

Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit

Gebrauchsanweisung für das Produkt
AS1560

Achtung: Kartuschen vorsichtig handhaben. Folienversiegelungen können scharfkantig sein.

Hinweis: Das Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit ist nur mit der Maxwell® CSC Softwareversion 4.0.0 oder höher oder der Maxwell® CSC 48 Softwareversion 4.1.1 oder höher kompatibel.



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Deutschland



GEBRAUCHSANWEISUNG
FÜR DAS PRODUKT

AS1560



Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA 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 und Lagerbedingungen	3
3. Verwendungszweck des Produkts	5
4. Anwendungstechnische Grenzen des Produkts	5
5. Bevor Sie beginnen	6
5.A. Vorbereitung von FFPE-Gewebeproben	6
6. Einrichtung der Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Cartridge	8
6.A. Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Cartridge einrichten.....	8
6.B. DNA-Extraktionsprotokoll	9
6.C. RNA-Extraktionsprotokoll	10
6.D. Gesamtnukleinsäure-Extraktionsprotokoll	11
6.E. DNA und RNA Sequential-Extraktionsprotokoll.....	12
7. Einrichtung und Betrieb des Maxwell® Instrument	16
8. Workflow-Effizienzen	20
9. Anweisungen für die Vorgehensweise nach der Extraktion.....	20
10. Evaluierung der analytischen Leistung	20
10.A. Quantität, -Qualität und -Amplifizierbarkeit der DNA.....	21
10.B. Quantität, Qualität und Amplifizierbarkeit der RNA	23
10.C. Quantifizierung mit Fluoreszenzfarbstoffen.....	25
10.D. Reproduzierbarkeit	26
10.E. Amplifikationshemmung durch Störsubstanzen.....	27
10.F. Kreuzkontamination	29
11. Evaluierung der klinischen Leistung.....	30
11.A. DNA-Extraktionsworkflow	30
11.B. RNA-Extraktionsworkflow	30
11.C. Gesamtnukleinsäure-Extraktionsworkflow.....	30
11.D. DNA/RNA Sequential-Extraktionsworkflow	31

12. Fehlerbehebung.....	32
13. Schaffung einer ribonukleasefreien Umgebung.....	34
14. Verwandte Produkte.....	35

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

1. Beschreibung

Das Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit wird in Kombination mit den in Tabelle 1 aufgeführten Maxwell® Instruments verwendet, um eine einfache Methode zur effizienten, automatisierten Extraktion von DNA, RNA oder Gesamtnukleinsäure (TNA) oder sowohl DNA als auch RNA nacheinander aus formalinfizierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebeproben zu ermöglichen. Die Maxwell® CSC Instruments sind für die Verwendung mit vorinstallierten Reagenzienkartuschen und zusätzlichen Reagenzien aus dem Kit vorgesehen. Die vorprogrammierten Extraktionsmethoden maximieren die Anwenderfreundlichkeit und den Komfort der Maxwell® CSC Instruments. Die Maxwell® CSC Instruments können von einer bis zur maximal zulässigen Anzahl von Proben auf effiziente Weise durch automatisierte Extraktion von DNA, RNA und Gesamtnukleinsäure (TNA) in etwa 30 Minuten und sequenzielle DNA- und RNA-Extraktionen in weniger als einer Stunde verarbeiten. Extrahierte DNA, RNA oder Gesamtnukleinsäure kann direkt in nachfolgenden, auf Amplifikation basierenden Assays verwendet werden.

Tabelle 1. Unterstützte Instrumente.

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

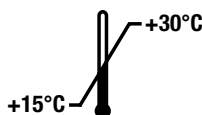
Prinzip der Methode: Das Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit extrahiert Nukleinsäure mithilfe von paramagnetischen Partikeln, die eine mobile feste Phase zur Optimierung der Probenaufnahme, des Waschvorgangs und der Extraktion von DNA, RNA oder Gesamtnukleinsäure darstellen. Optional können sowohl DNA als auch RNA nacheinander aus derselben FFPE-Gewebeprobe extrahiert werden, ohne dass das Lysat geteilt werden muss. Die Maxwell® CSC Instruments sind Geräte zur magnetischen Partikelhandhabung. Dieses System ermöglicht eine effiziente Bindung der Nukleinsäure an die paramagnetischen Partikel in der ersten Kammer einer vorgefüllten Kartusche und bewegt die paramagnetischen Partikel durch die Kammern der Kartusche weiter. Dieser Ansatz für die magnetische Erfassung vermeidet häufige Probleme wie verstopfte Spitzen oder unvollständige Reagenzienübertragungen, die zu einer suboptimalen Extraktionsverarbeitung durch andere übliche automatische Systeme führen.

Berücksichtigungen für die Probe: Die Extraktion von Nukleinsäure aus FFPE-Proben kann aufgrund von Gewebeeigenschaften wie Fibrosität, Lipidzusammensetzung, Nukleaseanteilen und der Zellanzahl, die im Gewebeschnitt verfügbar ist, problematisch sein. Darüber hinaus hat die unterschiedliche Behandlung des Gewebes vor und während der Fixierung, einschließlich der Dauer, für die das Gewebe während der Gewebefixierung Formalin ausgesetzt wird, großen Einfluss auf den Grad der Vernetzung und Fragmentierung der Nukleinsäure im FFPE-Gewebe. Alle diese Merkmale können die Qualität und die Menge der amplifizierbaren Nukleinsäuren beeinflussen, die aus den FFPE-Gewebeschnitten extrahiert werden können. Während der Entwicklung wurde das Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit mit unterschiedlichen humanen FFPE-Gewebetypen beurteilt, um eine Extraktion der verfügbaren amplifizierbaren DNA, RNA oder Gesamtnukleinsäure durchzuführen.

2. Produktkomponenten und Lagerbedingungen

PRODUKT	GRÖSSE	CAT. #
Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit	48 Präparationen	AS1560

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



Inhalt:

- 35 ml Mineralöl
- 20 ml Lyse-Puffer
- 2 × 1 ml Proteinase K
- 2 × 100 µl Blauer Farbstoff
- 2 × 1 ml MnCl₂, 0,09 M
- 3 Phiolen DNase I (lyophilisiert)
- 48 Maxwell® CSC Cartridges (CSCR)
- 50 CSC/RSC Plungers
- 2 × 50 Elution Tubes (0,5 ml)
- 25 ml Nuclease-Free Water

Lagerbedingungen: Lagern Sie das Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit bei Umgebungstemperatur (+15 bis +30 °C). Lagern Sie rehydrierte DNase I bei –30 °C bis –10 °C. **Mehr als 10-maliges Einfrieren und Wiederauftauen ist nicht zulässig.**



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



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

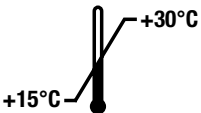


Achtung: Kartuschen vorsichtig handhaben. Folienversiegelungen können scharfkantig sein.

2. Produktkomponenten und Lagerbedingungen (Fortsetzung)

Weitere Informationen: Die Komponenten des Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA 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 im Kit enthaltenen Komponenten. Kartuschen nicht verwenden, wenn die Kartuschenversiegelung bei Erhalt nicht intakt ist.

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 XtractAll FFPE DNA/RNA Kit ist für die Verwendung in Kombination mit Maxwell® CSC Instruments und den Maxwell® CSC XtractAll-Methoden als In-vitro-Diagnostikum (IVD) für die automatisierte Isolierung von reiner DNA, reiner RNA, sequenzieller DNA und RNA oder Gesamtnukleinsäure aus humanen formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebeproben bestimmt. Die extrahierte DNA, RNA oder Gesamtnukleinsäure eignet sich zur Verwendung in auf Amplifikation basierenden In-vitro-Diagnostiktests.

Das Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit ist für die Verwendung bei einer Temperatur zwischen 15 °C und 30 °C vorgesehen. Die Verwendung außerhalb dieses Temperaturbereichs kann zu suboptimalen Ergebnissen führen. FFPE-Gewebeproben, die mit 10 % neutral gepuffertem Formalin vorbereitet wurden, können mit dem Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit verwendet werden.

Das Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt. Diagnostische Ergebnisse, die unter Verwendung von mit diesem System extrahierter DNA, RNA oder Gesamtnukleinsäure erzielt werden, müssen in Verbindung mit anderen klinischen oder Labordaten interpretiert werden.

4. Anwendungstechnische Grenzen des Produkts

Das Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit ist nur für die Verwendung mit FFPE-Gewebeproben bestimmt. Es ist nicht für den Einsatz mit anderen Proben als FFPE-Gewebeproben wie frischen oder gefrorenen Gewebeproben bestimmt. Die Leistungsmerkmale wurden bei FFPE-Gewebeproben, die mit anderen Fixierungsmitteln als 10 % neutral gepuffertem Formalin vorbereitet wurden, nicht ermittelt.

Die Eignung der mit dem Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit extrahierten Nukleinsäure für die Verwendung beim Next Generation Sequencing (NGS) wurde während der Produktentwicklung nachgewiesen, ist jedoch nicht validiert.

Für die Festlegung von Leistungsmerkmalen, die für spätere Diagnostikanwendungen benötigt werden, ist der Anwender zuständig. Bei allen nachfolgenden diagnostischen Anwendungen, bei denen DNA, RNA oder Gesamtnukleinsäure verwendet werden, die mit dem Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit extrahiert wurden, müssen geeignete Kontrollen einbezogen werden.

