

INSTRUKCJA TECHNICZNA

# Zestaw Maxwell<sup>®</sup> CSC RNA Blood Kit

Instrukcja użytkowania produktu  
**AS1410**

**Przestroga:** Z kartridżami należy obchodzić się ostrożnie; krawędzie zamknięcia kartridża mogą być ostre.



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hanower, Niemcy



INSTRUKCJA  
UŻYTKOWANIA PRODUKTU  
**AS1410**



# Zestaw Maxwell<sup>®</sup> CSC RNA Blood Kit

Dokumentacja techniczna jest dostępna na stronie internetowej pod adresem: [www.promega.com/protocols/](http://www.promega.com/protocols/)  
 Na tej stronie internetowej można sprawdzić, czy używana wersja niniejszej instrukcji technicznej jest aktualna.  
 W razie pytań dotyczących obsługi tego systemu prosimy o kontakt z działem Promega Technical Services  
 pod adresem: [techserv@promega.com](mailto:techserv@promega.com)

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Opis .....                                                                                 | 2  |
| 2. Elementy produktu, warunki przechowywania i objaśnienie symboli .....                      | 3  |
| 3. Przeznaczenie/zastosowanie produktu .....                                                  | 6  |
| 4. Ograniczenia stosowania produktu .....                                                     | 6  |
| 5. Przed rozpoczęciem: Przygotowanie roztworów .....                                          | 7  |
| 6. Oczyszczanie RNA ze świeżej pełnej krwi pobranej do próbek EDTA do pobierania próbek ..... | 7  |
| 6.A. Wstępne przetwarzanie próbek pełnej krwi .....                                           | 8  |
| 6.B. Przygotowanie kartridży Maxwell <sup>®</sup> CSC RNA Blood Cartridge .....               | 9  |
| 7. Przebieg pracy aparatu .....                                                               | 11 |
| 8. Czynności po zakończeniu oczyszczania .....                                                | 13 |
| 9. Ocena wydajności analitycznej .....                                                        | 14 |
| 9.A. Ilość i jakość RNA .....                                                                 | 14 |
| 9.B. Amplifikacja RNA .....                                                                   | 15 |
| 9.C. Odtwarzalność .....                                                                      | 15 |
| 9.D. Inhibicja (substancje zakłócające) .....                                                 | 16 |
| 9.E. Zanieczyszczenie krzyżowe .....                                                          | 16 |
| 10. Ocena wydajności klinicznej .....                                                         | 16 |
| 10.A. Ilość, jakość i amplifikacja RNA .....                                                  | 17 |
| 10.B. Odtwarzalność .....                                                                     | 18 |
| 10.C. Zanieczyszczenie krzyżowe .....                                                         | 18 |
| 11. Rozwiązywanie problemów .....                                                             | 19 |
| 12. Tworzenie środowiska wolnego od rybonukleaz .....                                         | 21 |
| 13. Źródła .....                                                                              | 22 |
| 14. Powiązane produkty .....                                                                  | 22 |
| 15. Podsumowanie zmian .....                                                                  | 22 |

Zestaw Maxwell® CSC RNA Blood Kit jest dostępny tylko w niektórych krajach.

## 1. Opis

Zestaw Maxwell® CSC RNA Blood Kit<sup>(a)</sup> jest przeznaczony do stosowania w połączeniu z aparatami Maxwell® Instrument, które przedstawiono w Tabeli 1, w celu zapewnienia łatwej metody wydajnego i zautomatyzowanego oczyszczania RNA pochodzącego ze świeżej (niezamrożonej) pełnej krwi ludzkiej pobranej do probówek EDTA. Aparaty Maxwell® CSC Instrument są dostarczane ze wstępnie zaprogramowanymi metodami oczyszczania i przeznaczone do stosowania ze wstępnie napełnionymi kartridżami z odczynnikami oraz z dodatkowymi odczynnikami dostarczonymi w zestawie, co zwiększa wygodę i upraszcza stosowanie. Aparaty Maxwell® CSC Instrument mogą przetworzyć od jednej do maksymalnej liczby próbek w ciągu około 60 minut, a oczyszczone RNA nadaje się do bezpośredniego wykorzystania w różnych opartych na amplifikacji zastosowaniach na dalszych etapach, takich jak RT-PCR.

