 der Kartusche gegeben wurde. Wiederholen Sie die Extraktion, nachdem Sie 10 µl Proteinase K(PK2)-Lösung in Kammer 4 gegeben haben. Die Ausbeute kann sich verringern, wenn mit weniger als 50 µl Elution Buffer (RCFD) eluiert wird. Wiederholen Sie die Extraktion mit 50 µl Elution Buffer (RCFD). Der im Lieferumfang enthaltene Elution Buffer (RCFD) ist für eine effiziente ccfDNA-Gewinnung unerlässlich. Ersetzen Sie den Elution Buffer (RCFD) nicht durch andere Elutionspuffer. Wiederholen Sie die Extraktion mit Elution Buffer (RCFD). Vergewissern Sie sich, dass das Plasma in die richtigen Kammern der Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridge übertragen wurde (siehe Tabelle 2 und Abbildung 1 in Abschnitt 6). • Bei Plasmavolumen von 1,0–1,5 ml das gesamte Plasma in die Kammer 1 übertragen. • Bei Ausgangsplasmavolumen von 1,5–3,0 ml das gesamte Plasmavolumen in gleichen Teilen auf die Kammern 1 und 3 aufteilen. • Bei Plasmavolumen von 3,0 ml–4,0 ml gleiche Plasmavolumen in die Kammern 1, 2 und 3 übertragen.
Genomische DNA-Kontamination	Plasmavorbereitung enthält lysierte weiße Blutkörperchen. Empfehlungen zur Vorbereitung von Plasmaproben aus Vollblut finden Sie in den Abschnitten 5 und 11.A.

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

13. Verwandte Produkte

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
RSC/CSC Plungers	50/Packung	AS1331
Elution Tubes (0,5 ml)	50/Packung	AS6201
Elution Magnet, 16 Positionen	jeweils 1	AS4017
Elution Magnet, 24 Positionen	jeweils 1	AS4018

*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-Extraktionskits finden Sie unter www.promega.com.

© 2025 Promega Corporation. Alle Rechte vorbehalten.

Maxwell ist eine eingetragene Marke der Promega Corporation.

Cell-Free DNA BCT ist eine eingetragene Marke der Streck LLC.

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. Wenden Sie sich an Promega Technical Services oder rufen Sie den Online-Katalog von Promega auf, um die aktuellen Informationen zu Promega-Produkten zu erhalten.