5. Bevor Sie beginnen

Vom Anwender bereitzustellende Materialien

- Mikrozentrifuge
- Tisch-Vortexmischer
- Pipettierer und Pipettenspitzen für die Vorbereitung der Proben und deren Übertragung in die vorgefüllten Reagenzien-Kartuschen
- 1,5–2,0-ml-Röhrchen für die Inkubation der Proben (z. B. Microtubes, 1,5 ml, Cat.# V1231)
- Heizblöcke auf 56 °C und 90 °C eingestellt
- FFPE-Gewebeproben (**Hinweis:** Die Proben müssen bei Raumtemperatur [15–30 °C] gelagert werden.)
- Isopropanol, ≥ 99,5 % molekularbiologischer Güte (für RNA-, TNA- und DNA/RNA Sequential-Workflows)
- Rasierklingen (**Hinweis:** Beim Abnehmen einer FFPE-Gewebeprobe vom Objektträger mithilfe von Rasierklingen muss vorsichtig vorgegangen werden.)

Rekonstituieren Sie bei Bedarf erneut eine Phiole lyophilisierte DNase I aus 275 µl Nuclease-Free Water und 15 µl blauem Farbstoff. Drehen Sie die Phiole um, um etwaige DNase I von der Unterseite des Deckels zu lösen, und schütteln Sie sie vorsichtig, um den Inhalt zu vermischen; nicht vortexen. Lagern Sie rekonstituierte DNase I bei –30 °C bis –10 °C. Mehr als 10-maliges Einfrieren und Wiederauftauen ist nicht zulässig.

5.A. Vorbereitung von FFPE-Gewebeproben

Halten Sie während der Verarbeitung eine RNase-freie Umgebung aufrecht. Verwenden Sie stets RNase-freie und aerosolresistente Pipettenspitzen. Wechseln Sie häufig Ihre Handschuhe, um das Risiko einer RNase-Kontamination zu verringern. Einzelheiten finden Sie in Abschnitt 13 „Schaffung einer ribonukleasefreien Umgebung“.

Während der Entwicklung wurde eine optimale Leistung des Kits bei FFPE-Gewebeschnitten mit einer Gesamtdicke von bis zu 20 µm erzielt. Mehrere Schnitte können zur Extraktion in einem Probenröhrchen kombiniert werden, wobei die maximale Dicke der kombinierten Schnitte ≤ 80 µm ist. Schnitte, die dicker als 20 µm sind, stören den Proteinase-K-Verdau und führen zu einer geringen Ausbeute (siehe Abschnitt 12). Der Anwender sollte die Anzahl und die Dicke der Schnitte auf der Grundlage der Anforderungen der nachfolgenden Analyse optimieren.

Während der Entwicklung wurden als Beispiele Brust-, Leber- und Gebärmutter-FFPE-Gewebeproben evaluiert. Dabei wurde eine akzeptable Leistung festgestellt. Eine Vielzahl von FFPE-Gewebetypen kann mit dem Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit kompatibel sein, sollte aber vom Labor auf Extraktionsleistung und Kompatibilität mit nachfolgenden Assays geprüft werden.

Vorverarbeitung der FFPE-Gewebeschnitte

1. Platzieren Sie die FFPE-Gewebeschnitte in einem 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen. Bei Verwendung von FFPE-Gewebeschnitten auf Objektträgern müssen die Schnitte mit einer sauberen Rasierklinge vom Objektträger abgenommen werden.
Hinweis: Verwenden Sie für verschiedene FFPE-Gewebeproben eine neue saubere Rasierklinge, um eine Kreuzkontamination der Proben zu vermeiden.
2. Geben Sie 500 µl Mineralöl in die Probenröhrchen. 10 Sekunden lang vortexen.
3. Erhitzen Sie die Proben 5 Minuten lang auf 90 °C. Lagern Sie die Proben bei Raumtemperatur, während der Master Mix wie in Schritt 4 beschrieben vorbereitet wird.
4. Bereiten Sie unmittelbar vor der Verwendung einen Master Mix aus Lysispuffer, Proteinase K und blauem Farbstoff wie unten gezeigt vor:

Reagenz	Menge/Reaktion	Reaktionen (Anzahl der Proben + 2)	Insgesamt
Lysepuffer	224 µl	n + 2	224 µl × (n + 2)
Proteinase K	25 µl	n + 2	25 µl × (n + 2)
Blauer Farbstoff	1 µl	n + 2	1 µl × (n + 2)

5. Geben Sie in jedes Probenröhrchen 250 µl Master Mix und vortexen Sie die Proben 5 Sekunden lang.
Hinweis: Nicht verbrauchter Master Mix darf nicht aufbewahrt werden.
6. Zentrifugieren Sie die Probenröhrchen 20 Sekunden lang bei 10.000 × g, um die Schichten zu trennen. Wenn in der wässrigen Schicht (untere, blaue Schicht) ein Pellet vorhanden ist, mischen Sie sie vorsichtig, um das Pellet aufzulösen. Lassen Sie das Mineralöl sowie die beiden Phasen im Röhrchen.
7. Setzen Sie die Probenröhrchen in den 56 °C-Heizblock und inkubieren Sie sie 15 Minuten lang.
8. Setzen Sie die Probenröhrchen in den 90 °C-Heizblock und inkubieren Sie sie 1 Stunde lang.
9. Fahren Sie mit Abschnitt 6 „Einrichtung der Kartusche“ fort.

6. Einrichtung der Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Cartridge

6.A. Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Cartridge einrichten

1. Wechseln Sie die Handschuhe, bevor Sie Maxwell® CSC Cartridges (CSCR), CSC/RSC Plungers und Elution Tubes handhaben. Die Kartuschen werden in der oder den Kartuschenhalterung(en) außerhalb des Maxwell® Instrument vorbereitet und die Kartuschenhalterung(en) mit den Kartuschen und Proben zur Extraktion in das Gerät gestellt. Platzieren Sie jede Kartusche in der Kartuschenhalterung so, dass Kammer 1 (die größte Kammer in der Kartusche) am weitesten von den Elution Tubes entfernt ist (Abbildung 1). 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 Versiegelung vorsichtig ab, sodass die gesamte Folienversiegelung von der Kartusche entfernt wird. Vergewissern Sie sich, dass sämtliches Versiegelungs-Tape von der Kartusche entfernt worden ist.



Achtung: Kartuschen vorsichtig handhaben. Folienversiegelungen können scharfkantig sein.

2. Stellen Sie einen Stößel in die Kammer 8 jeder Kartusche.
3. Platzieren Sie ein leeres Elution Tube an der hierfür vorgesehenen Position in der oder den Kartuschenhalterung(en).
Hinweis: Verwenden Sie nur die Elution Tubes, die im Lieferumfang des Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit enthalten sind. Andere Elution Tubes sind u. U. nicht mit den Maxwell® CSC Instruments kompatibel und können die Extraktionsleistung beeinträchtigen.
4. Geben Sie auf den Boden jedes Elution Tubes 50 µl Nuclease-Free Water. Die Elution Tubes müssen während der Extraktion offen bleiben (Abbildung 1).
Hinweis: Verwenden Sie nur das im Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit enthaltene Nuclease-Free Water. Die Verwendung anderer Elutionspuffer kann die Extraktionsleistung oder die nachfolgende Verwendung beeinträchtigen.
5. Fahren Sie mit dem entsprechenden Abschnitt unten fort, um spezifische Anweisungen für jeden Extraktionsworkflow zu erhalten.

Extraktionstyp	Abschnitt
DNA	6.B
RNA	6.C
Gesamtnukleinsäure (TNA)	6.D
DNA/RNA Sequential	6.E

Hinweise zur Einrichtung der Kartuschenhalterung



Proben- oder Reagenzienspritzer an 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 **keinesfalls** Bleiche an Geräteteilen.



Abbildung 1. Einrichtung und Konfiguration der Kartuschenhalterung. In die Elution Tubes wird, wie angegeben, Nuclease-Free Water gegeben. Öffnen Sie die Elution Tubes vor Beginn einer Extraktionsmethode.

6.B. DNA-Extraktionsprotokoll

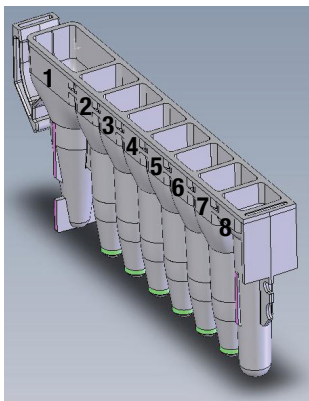
1. Übertragen Sie nach Ende der einstündigen Inkubation (Abschnitt 5.A) die blaue wässrige Phase in die Kammer 1 der Maxwell® CSC Cartridge (CSCR). Verwenden Sie für jede Probe eine neue Pipettenspitze, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Hinweise:

- a. Falls am Ende der Inkubation unverdautes Material zurückbleibt, zentrifugieren Sie die Probenröhrchen bei $10.000 \times g$ für 20 Sekunden, um unverdautes Material zu pelletieren. Geben Sie kein pelletiertes oder unverdautes Material in die Kartusche.
 - b. Überführen Sie das gesamte Volumen der blauen wässrigen Phase in die Kartusche, vermeiden Sie dabei unverdautes Material und extrahieren Sie innerhalb von 30 Minuten nach Abschluss der Inkubation.
 - c. Das Volumen der blauen wässrigen Phase im Röhrchen hängt von der Menge und der Zusammensetzung der FFPE-Gewebeprobe ab.
2. Scannen Sie den Barcode auf der Kit-Verpackung und wählen Sie dann die Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA-Methode. Tippen Sie auf **Fortsetzen**, um fortzufahren.
 3. Setzen Sie die Kartuschenhalterung in das Maxwell® Instrument ein, geben Sie die Kartuschen- und Probenverfolgungsinformationen in den Bildschirm „Kartuschen-Einrichtung“ ein, bestätigen Sie, dass die Punkte der Extraktions-Checkliste ausgeführt wurden, und tippen Sie auf die Schaltfläche **Start**, um den Extraktionslauf zu starten.

Hinweis: Ausführliche Anweisungen zur Einrichtung des Instruments finden Sie in Abschnitt 7.