**Tabela 1. Kompatybilność z aparatami.**

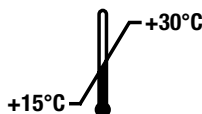
| Aparat          | Cat. # | Instrukcja techniczna |
|-----------------|--------|-----------------------|
| Maxwell® CSC    | AS6000 | TM457                 |
| Maxwell® CSC 48 | AS8000 | TM623                 |

**Podstawy metody:** Zestaw Maxwell® CSC RNA Blood Kit umożliwia oczyszczanie RNA przy wykorzystaniu cząsteczek paramagnetycznych, które zapewniają ruchomą fazę stałą stwarzającą optymalne warunki do wychwytywania próbki, przemycania i oczyszczania RNA. Aparaty Maxwell® CSC Instrument są aparatami przeprowadzającymi analizy w oparciu o cząsteczki magnetyczne. System ten umożliwia skuteczne wiązanie RNA z cząsteczką paramagnetyczną w pierwszym dolku wstępnie napełnionego kartridża i przenosi próbkę przez dolki kartridża, mieszając ją podczas przetwarzania. Zastosowanie magnetycznego wychwytywania pozwala na uniknięcie często występujących problemów związanych z systemami do wykorzystujących materiały płynne, takich jak zatkane końcówki lub częściowe przeniesienie odczynnika, które obniżają jakość procesów oczyszczania w innych powszechnie stosowanych systemach.

## 2. Elementy produktu, warunki przechowywania i objaśnienie symboli

| PRODUKT                           | ILOŚĆ         | CAT.#  |
|-----------------------------------|---------------|--------|
| Zestaw Maxwell® CSC RNA Blood Kit | 48 preparatów | AS1410 |

Do stosowania w diagnostyce in vitro. Wyłącznie do użytku przez specjalistów. Zawiera ilość wystarczającą do przeprowadzenia 48 zautomatyzowanych izolacji z próbek pełnej krwi. Kartridże Maxwell® CSC Cartridge są przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku.



Zawartość zestawu:

- 48 kartridży Maxwell® CSC RNA Blood Cartridge
- 4 × 100 ml roztworu A
- 30 ml roztworu B
- 20 ml buforu lizującego
- 2 fiołki DNazy I (liofilizowanej)
- 900 µl 1-tioglicerolu
- 100 µl niebieskiego barwnika
- 2 × 1 ml roztworu proteinazy K (PK)
- 25 ml Nuclease-Free Water
- 50 tłoczków CSC/RSC
- 50 probówek do elucji (0,5 ml)

**Warunki przechowywania:** Po otrzymaniu wyjąć 1-tioglicerol i przechowywać w temperaturze od +2°C do +10°C. Pozostałe elementy zestawu przechowywać w temperaturze pokojowej (od +15°C do +30°C). 1-tioglicerol można przechowywać w temperaturze pokojowej (od +15°C do +30°C), w której zachowuje stabilność do 9 miesięcy. Przechowywać ponownie uwodnioną DNazę I w temperaturze od –30°C do –10°C. Nie przekraczać 10 cykli zamrażania i rozmrażania.

## 2. Elementy produktu, warunki przechowywania, objaśnienie symboli (ciąg dalszy)



**Informacje dotyczące bezpieczeństwa:** Kartridże zawierają etanol, który jest substancją łatwopalną. 1-tioglicerol jest substancją toksyczną. Tiocyjanian guanidyny i chlorowoderek guanidyny (składniki roztworu B i buforu lizującego) są szkodliwymi substancjami drażniącymi. Podczas pracy z tymi substancjami nosić rękawiczki i przestrzegać standardowych procedur bezpieczeństwa.



Elementy zestawu Maxwell® CSC RNA Blood Kit zaprojektowano do użytkowania z czynnikami potencjalnie zakaźnymi. Użytkownicy powinni stosować odpowiednie środki ochrony osobistej (np. rękawiczki, fartuch laboratoryjny i okulary ochronne) podczas pracy z czynnikami zakaźnymi. Użytkownicy powinni przestrzegać obowiązujących w placówce wytycznych dotyczących postępowania z czynnikami zakaźnymi używanymi z tym systemem oraz utylizacji takich czynników.



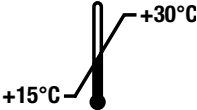
**Uwaga:** Wybielacz reaguje z chlorkiem amonu i tiocyjanianem guanidyny, w wyniku czego powstają toksyczne opary. Chlorek amonu i tiocyjanian guanidyny znajdują się odpowiednio w roztworze A i roztworze B. Nie odkładać odpadów z niniejszego zestawu za pomocą wybielacza.



**Przeestroga:** Należy ostrożnie obchodzić się z kartridżami i otwierać fiolkę liofilizowanej DNazy I; krawędzie mogą być ostre.