6.B. DNA-Extraktionsprotokoll (Fortsetzung)



Vom Anwender in die Kammern zu geben:

1. Vorverarbeitete Proben
8. CSC/RSC Plunger

Abbildung 2. Maxwell® CSC Cartridge. In Kammer 1 wird eine vorverarbeitete FFPE-Gewebeprobe und in Kammer 8 ein Stößel gegeben.

6.C. RNA-Extraktionsprotokoll

1. Übertragen Sie nach Ende der einstündigen Inkubation (Abschnitt 5.A) die blaue wässrige Phase in die Kammer 1 der Maxwell® CSC Cartridge (CSCR). Verwenden Sie für jede Probe eine neue Pipettenspitze, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Hinweise:

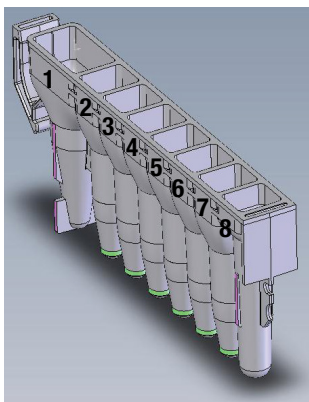
- a. Falls am Ende der Inkubation unverdautes Material zurückbleibt, zentrifugieren Sie die Probenröhrchen bei $10.000 \times g$ für 20 Sekunden, um unverdautes Material zu pelletieren. Geben Sie kein pelletiertes oder unverdautes Material in die Kartusche.
 - b. Überführen Sie das gesamte Volumen der blauen wässrigen Phase in die Kartusche, vermeiden Sie dabei unverdautes Material und extrahieren Sie innerhalb von 30 Minuten nach Abschluss der Inkubation.
 - c. Das Volumen der blauen wässrigen Phase im Röhrchen hängt von der Menge und der Zusammensetzung der FFPE-Gewebeprobe ab.
2. Bereiten Sie unmittelbar vor Gebrauch ein Gemisch aus $MnCl_2$ und DNase I zu, wie unten gezeigt:

Reagenz	Menge/Reaktion	Reaktionen (Anzahl der Proben [n] + 2)	Insgesamt
$MnCl_2$, 0,09 M	17 μ l	n + 2	17 μ l $\times$ (n + 2)
DNase I (mit blauem Farbstoff) ¹	10 μ l	n + 2	10 μ l $\times$ (n + 2)

¹Lagern Sie die verbleibende rekonstituierte DNase I mit blauem Farbstoff bei -30 bis -10 °C.

3. Geben Sie 27 µl des DNase-I-Gemischs in Kammer 7 jeder Kartusche.
- Hinweis:** Bewahren Sie das restliche unbenutzte DNase-I-Gemisch nicht auf.
4. Geben Sie 500 µl 100%igen Isopropanol in Kammer 1.
5. Scannen Sie den Barcode auf der Kit-Verpackung und wählen Sie dann die Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA-Methode. Tippen Sie auf **Fortsetzen**, um fortzufahren.
6. Setzen Sie die Kartuschenhalterung in das Maxwell® Instrument ein, geben Sie die Kartuschen- und Probenverfolgungsinformationen in den Bildschirm „Kartuschen-Einrichtung“ ein, bestätigen Sie, dass die Punkte der Extraktions-Checkliste ausgeführt wurden, und tippen Sie auf die Schaltfläche **Start**, um den Extraktionslauf zu starten.

Hinweis: Ausführliche Anweisungen zur Einrichtung des Instruments finden Sie in Abschnitt 7.



Vom Anwender in die Kammern zu geben:

1. Vorverarbeitete Proben und 500 µl 100%igen Isopropanol
7. 27 µl DNase I-Gemisch
8. CSC/RSC Plunger

Abbildung 3. Maxwell® CSC Cartridge. Die vorverarbeitete FFPE-Gewebeprobe und Isopropanol werden in Kammer 1, das DNase-I-Gemisch in Kammer 7 und ein Stößel in Kammer 8 gegeben.

6.D. Gesamtnukleinsäure-Extraktionsprotokoll

1. Übertragen Sie nach Ende der einstündigen Inkubation (Abschnitt 5.A) die blaue wässrige Phase in die Kammer 1 der Maxwell® CSC Cartridge (CSCR). Verwenden Sie für jede Probe eine neue Pipettenspitze, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

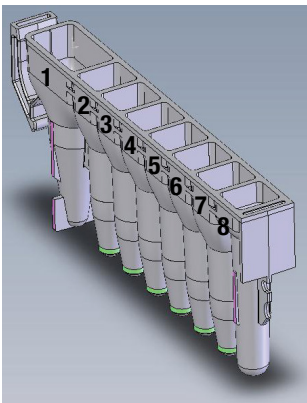
Hinweise:

- a. Falls am Ende der Inkubation unverdautes Material zurückbleibt, zentrifugieren Sie die Probenröhrchen bei $10.000 \times g$ für 20 Sekunden, um unverdautes Material zu pelletieren. Geben Sie kein pelletiertes oder unverdautes Material in die Kartusche.
- b. Überführen Sie das gesamte Volumen der blauen wässrigen Phase in die Kartusche, vermeiden Sie dabei unverdautes Material und extrahieren Sie innerhalb von 30 Minuten nach Abschluss der Inkubation.
- c. Das Volumen der blauen wässrigen Phase im Röhrchen hängt von der Menge und der Zusammensetzung der FFPE-Gewebeprobe ab.

6.D. Gesamtnukleinsäure-Extraktionsprotokoll (Fortsetzung)

2. Geben Sie 500 µl 100%igen Isopropanol in Kammer 1.
3. Scannen Sie den Barcode auf der Kit-Verpackung und wählen Sie dann die Maxwell® CSC XtractAll FFPE Total Nucleic Acid-Methode. Tippen Sie auf **Fortsetzen**, um fortzufahren.
4. Setzen Sie die Kartuschenhalterung in das Maxwell® Instrument ein, geben Sie die Kartuschen- und Probenverfolgungsinformationen in den Bildschirm „Kartuschen-Einrichtung“ ein, bestätigen Sie, dass die Punkte der Extraktions-Checkliste ausgeführt wurden, und tippen Sie auf die Schaltfläche **Start**, um den Extraktionslauf zu starten.

Hinweis: Ausführliche Anweisungen zur Einrichtung des Instruments finden Sie in Abschnitt 7.



Vom Anwender in die Kammern zu geben:

1. Vorverarbeitete Proben und 500 µl 100%igen Isopropanol
8. CSC/RSC Plunger

Abbildung 4. Maxwell® CSC Cartridge. Die vorverarbeitete FFPE-Gewebeprobe und Isopropanol werden in Kammer 1 und ein Stößel in Kammer 8 gegeben.

6.E. DNA und RNA Sequential-Extraktionsprotokoll

Bei Auswahl der DNA/RNA Sequential-Extraktionsmethode führt die Maxwell®-Software nacheinander zwei verschiedene Extraktionsläufe durch, wobei der Anwender zwischen diesen Läufen einige Reagenzien zu den Kartuschen hinzufügt. Bei der Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential-Methode wird bei der ersten Methode DNA aus der lysierten FFPE-Gewebeprobe in das erste Elution Tube extrahiert, während bei der zweiten Methode RNA aus derselben Probe in ein zweites Elution Tube extrahiert wird, wobei die gleiche Kartusche und der gleiche Stößel verwendet werden. Nachfolgend finden Sie die Anweisungen zur Einrichtung der Kartuschen für jeden dieser Extraktionsläufe.

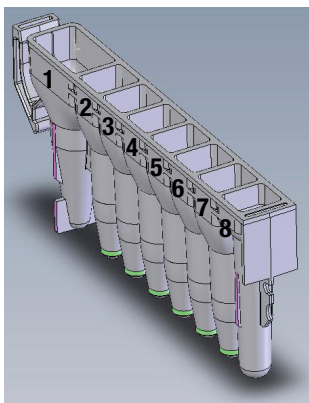
Lauf 1: DNA-Extraktion

1. Übertragen Sie nach Ende der einstündigen Inkubation (Abschnitt 5.A) die blaue wässrige Phase in die Kammer 1 der Maxwell® CSC Cartridge (CSCR). Verwenden Sie für jede Probe eine neue Pipettenspitze, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Hinweise:

- a. Falls am Ende der Inkubation unverdautes Material zurückbleibt, zentrifugieren Sie die Probenröhrchen bei $10.000 \times g$ für 20 Sekunden, um unverdautes Material zu pelletieren. Geben Sie kein pelletiertes oder unverdautes Material in die Kartusche.
 - b. Überführen Sie das gesamte Volumen der blauen wässrigen Phase in die Kartusche, vermeiden Sie dabei unverdautes Material und extrahieren Sie innerhalb von 30 Minuten nach Abschluss der Inkubation.
 - c. Das Volumen der blauen wässrigen Phase im Röhrchen hängt von der Menge und der Zusammensetzung der FFPE-Gewebeprobe ab.
2. Scannen Sie den Barcode auf der Kit-Verpackung und wählen Sie dann die Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential-Methode aus und tippen Sie auf **Fortsetzen**, um fortzufahren.
 3. Setzen Sie die Kartuschenhalterung in das Maxwell® Instrument ein, geben Sie die Kartuschen- und Probenverfolgungsinformationen in den Bildschirm „Kartuschen-Einrichtung“ ein, bestätigen Sie, dass die Punkte der Extraktions-Checkliste ausgeführt wurden, und tippen Sie auf die Schaltfläche **Start**, um den Extraktionslauf zu starten.

Hinweis: Ausführliche Anweisungen zur Einrichtung des Instruments finden Sie in Abschnitt 7.



Vom Anwender in die Kammern zu geben:

1. Vorverarbeitete Proben
8. CSC/RSC Plunger

Abbildung 5. Maxwell® CSC Cartridge. In Kammer 1 wird eine vorverarbeitete FFPE-Probe und in Kammer 8 ein Stößel gegeben.

6.E. DNA und RNA Sequential-Extraktionsprotokoll (Fortsetzung)

Inter-Run-Anweisungen

Führen Sie zwischen dem ersten FFPE DNA- und dem zweiten FFPE RNA-Extraktionslauf für die sequenzielle DNA/RNA-Methode die folgenden Schritte durch:

4. Befolgen Sie am Ende des FFPE-DNA Sequential-Extraktionsverfahrens die Anweisungen auf dem Bildschirm, um die Tür zu öffnen. Vergewissern Sie sich, dass sich die Stößel am Ende des Laufs in Kammer 8 der Kartusche befinden. Sind noch Stößel an der Stößelhalterung geladen, befolgen Sie die Anweisungen in der entsprechenden Betriebsanleitung zu Ihrem Maxwell® Instrument (siehe Tabelle 1) und führen Sie das Reinigungs-Verfahren durch, um die Stößel zu entladen, sofern möglich. Zur Vorbereitung des FFPE-RNA-Sequential-Extraktionslaufs wird ein neuer Bildschirm für die Kartuschen-Einrichtung angezeigt.
5. Verschließen Sie die Elution Tubes mit der DNA und entnehmen Sie die Röhrchen sofort, um zu verhindern, dass die Eluate verdunsten.
6. Am Ende des FFPE DNA Sequential-Extraktionslaufs wird das Harz in Kammer 2 deponiert, um den FFPE RNA Sequential-Extraktionslauf vorzubereiten.

Hinweise:

- a. Entfernen oder entsorgen Sie keine Kartuschen oder Stößel aus der Kartuschenhalterung. Sie werden für die FFPE RNA Sequential-Extraktion wiederverwendet.
- b. Fahren Sie mit der FFPE RNA Sequential-Extraktion innerhalb von 2 Stunden nach Abschluss der FFPE DNA Sequential-Extraktion fort.
7. Es wird der Bildschirm „Kartuschen-Einrichtung“ angezeigt, der die vor dem ersten DNA-Extraktionslauf eingegebenen Probenpositionen und Verfolgungsinformationen angibt. Falls erforderlich, können diese Informationen durch Tippen auf die Schaltfläche **Bearbeitung zulassen** bearbeitet werden, um Änderungen an den verarbeiteten Kartuschen zu berücksichtigen. Siehe Abschnitt 8 für weitere Informationen.
8. Tippen Sie auf die Schaltfläche **Fortsetzen**, um den Bildschirm „Checkliste Extraktion“ zu öffnen.

Lauf 2: RNA-Extraktion

9. Platzieren Sie in allen Kartuschen ein leeres Elution Tube an der hierfür vorgesehenen Position in der oder den Kartuschenhalterung(en).

Hinweis: Verwenden Sie nur die Elution Tubes, die im Lieferumfang des Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit enthalten sind. Andere Elution Tubes sind u. U. nicht mit dem Maxwell® CSC Instrument kompatibel und können die RNA-Extraktionsleistung beeinträchtigen.

10. Geben Sie auf den Boden jedes Elution Tubes 50 µl Nuclease-Free Water. Die Elution Tubes müssen während der RNA-Extraktion offen bleiben (Abbildung 7).

Hinweis: Verwenden Sie nur das im Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit enthaltene Nuclease-Free Water. Die Verwendung anderer Elutionspuffer kann die RNA-Extraktionsleistung oder die nachfolgende Verwendung beeinträchtigen.

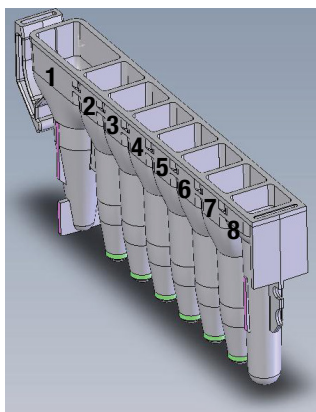
11. Bereiten Sie unmittelbar vor Gebrauch ein Gemisch aus MnCl_2 und DNase I zu, wie unten gezeigt:

Reagenz	Menge/Reaktion	Reaktionen (Anzahl der Proben + 2)	Insgesamt
MnCl_2 , 0,09 M	17 μl	n + 2	17 μl $\times$ (n + 2)
DNase I ¹ (mit blauem Farbstoff)	10 μl	n + 2	10 μl $\times$ (n + 2)

¹Lagern Sie die verbleibende rekonstituierte DNase I mit blauem Farbstoff bei -30 bis -10 °C.

12. Geben Sie 27 μl des DNase I-Gemischs in Kammer 7 jeder Kartusche.
- Hinweis:** Bewahren Sie das restliche unbenutzte DNase-I-Gemisch nicht auf.
13. Geben Sie 500 μl 100%igen Isopropanol in Kammer 1.
14. Setzen Sie die Kartuschenhalterung in das Maxwell® Instrument ein, bestätigen Sie, dass die Punkte der Extraktions-Checkliste ausgeführt wurden, und tippen Sie auf die Schaltfläche **Start**, um den zweiten FFPE RNA Sequential Extraktionslauf zu starten.

Hinweis: Ausführliche Anweisungen zur Einrichtung des Instruments finden Sie in Abschnitt 7.



Vom Anwender in die Kammern zu geben:

1. 500 μl 100%igen Isopropanol (in vorhandene Probe in Kammer 1 geben)
7. 27 μl DNase I-Gemisch
8. CSC/RSC Plunger (gleicher Stößel für die FFPE DNA Sequential-Extraktion verwendet, der bereits in Kammer 8 vorhanden sein sollte)

Abbildung 6. Maxwell® CSC Cartridge. Isopropanol wird in die vorhandene Probe in Kammer 1 gegeben, DNase I-Gemisch in Kammer 7, und der gleiche Stößel, der beim FFPE DNA Sequential-Extraktionslauf verwendet wurde, sollte sich in Kammer 8 befinden.

6.E. DNA und RNA Sequential-Extraktionsprotokoll (Fortsetzung)



Abbildung 7. Einrichtung und Konfiguration der Kartuschenhalterung. In die Elution Tubes wird, wie angegeben, Nuclease-Free Water gegeben. Öffnen Sie die Elution Tubes vor Beginn der Extraktionsmethode.

7. Einrichtung und Betrieb des Maxwell® Instrument

Die Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA, RNA, TNA und DNA/RNA Sequential Methods für das Maxwell® CSC Instrument können heruntergeladen werden unter:

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

Die Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA, RNA, TNA und DNA/RNA-Sequential Methods für das Maxwell® CSC 48 Instrument können heruntergeladen werden unter:

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

Hinweis: Das Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit ist nur mit der Maxwell® CSC Softwareversion 4.0.0 oder höher oder der Maxwell® CSC 48 Softwareversion 4.1.1 oder höher kompatibel.

Wenn Sie befürchten, dass Ihr Gerät mit RNase verunreinigt wurde, reinigen Sie das Gerät, bevor Sie einen Lauf durchführen. Befolgen Sie die Anweisungen im Abschnitt „Reinigung und Wartung“ der *Betriebsanleitung zum Maxwell® CSC Instrument IVD-Modus TM457* oder der *Betriebsanleitung zum Maxwell® CSC 48 Instrument IVD-Modus TM623*.

1. Schalten Sie das Maxwell® Instrument und den Tablet-PC ein. Melden Sie sich bei Ihrem Tablet-PC an und starten Sie die Maxwell® 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 XtractAll FFPE DNA/RNA Kit ein oder geben Sie ihn ein (Abbildung 8).

Hinweis: Der Verfahrens-Barcode des Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit wird für die DNA-Extraktion in den Maxwell® CSC Instruments benötigt. Das Etikett des Kits enthält zwei Barcodes. Der Verfahrens-Barcode ist in Abbildung 8 zu sehen. Wenn der Barcode nicht gescannt werden kann, wenden Sie sich bitte an Promega Technical Services (techserv@promega.com).

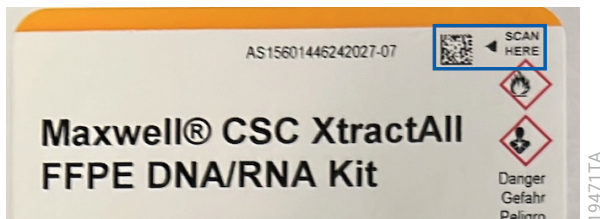


Abbildung 8. Kit-Etikett mit dem zu scannenden Barcode. Der Barcode, der gescannt werden muss, um einen Extraktionslauf zu starten, ist in der blauen Umrandung oben rechts auf dem Kit-Etikett aufgedruckt.

4. Wählen Sie auf dem Methodenauswahlbild die Methode aus, die dem zu bearbeitenden Workflow entspricht: Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA, Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, Maxwell® CSC XtractAll FFPE Total Nucleic Acid oder Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential.

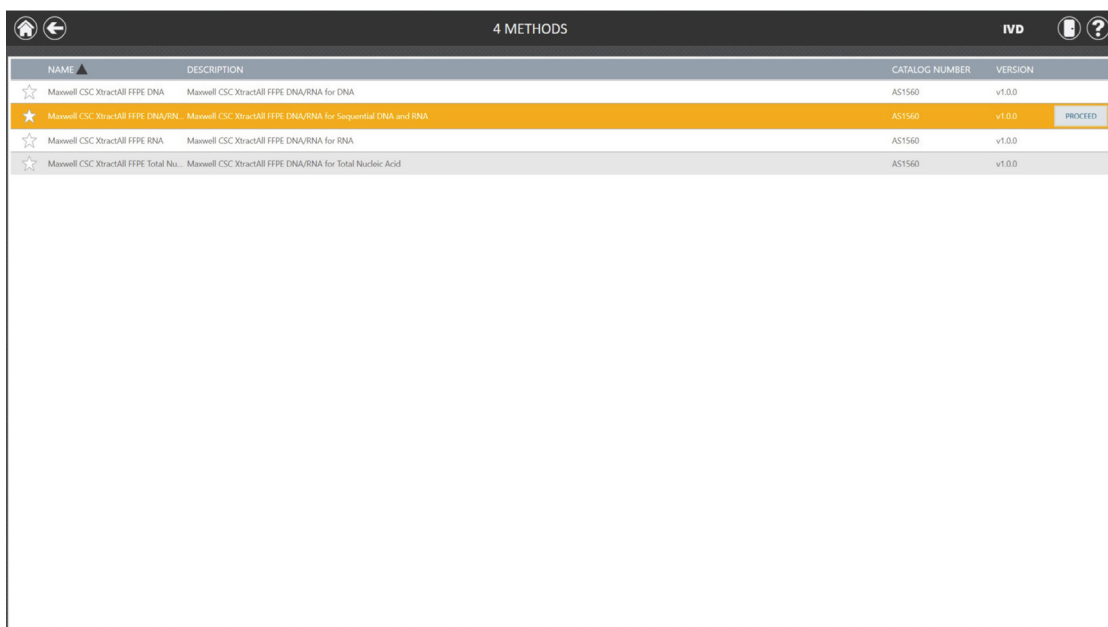


Abbildung 9. Methoden-Auswahlbildschirm. Wählen Sie auf dem Methoden-Auswahlbildschirm die Methode aus, die dem zu bearbeitenden Workflow entspricht.

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

5. Vergewissern Sie sich, dass die richtige Extraktionsmethode ausgewählt wurde, und tippen Sie auf die Schaltfläche **Fortsetzen**.
6. Tippen Sie auf dem Bildschirm „Kartuschen-Einrichtung“ auf die Kartuschenpositionen, um für diesen Extraktionslauf Positionen auszuwählen oder die Auswahl aufzuheben. Geben Sie ggf. erforderliche Probenverfolgungsinformationen ein und tippen Sie auf die Schaltfläche **Fortsetzen**, um fortzufahren.

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

7. Überprüfen Sie nach Öffnen der Tür, ob alle Elemente der Extraktions-Checkliste durchgeführt wurden. Vergewissern Sie sich, dass die vorverarbeiteten Proben in Kammer 1 der Kartuschen gegeben wurden, dass Isopropanol in Kammer 1 der Kartusche gegeben wurde (nur für RNA, TNA und FFPE RNA Sequential-Workflows), dass das DNase-I-Gemisch in Kammer 7 der Kartusche gegeben wurde (nur für RNA und FFPE RNA Sequential-Workflows), dass die Kartuschen in das Gerät geladen sind, dass unverschlossene Elution Tubes mit Nuclease-Free Water vorhanden sind und dass sich die Stößel in Kammer 8 befinden. Setzen Sie die Kartuschenhalterung mit den eingerichteten Kartuschen in die Maxwell® Instrument-Plattform ein.

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

Hinweis: Überprüfen Sie die Kennzeichnung auf den Maxwell® CSC 48 Kartuschenhalterungen mit 24 Positionen, um festzustellen, ob sie an der Vorder- oder Rückseite des Geräts angebracht werden sollten.

8. Überprüfen Sie, ob alle angegebenen Vorbereitungsschritte ausgeführt wurden, und tippen Sie auf **Start**, um die Gerätetür zu schließen und die Verarbeitung zu starten.

Hinweis: Wenn das Maxwell® CSC 48 Instrument verwendet wird und das Vision System aktiviert wurde, werden die Kartuschenhalterungen gescannt, wenn die Tür eingefahren wird. Jegliche Fehler beim Einrichten der Kartuschenhalterung (z. B. Stößel nicht in Kammer 8, Elution Tubes 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 Tippen auf das Ausrufezeichen eine Beschreibung des Fehlers aufrufen und alle Fehlerzustände später beheben. Tippen Sie erneut auf die Schaltfläche **Start**, um den Scan der Kartuschenhalterung zu wiederholen und mit dem Extraktionslauf zu beginnen.



Warnung: Quetschgefahr.

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

Hinweise:

- a. Wenn Sie auf die Schaltfläche **Abbruch** tippen, wird der aktuelle Lauf abgebrochen. Alle Proben aus einem abgebrochenen Lauf gehen verloren.
 - b. Wird der Lauf vor Beendigung abgebrochen, kann die Aufforderung angezeigt werden, zu prüfen, ob noch Stößel auf der Stößelhalterung geladen sind. Wenn Stößel an der Stößelhalterung vorhanden sind, sollten Sie die Reinigung nach Aufforderung gemäß den Anweisungen in der Betriebsanleitung für Ihr Maxwell® Instrument durchführen (siehe Tabelle 1). Wenn sich keine Stößel auf der Stößelhalterung befinden, können Sie auf Anforderung den Schritt „Reinigung“ überspringen. Die Proben sind dann nicht mehr zu verwenden.
10. Wenn der Extraktionslauf (DNA-, RNA-, TNA-Workflow) oder beide sequenziellen DNA/RNA-Extraktionsläufe abgeschlossen sind, wird auf der Benutzeroberfläche eine Meldung angezeigt, dass die Methode abgeschlossen ist.

Ende des Laufs

11. Befolgen Sie am Ende des Verfahrens die Anweisungen auf dem Bildschirm, um die Tür zu öffnen. Vergewissern Sie sich, dass sich die Stößel am Ende des Laufs in Kammer 8 der Kartusche befinden. Sind noch Stößel an der Stößelhalterung geladen, befolgen Sie die Anweisungen in der entsprechenden Betriebsanleitung zu Ihrem Maxwell® Instrument (siehe Tabelle 1) und führen Sie das Verfahren zur **Reinigung** durch, um die Stößel zu entladen, sofern möglich.
12. Verschließen Sie die Elution Tubes mit der Nukleinsäure und entnehmen Sie die Gefäße sofort nach dem Lauf, um zu verhindern, dass die Eluate verdunsten. Nehmen Sie die Maxwell® Kartuschenhalterung(en) aus dem Instrument.

Hinweis: Halten Sie die Kartuschenhalterung an den Seiten, um sie aus der Geräteplattform zu entnehmen. Stellen Sie sicher, dass die Proben aus dem Gerät entfernt werden, bevor Sie ein UV-Sanitationsprotokoll durchführen, um eine Beschädigung der extrahierten Nukleinsäure zu vermeiden. DNA-Proben können bis zu einer Woche bei 4 °C und bis zu einem Monat bei –20 °C gelagert werden. RNA- und TNA-Proben können über Nacht bei –30 °C bis –10 °C oder für eine längerfristige Lagerung bei weniger als –60 °C aufbewahrt werden.



13. Nehmen Sie die Kartuschen und Stößel aus der bzw. den Maxwell® Kartuschenhalterungen und entsorgen Sie sie gemäß den Richtlinien Ihres Instituts für gefährliche Materialien. Kartuschen und Stößel sind für die Verwendung mit einer einzigen FFPE-Gewebeprobe innerhalb eines einzigen Workflows vorgesehen, und Elution Tubes sind für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Maxwell® CSC Cartridges, CSC/RSC Plungers und Elution Tubes dürfen nicht wiederverwendet werden.

8. Workflow-Effizienzen

Der DNA/RNA Sequential-Workflow des Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit kombiniert die reine DNA-Extraktionsmethode und die reine RNA-Extraktionsmethode in einem einzigen Protokoll. Daher wird bei Verwendung des DNA/RNA Sequential-Workflows zuerst die DNA-Extraktion und anschließend die RNA-Extraktion aus derselben FFPE-Gewebeprobe durchgeführt. Der DNA/RNA Sequential-Workflow ist so konzipiert, dass DNA und RNA in getrennte Elution Tubes extrahiert werden, während die Probenverfolgungsinformationen erhalten bleiben. Die Probenverfolgung ist jedoch flexibel genug, um Änderungen zwischen den beiden Läufen zu akzeptieren.

Schritt	Für die DNA/RNA Sequential-Methode verfügbare Workflows		
	DNA/RNA Sequential	Nur DNA	Nur RNA
Proben, Kartuschen und Probenverfolgungsinformationen hinzufügen	Eingeben	Eingeben	
Erste Extraktion (DNA) der Sequential-Methode	X	X	
DNA-Eluate aus dem Gerät nehmen	X	X	
Proben, Kartuschen und Probenverfolgungsinformationen ändern	X	Entfernen	Eingeben
Zweite Extraktion (RNA) der Sequential-Methode	X		X
RNA-Eluate aus dem Gerät nehmen	X		X

9. Anweisungen für die Vorgehensweise nach der Extraktion

Stellen Sie fest, ob die Ausbeute der aufgereinigten Nukleinsäuren und die Reinheit die eingegebenen Anforderungen für das entsprechende nachfolgende Diagnostik-Assay erfüllen, bevor Sie sie in diesem Assay verwenden. Die Leistung des Kits wurde anhand der Amplifikation und der auf Fluoreszenzfarbstoff basierenden Quantifizierung der extrahierten Nukleinsäuren bewertet. Andere Quantifizierungsmethoden, einschließlich der Absorption, korrelieren möglicherweise nicht mit Nukleinsäure-Amplifikations- und Fluoreszenz-basierten Quantifizierungen. Werden Absorbanzergebnisse der aufgereinigten FFPE-Proben zugrunde gelegt, wird die Ausbeute möglicherweise überschätzt, sodass wir speziellere Verfahren empfehlen, um die Ausbeute zu ermitteln.

10. Evaluierung der analytischen Leistung

Die analytische Leistung des Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit wurde unter Verwendung von in den Maxwell® CSC und Maxwell® CSC 48 Instruments verarbeiteten humanen FFPE-Gewebeproben bewertet. Die Leistung der DNA-Extraktion wurde mit dem Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential-Workflow bewertet, da der Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA-Workflow identisch mit dem anfänglichen DNA-Extraktionsteil des Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential-Workflows ist.

10.A. Quantität, -Qualität und -Amplifizierbarkeit der DNA

Tabelle 2. Amplifikation von DNA, die mit dem Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential- und TNA-Workflows extrahiert wurde. DNA und Gesamtnukleinsäure wurden separat aus sechs einzelnen Probenreplikaten einzelner typisch großer Schnitte aus FFPE-Gewebe von Brust, Leber und Gebärmutter mithilfe der Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential- und TNA-Workflows extrahiert. Die extrahierte DNA und die Gesamtnukleinsäure wurden in einem qPCR-Assay zur Amplifikation von RNase P H1 (102 bp) zur Bewertung der DNA-Quantität sowie des Telomerase-Reverse-Transkriptase-Gens (TERT) (164 bp) als längeres DNA-Target zur Bewertung der DNA-Qualität verwendet. Für jeden Satz von Replikaten ist die durchschnittliche DNA-Konzentration angegeben. Die durchschnittliche Ausbeute an DNA aus allen FFPE-Gewebeproben betrug mindestens 100 Kopien/µl RNase P H1 und mindestens 25 Kopien/µl TERT.

Maxwell® CSC XtractAll-Workflow	FFPE-Gewebetyp	Durchschnittliche DNA-Konzentration (Kopien/µl)	
		RNase P H1	TERT
DNA/RNA Sequential	Brust	5333	7162
	Leber	10363	19609
	Gebärmutter	2762	936
TNA	Brust	1234	3815
	Leber	3718	11894
	Gebärmutter	1173	894

10.A. Quantität, Qualität und Amplifizierbarkeit der DNA (Fortsetzung)

Tabelle 3. Skalierbarkeit der DNA-Ausbeute mit den Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential- und TNA-Workflows. DNA und Gesamtnukleinsäure wurden separat aus sechs einzelnen Probenreplikaten einzelner und zweier typisch großer Schnitte aus FFPE-Gewebe von Brust, Leber und Gebärmutter jeweils mithilfe der Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential- und TNA Workflows extrahiert. Die extrahierte DNA und die Gesamtnukleinsäure wurden in einem qPCR-Assay zur Amplifikation von RNase P H1 (102 bp) zur Bewertung der DNA-Quantität sowie TERT (164 bp) als längeres Gen-Target zur Bewertung der DNA-Qualität verwendet. Dargestellt ist das durchschnittliche Verhältnis der DNA-Konzentration zwischen einem und zwei FFPE-Gewebeschnitten für jeden Satz von Replikaten. Das durchschnittliche Verhältnis der DNA-Konzentration, die aus zwei im Vergleich zu einem Schnitt von FFPE-Gewebeproben extrahiert wurde, lag sowohl für RNase P H1 als auch für TERT bei mindestens 1,4.

Maxwell® CSC XtractAll-Workflow	FFPE-Gewebetyp	Durchschnittliches Verhältnis der DNA-Konzentration von zwei FFPE-Gewebeschnitten im Vergleich zu einem einzelnen FFPE-Gewebeschnitt	
		RNase P H1	TERT
DNA/RNA Sequential	Brust	2,1	2,2
	Leber	1,7	1,7
	Gebärmutter	2,1	2,3
TNA	Brust	1,9	2,0
	Leber	2,1	2,2
	Gebärmutter	1,9	1,9

10.B. Quantität, Qualität und Amplifizierbarkeit der RNA

Tabelle 4. Amplifikation von RNA, die mit den Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential -und TNA Workflows extrahiert wurde. RNA und Gesamtnukleinsäure wurden aus sechs individuellen Replikaten einzelner typisch großer Schnitte aus FFPE-Gewebe von Brust, Leber und Gebärmutter extrahiert. Die RNA wurde mit den Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA oder DNA/RNA Sequential-Workflows extrahiert; die Gesamtnukleinsäure wurde mit dem Maxwell® CSC XtractAll FFPE TNA-Workflow extrahiert. Die extrahierte RNA und die Gesamtnukleinsäure wurden in einem RT-qPCR-Assay zur Amplifikation der Hypoxanthinphosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)-RNA (100 bp) zur Bewertung der RNA-Quantität sowie der β -Actin (ACTB)-RNA (171 bp) als längeres RNA-Target zur Bewertung der RNA-Qualität verwendet. Für jeden Satz von Replikaten ist die durchschnittliche RNA-Konzentration angegeben. Die durchschnittliche Ausbeute an RNA aus allen FFPE-Gewebeproben betrug mindestens 0,032 ng/ μ l für sowohl HPRT1- als auch ACTB RNA-Targets.

Maxwell® CSC XtractAll-Workflow	FFPE-Gewebetyp	Durchschnittliche RNA-Konzentration (ng/ μ l)	
		HPRT1	ACTB
RNA	Brust	0,27	0,17
	Leber	0,71	0,30
	Gebärmutter	0,91	0,30
DNA/RNA Sequential	Brust	0,52	0,21
	Leber	0,76	0,21
	Gebärmutter	0,64	0,13
TNA	Brust	0,91	0,21
	Leber	1,11	0,09
	Gebärmutter	1,45	0,28

10.B. Quantität, Qualität und Amplifizierbarkeit der RNA (Fortsetzung)

Tabelle 5. Skalierbarkeit der RNA-Ausbeute mit den Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA-, DNA/RNA Sequential- und TNA-Workflows. RNA und Gesamtnukleinsäure wurden aus sechs individuellen Replikaten einzelner oder zweier typisch großer Schnitte aus FFPE-Gewebe von Brust, Leber und Gebärmutter extrahiert. Die RNA wurde mithilfe des Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA- oder DNA/RNA Sequential-Workflows extrahiert; die Gesamtnukleinsäure wurde mit dem Maxwell® CSC XtractAll FFPE TNA-Workflow extrahiert. Die extrahierte RNA und die Gesamtnukleinsäure wurden in einem RT-qPCR-Assay für die Amplifikation der HPRT1-RNA (100 bp) zur Bewertung der RNA-Quantität sowie der ACTB-RNA (171 bp) als längeres RNA-Target zur Bewertung der RNA-Qualität verwendet. Dargestellt ist das durchschnittliche Verhältnis der RNA-Konzentration zwischen einem und zwei FFPE-Gewebeschnitten für jeden Satz von Replikaten. Das durchschnittliche Verhältnis der RNA-Konzentration, die aus zwei Schnitten im Vergleich zu einem Schnitt von FFPE-Gewebeproben extrahiert wurde, lag sowohl für HPRT1- als auch für ACTB-Targets bei mindestens 1,4.

Maxwell® CSC XtractAll FFPE-Workflow	FFPE-Gewebetyp	Durchschnittliches Verhältnis der RNA-Konzentration zweier FFPE-Gewebeschnitte im Vergleich zu einem einzelnen FFPE-Gewebeschnitt	
		HPRT1	ACTB
RNA	Brust	1,6	1,4
	Leber	1,7	1,5
	Gebärmutter	1,8	1,6
DNA/RNA Sequential	Brust	1,8	1,6
	Leber	1,7	1,5
	Gebärmutter	2,1	2,0
TNA	Brust	1,4	1,6
	Leber	2,6	2,2
	Gebärmutter	1,9	1,7

10.C. Quantifizierung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Tabelle 6. Fluoreszenzfarbstoff-basierte DNA- und RNA-Quantifizierung mit den Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential- and RNA-Workflows. DNA und RNA wurden aus sechs individuellen Replikaten einzelner typisch großer Schnitte aus FFPE-Gewebe von Brust, Leber und Gebärmutter extrahiert. Die DNA wurde mit der Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential-Methode extrahiert; die RNA wurde entweder mit dem Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA- oder dem DNA/RNA Sequential-Workflow extrahiert. Die extrahierte DNA-Menge wurde mit einem doppelsträngigen DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff und die Menge der extrahierten RNA mit einem RNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff bestimmt. Die durchschnittlichen DNA- und RNA-Ausbeuten für jeden Satz von Replikaten wurden anhand der wiedergewonnenen Elutionsvolumina berechnet und sind unten aufgeführt. Die durchschnittliche Ausbeute an DNA und RNA, die aus allen FFPE-Gewebeproben extrahiert und mit einer auf Fluoreszenzfarbstoff basierenden Methode quantifiziert wurde, betrug mindestens 100 ng.

Analyt	Maxwell® CSC XtractAll FFPE-Workflow	FFPE-Gewebetyp	Ausbeute (µg)
DNA	DNA/RNA Sequential	Brust	279
		Leber	367
		Gebärmutter	154
RNA	RNA	Brust	445
		Leber	2.199
		Gebärmutter	1.153
	DNA/RNA Sequential	Brust	616
		Leber	1.330
		Gebärmutter	736

10.D. Reproduzierbarkeit

Tabelle 7. Reproduzierbarkeit der Nukleinsäureextraktion mit den Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, DNA/RNA Sequential- und TNA-Workflows. Um die Reproduzierbarkeit der Nukleinsäureextraktion zu bewerten, führte ein einzelner Anwender drei individuelle Extraktionsläufe für jeden der Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, DNA/RNA Sequential- und TNA-Workflows unter Verwendung gepoolter, vorverarbeiteter FFPE-Gewebeproben durch. Die Eluate wurden entweder in einem qPCR-Assay zur Bestimmung der DNA-Menge für das Target RNase P H1 (102 bp) oder in einem RT-qPCR-Assay zur Bestimmung der RNA-Menge für das Target HPRT1-RNA (100 bp) verwendet. Der prozentuale Variationskoeffizient zwischen den Läufen und innerhalb der Läufe wurde für DNA- und RNA-Extraktionen für verschiedene Maxwell® CSC XtractAll FFPE-Workflows unter Verwendung der wiedergewonnenen Elutionsvolumina berechnet und ist unten dargestellt. Alle resultierenden prozentualen Variationskoeffizienten waren kleiner als 15 %.

Analyt	Maxwell® CSC XtractAll FFPE-Workflow	Laufnummer	Prozentualer Variationskoeffizient innerhalb von Läufen.	Prozentualer Variationskoeffizient zwischen Läufen.
DNA	DNA/RNA Sequential	1	13 %	10 %
		2	8 %	
		3	7 %	
	TNA	1	12 %	11 %
		2	9 %	
		3	8 %	
RNA	RNA	1	14 %	12 %
		2	9 %	
		3	13 %	
	DNA/RNA Sequential	1	5 %	6 %
		2	6 %	
		3	8 %	
	TNA	1	14 %	11 %
		2	5 %	
		3	12 %	

10.E. Amplifikationshemmung durch Störsubstanzen

Tabelle 8. Bewertung der Amplifikationshemmung von DNA, die mit den Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential- und TNA-Workflows extrahiert wurde. DNA oder Gesamtnukleinsäure wurde aus vier einzelnen Replikaten eines oder zweier typisch großer Schnitte aus FFPE-Gewebe von Brust, Leber und Gebärmutter extrahiert. Für die DNA-Extraktion wurde der Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential-Workflow verwendet; für die Gesamtnukleinsäure-Extraktion wurde der Maxwell® CSC XtractAll FFPE TNA-Workflow verwendet. Jeweils zwei Mikroliter einer unverdünnten und einer vierfachen Verdünnung der gleichen DNA- oder Gesamtnukleinsäure-Eluate wurden in einem qPCR-Assay verwendet, der auf RNase P H1 (102 bp) abzielte, um die Auswirkungen etwaiger Störsubstanzen zu bewerten. C_q -Werte unverdünnter und vierfach verdünnter Eluate wurden verglichen, um die Bewertung der Hemmung in einzelnen Eluaten zu ermitteln, wobei ein erwartetes ΔC_q von 2 ± 1 Zyklen auf keine Hemmung hinwies. Die ΔC_q -Werte für alle Eluate für einzelne Proben lagen zwischen 1,9 und 2,5, was auf eine nicht nachweisbare Hemmung der DNA-Amplifikation unter Verwendung der mit dem Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit extrahierten DNA oder Gesamtnukleinsäure hinwies.

FFPE-Gewebetyp	Probennummer	Anzahl der Schnitte	TNA-Workflow	DNA/RNA Sequential-Workflow
Brust	1	1	2,1	2,0
	2		2,0	2,1
	3		2,1	2,1
	4		2,1	2,2
	1	2	2,1	2,3
	2		2,2	2,2
	3		2,2	2,4
	4		2,1	2,3
Leber	1	1	2,0	2,1
	2		2,0	2,0
	3		2,0	2,2
	4		2,2	2,3
	1	2	1,9	2,1
	2		2,1	2,0
	3		2,1	2,3
	4		2,2	2,2

10.E. Amplifikationshemmung durch Störsubstanzen (Fortsetzung)

FFPE-Gewebetyp	Probennummer	Anzahl der Schnitte	TNA-Workflow	DNA/RNA Sequential-Workflow
Gebärmutter	1	1	2,3	2,5
	2		2,3	2,2
	3		2,2	2,3
	4		2,2	2,4
	1	2	2,1	2,2
	2		2,0	2,1
	3		2,0	2,0
	4		2,1	2,2

Tabelle 9. Bewertung der Amplifikationshemmung von RNA, die mit den Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA-, DNA/RNA Sequential- und TNA-Workflows extrahiert wurde. RNA oder Gesamtnukleinsäure wurde aus vier einzelnen Replikaten einzelner oder zweier typisch großer Schnitte aus FFPE-Gewebe von Brust, Leber und Gebärmutter extrahiert. Die RNA wurde mit den Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA- oder DNA/RNA Sequential-Workflows extrahiert; die Gesamtnukleinsäure wurde mit dem Maxwell® CSC XtractAll FFPE TNA-Workflow extrahiert. Jeweils zwei Mikroliter einer unverdünnten und einer vierfachen Verdünnung der gleichen RNA- oder Gesamtnukleinsäure-Eluate wurden in einem qPCR-Assay verwendet, der auf RNase HPRT1 (100 bp) abzielte, um die Auswirkungen etwaiger Störsubstanzen zu bewerten. C_q -Werte unverdünnter und vierfach verdünnter Eluate wurden verglichen, um die Bewertung der Hemmung in einzelnen Eluates zu ermitteln, wobei ein erwartetes ΔC_q von 2 ± 1 Zyklen auf keine Hemmung hinwies. Die ΔC_q -Werte für alle Eluate für einzelne Proben lagen zwischen 1,2 und 2,7, was auf eine nicht nachweisbare Hemmung der RNA-Amplifikation unter Verwendung der mit der Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit extrahierten RNA oder Gesamtnukleinsäure hinwies.

FFPE-Gewebetyp	Probennummer	Anzahl der Schnitte	RNA-Workflow	TNA-Workflow	DNA/RNA Sequential-Workflow
Brust	1	1	2,7	1,7	2,4
	2		1,6	1,5	1,4
	3		2,0	1,4	1,5
	4		1,5	1,7	1,7
	1	2	1,4	1,5	1,6
	2		1,7	1,4	1,5
	3		1,8	2,3	2,1
	4		2,4	1,7	1,6

FFPE-Gewebetyp	Probennummer	Anzahl der Schnitte	RNA-Workflow	TNA-Workflow	DNA/RNA
					Sequential-Workflow
Leber	1	1	1,7	1,3	1,5
	2		1,6	2,2	1,6
	3		1,9	1,5	1,6
	4		1,9	1,5	2,1
	1	2	1,8	1,8	1,4
	2		1,3	1,5	1,9
	3		1,7	1,8	2,0
	4		1,9	2,1	1,2
Gebärmutter	1	1	1,8	1,7	2,1
	2		1,7	2,3	1,4
	3		2,0	2,0	1,9
	4		1,8	2,1	1,6
	1	2	2,0	2,2	1,8
	2		1,7	1,4	1,2
	3		1,9	1,5	1,6
	4		1,7	1,8	2,1

10.F. Kreuzkontamination

Zur Bewertung der Kreuzkontamination wurde das Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit mit den Maxwell® CSC Instruments verwendet, indem in einem einzigen Extraktionslauf abwechselnd Maxwell® CSC Cartridges mit humanen FFPE-Gewebeproben und FFPE-Gewebeproben der Maus auf der Maxwell® CSC/RSC Kartuschenhalterung eingesetzt wurden. Die Workflows Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, DNA/RNA Sequential und TNA wurden getestet. Das Vorhandensein von humaner DNA oder RNA in den Mausproben, die mittels qPCR bzw. RT-qPCR untersucht wurden, diente zur Identifizierung einer möglichen Kreuzkontamination durch benachbarte Maxwell® CSC Cartridges. Alle FFPE-Gewebeproben der Maus, die in Kartuschenhalterungspositionen neben humanen FFPE-Gewebeproben verarbeitet wurden, wiesen C_q -Werte auf, die höher waren als die C_q -Werte, die für die niedrigste DNA- oder RNA-Konzentration der jeweiligen Standardkurve ermittelt wurden.

11. Evaluierung der klinischen Leistung

Die klinische Leistung des Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit wurde von einem externen klinischen Labor in dem Maxwell® CSC 48 Instrument evaluiert. DNA, RNA und Gesamtnukleinsäure (TNA) wurden aus humanen FFPE-Gewebeproben mit den verschiedenen Maxwell® CSC XtractAll FFPE-Extraktionsmethoden extrahiert und die Nukleinsäuren in einem klinisch relevanten Assay amplifiziert.

11.A. DNA-Extraktionsworkflow

Die DNA wurde aus humanen FFPE-Gewebeproben von zwölf individuellen Spendern von einem einzigen Tester extrahiert, wobei sowohl die Maxwell® CSC XtractAll FFPE-DNA-Methode als auch die Standard-DNA-Aufreinigungsmethode des externen klinischen Labors als Referenz verwendet wurden. Die resultierenden DNA-Eluate wurden mittels eines qPCR-Tests unter Verwendung des cobas® EGFR Mutation Test analysiert. Die auf Amplifikation basierenden Testergebnisse stimmten zwischen allen zwölf DNA-Proben, die mit dem Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit extrahiert wurden, und der Referenz-DNA-Extraktionsmethode des Labors überein.

11.B. RNA-Extraktionsworkflow

Die RNA wurde aus humanen FFPE-Gewebeproben von zwölf individuellen Spendern von einem einzigen Tester extrahiert, wobei sowohl die Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA-Methode als auch die Standard-RNA-Aufreinigungsmethode des externen klinischen Labors als Referenz verwendet wurden. Die resultierenden RNA-Eluate wurden mit einem RT-qPCR-Assay mit Hypoxanthinphosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)-Primern analysiert. Die Ergebnisse des Amplifikationstests stimmten bei allen zwölf RNA-Proben, die mit dem Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit extrahiert wurden, mit der Referenz-RNA-Extraktionsmethode des Labors überein.

11.C. Gesamtnukleinsäure-Extraktionsworkflow

Die Gesamtnukleinsäure (TNA) wurde mithilfe der Maxwell® CSC XtractAll FFPE TNA-Methode von einem einzigen Tester aus humanen FFPE-Gewebeproben von zwölf individuellen Spendern extrahiert. Schnitte aus denselben zwölf FFPE-Gewebeproben wurden zur separaten Extraktion von DNA und RNA unter Anwendung der Referenzmethoden des externen klinischen Labors für die DNA- bzw. RNA-Extraktion von dem gleichen Tester verwendet.

Die resultierenden TNA-Eluate aus dem Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit und die DNA-Eluate aus der Laborreferenz-DNA-Extraktionsmethode wurden mit einem qPCR-Assay unter Verwendung des cobas® EGFR Mutation Test analysiert. Zusätzlich wurden die TNA-Eluate aus dem Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit und die RNA-Eluate aus der Laborreferenz-RNA-Extraktionsmethode mit einem RT-qPCR-Assay mit HPRT1-Primern analysiert. Die Amplifikationsergebnisse der EGFR Mutation und HPRT1-Tests zeigten eine Übereinstimmung zwischen allen TNA-Proben, die mit dem Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit extrahiert wurden, und der DNA oder RNA, die mit den jeweiligen Laborreferenzmethoden extrahiert wurden.

11.D. DNA/RNA Sequential-Extraktionsworkflow

DNA und RNA wurden aus humanen FFPE-Gewebeproben von zwölf individuellen Spendern von zwei Testern in zwei separate Eluate extrahiert, wobei die Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential-Methode verwendet wurde. Schnitte aus denselben zwölf FFPE-Gewebeproben wurden zur separaten Extraktion von DNA und RNA unter Anwendung der Referenzmethoden des externen klinischen Labors für die DNA- bzw. RNA-Extraktion verwendet.

Die resultierenden DNA-Eluate aus dem Maxwell® CSC System und der Referenz-DNA-Extraktionsmethode des Labors wurden mit einem qPCR-Assay unter Verwendung des cobas® EGFR Mutation Test analysiert. Die Amplifikationsergebnisse zeigten Konkordanz zwischen allen DNA-Proben, die mit dem Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit unter Verwendung des DNA/RNA Sequential-Workflows extrahiert wurden, und der Referenz-DNA-Extraktionsmethode des Labors, sowie zwischen den beiden Testern.

In ähnlicher Weise wurden die resultierenden RNA-Eluate aus dem Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit und der Laborreferenz-RNA-Extraktionsmethode in einem RT-qPCR-Assay mit HPRT1-Primern analysiert. Die Amplifikationsergebnisse zeigten Konkordanz zwischen allen RNA-Proben, die mit dem Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit unter Verwendung des DNA/RNA Sequential-Workflows extrahiert wurden, und der Referenz-RNA-Extraktionsmethode des Labors, sowie zwischen den beiden Testern.

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
Konzentration der Nukleinsäure im Eluat geringer als erwartet (ein typischer FFPE-Gewebeschnitt sollte einen amplifizierbaren Nukleinsäure-Ertrag ergeben, der von der Größe, der Zellularität und den Formalinfixierungsbedingungen und der Handhabung abhängig ist).	Die Leistung des Kits wurde durch Isolierung von Nukleinsäuren von bis zu vier FFPE-Gewebeschnitten mit einer Maximaldicke von 20 µm bewertet. Verwenden Sie nur Schnitte, die den Größenvorgaben entsprechen. Das Kit wurde für den Einsatz mit FFPE-Gewebeproben entwickelt. Es wurde nicht für den Einsatz mit anderen Proben als FFPE-Gewebeproben wie frischen oder gefrorenen Gewebeproben entwickelt. Die Inkubationszeiten und -temperaturen wurden auf optimale Ausbeute getestet, um eine optimale Nukleinsäure-Ausbeute sicherzustellen. Das Kit ist nicht für den Einsatz mit Gewebeproben bestimmt, die mit anderen Fixiermitteln als 10%igem neutral gepuffertem Formalin zubereitet wurden. Befragen Sie das pathologische Labor oder den Lieferanten um sicherzustellen, dass kein anderes Fixiermittel verwendet wurde. Das Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit wurde nicht mit verunreinigten FFPE-Gewebe-Objekträgern oder -Schnitten getestet. Wiederholen Sie die Extraktion mit einem nicht verunreinigten Objekträger bzw. mit einem nicht verunreinigten Schnitt. Die Leistung des Kits wurde anhand der Amplifikation und der auf Fluoreszenzfarbstoff basierenden Quantifizierung der extrahierten Nukleinsäuren bewertet. Andere Quantifizierungsmethoden, einschließlich der Absorption, korrelieren möglicherweise nicht mit Amplifikations- und Fluoreszenz-basierten Konzentrationen. Möglicherweise wurden während der Probenverarbeitung oder -quantifizierung RNasen oder DNasen eingebracht. Informationen zur Schaffung einer ribonukleasefreien Umgebung finden Sie in Abschnitt 13. Das DNase-I-Gemisch wurde in die Kartusche für den falschen Workflow gegeben. Das DNase-I-Gemisch sollte nur in Kammer 7 der Kartusche für den RNA- und den RNA-Sequential-Workflow gegeben werden. Isopropanol wurde nicht in die Kartusche für den entsprechenden Workflow (RNA, TNA oder RNA Sequential) oder in die falsche Kammer der Kartusche gegeben. In dem Instrument wurde die falsche Maxwell®-Extraktionsmethode verwendet. Stellen Sie sicher, dass die verwendete Maxwell®-Extraktionsmethode mit der Kartuscheneinrichtung für den verwendeten Workflow übereinstimmt. Es wurde kein Nuclease-Free Water oder ein falsches Volumen in die Elution Tubes gegeben. Das Kit wurde mit einem Elutionsvolumen von 50 µl getestet.

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
Qualität geringer als erwartet (das Eluat enthält stark fragmentierte Nukleinsäuren oder Inhibitoren nachfolgender Assays).	Die für die Extraktion verwendeten FFPE-Gewebeschnitte können aufgrund von Formalinfixierungsbedingungen oder der Handhabung fragmentierte Nukleinsäuren enthalten. Wenn die Nukleinsäuren vor der Extraktionsmethode fragmentiert werden, wird die fragmentierte Nukleinsäure mit diesem Kit aufgereinigt. Wiederholen Sie die Extraktion mit einem benachbarten Abschnitt, um festzustellen, ob es ein Problem mit dem FFPE-Gewebeschnitt oder mit dem Extraktionsverfahren gibt. Einige amplifikationsbasierte Assays sind besonders empfindlich gegenüber Inhibitoren. Es sollte mithilfe nachfolgender Assay-Kontrollen festgestellt werden, ob ein Amplifikationsinhibitor im Eluat vorhanden ist. Es liegt in Ihrer Verantwortung zu überprüfen, ob dieses Produkt mit allen nachfolgenden Assays kompatibel ist.
In den RNA-Eluaten liegt DNA vor, was nachfolgende Assays beeinträchtigen kann.	Das DNase-I-Gemisch wurde nicht in die Kartusche für den entsprechenden Workflow (RNA oder RNA Sequential) bzw. in die falsche Kammer der Kartusche gegeben. Das DNase-I-Gemisch sollte nur in Kammer 7 der Kartusche gegeben werden. Das Elution Tube wurde nicht aus der Kartuschenhalterung entfernt und durch ein neues Elution Tube und Elutionspuffer ersetzt, als der DNA/RNA Sequential-Workflow ausgeführt wurde.
In den DNA-Eluaten liegt RNA vor, was nachfolgende Assays beeinträchtigen kann.	Die DNA-Eluate können mit RNase behandelt werden, um in DNA-Proben möglicherweise vorhandene RNA zu entfernen, falls RNA-freie DNA benötigt wird.
Die DNA-Methode wurde während des DNA/RNA Sequential-Workflows versehentlich oder absichtlich abgebrochen.	RNA-Proben können durch Ausführen der Kartusche mit der Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA-Methode gewonnen werden.
Harzverschleppung in Eluate	Unverdautes FFPE-Gewebe wurde in die Kartusche überführt. Wenn am Ende der einstündigen Inkubation (Abschnitt 5.A) unverdautes FFPE-Gewebe zurückbleibt, zentrifugieren Sie die Probenröhrchen 20 Sekunden lang bei 10.000 × g, um das unverdaute Material zu pelletieren. Geben Sie kein pelletiertes oder unverdautes Material in die Kartusche. Etwas Harzübertragung ist normal und beeinträchtigt nicht die Wirksamkeit nachfolgender Prozesse. Falls erforderlich, benutzen Sie einen Elution Magnet ([Cat.# AS4017, Cat.# AS4018 oder beides]; getrennt lieferbar) für die Übertragung des Eluats in ein neues Gefäß. Siehe Abschnitt 14 „Verwandte Produkte“.

12. Fehlerbehebung (Fortsetzung)

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
Braune Harz-Verschmutzungen an den Wänden der Elution Tubes.	Rückstände von Paraffin oder Probenmaterial, die während der Verarbeitung an der Röhrchenwand haften. Diese Verschmutzungen sind normal, variieren je nach Probenzusammensetzung (z. B. Curl-Zahl, Paraffingehalt) und beeinträchtigen weder die Eluatqualität noch die nachgeschaltete Leistung.
Das wiedergewonnene Elutionsvolumen ist zu klein oder zu groß für die Verwendung in nachfolgenden Assays.	Elutionsvolumina von 30–100 µl wurden mit dem Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit getestet und zeigten gute Ergebnisse.

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. Schaffung einer ribonukleasefreien Umgebung

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

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

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

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

14. Verwandte Produkte

Geräte und Zubehör

Produkt	Größe	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument*	jeweils 1	AS6000
Maxwell® CSC 48 Instrument*	jeweils 1	AS8000
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	jeweils 1	SP6019
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	jeweils 1	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	jeweils 1	AS8402
Microtube, 1,5 ml	1.000/Pck.	V1231
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 Reagent Kits finden Sie unter www.promega.com.

© 2025 Promega Corporation. Alle Rechte vorbehalten.

Maxwell ist eine eingetragene Marke der Promega Corporation.

cobas ist eine eingetragene Marke von Roche Diagnostics Operations, Inc.

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.