**Informacje dodatkowe:** Elementy zestawu Maxwell® CSC RNA Blood Kit zostały dopuszczone do łącznego stosowania na podstawie odpowiednich procedur kwalifikacyjnych i testów kontroli jakości. Nie zaleca się mieszania elementów zestawu z elementami zestawów różnych serii. Należy używać wyłącznie elementów dostarczonych w zestawie. Nie używać kartridży, jeśli zamknięcie na kartridżu było naruszone w momencie dostawy. Dodatkowe informacje dotyczące bezpieczeństwa znajdują się w karcie charakterystyki dostępnej na stronie: **[www.promega.com](http://www.promega.com)**

## Objaśnienie symboli

| Symbol                                                                              | Objaśnienie                                    | Symbol                                                                              | Objaśnienie                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|    | Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro         |    | Autoryzowany przedstawiciel                              |
|    | Przechowywać w temperaturze od +15°C do +30°C. |    | Wytwórca                                                 |
|    | Przeostroga                                    |    | Środek drażniący                                         |
|    | Zagrożenie dla zdrowia.                        |    | Substancja trująca                                       |
|    | Środek żrący                                   |    | Zawiera ilość wystarczającą do przeprowadzenia „n” badań |
|   | Conformité Européenne                          |   | Ostrzeżenie. Zagrożenie biologiczne.                     |
|  | Ostrzeżenie. Niebezpieczeństwo zmiążdżenia.    |  | Numer katalogowy                                         |
|  | Numer serii                                    |  | Nie używać ponownie                                      |

### **3. Przeznaczenie/zastosowanie produktu**

Zestaw Maxwell® CSC RNA Blood Kit jest przeznaczony do stosowania w połączeniu z aparatami Maxwell® CSC Instrument oraz metodą oczyszczania RNA z krwi Maxwell® CSC jako wyrób medyczny do diagnostyki in vitro (IVD) w celu automatycznego wyizolowania RNA z próbek ludzkiej krwi pełnej w ilości 2,5 ml pobranych do probówek EDTA do pobierania próbek o liczbie białych krwinek (WBC) w zakresie od  $4 \times 10^6$  do  $10 \times 10^6$  WBC na mililitr. Oczyszczone RNA nadaje się do stosowania w oznaczeniach wykonywanych na potrzeby diagnostyki in vitro opartych na amplifikacji.

Zestaw Maxwell® CSC RNA Blood Kit jest przeznaczony do stosowania z pełną krwią ludzką w ilości 2,5 ml.

Zestaw Maxwell® CSC RNA Blood Kit jest przeznaczony do stosowania w temperaturze 15°C i 30°C. Stosowanie zestawu poza tym zakresem temperatur może prowadzić do uzyskania nieprawidłowych wyników.

Zestaw Maxwell® CSC RNA Blood Kit jest przeznaczony wyłącznie do użytku przez specjalistów. Wyniki diagnostyczne uzyskane przy wykorzystaniu RNA oczyszczonego za pomocą tego systemu należy interpretować w połączeniu z innymi danymi klinicznymi lub laboratoryjnymi.

### **4. Ograniczenia stosowania produktu**

Zestaw Maxwell® CSC RNA Blood Kit jest przeznaczony do stosowania wyłącznie z próbkami pełnej krwi ludzkiej pobranymi do probówek EDTA. Nie jest on przeznaczony do stosowania z próbkami innymi niż próbki krwi pełnej, takimi jak szpik kostny lub kożuszek krwi, ani próbkami przechowywanymi w innych probówkach.

Zestaw Maxwell® CSC RNA Blood Kit nie jest przeznaczony do stosowania z próbkami innymi niż ludzkie ani do oczyszczania DNA.

Działanie Maxwell® CSC RNA Blood Kit oceniono pod kątem wyizolowania RNA z próbki ludzkiej pełnej krwi o objętości 2,5 ml zebranej do probówki EDTA.

Użytkownik odpowiada za ustalenie charakterystyki roboczej wymaganej w dalszych zastosowaniach diagnostycznych. W przypadku dalszych zastosowań diagnostycznych należy zastosować odpowiednie środki kontrolne w zakresie używania RNA oczyszczonego za pomocą zestawu Maxwell® CSC RNA Blood Kit.

## **5. Przed rozpoczęciem: Przygotowanie roztworów**

### **1-tioglicerol/roztwór B**

Przygotować mieszaninę 1-tioglicerolu/roztworu B za pomocą jednej z poniższych metod:

Do butelki roztworu B dodać 600 µl 1-tioglicerolu i dokładnie wymieszać. 1-tioglicerol jest substancją lepką i należy zachować ostrożność podczas pipetowania, aby uzyskać dokładny pomiar. Przed użyciem mieszaninę 1-tioglicerolu/roztworu B schłodzić na lodzie lub w temperaturze 2–10°C.

Ewentualnie można przygotować mniejsze objętości, dodając 20 µl 1-tioglicerol na mililitr roztworu B. Przygotować po 200 µl schłodzonej mieszaniny 1-tioglicerolu/roztworu B na próbkę.

**Uwaga:** Przygotowaną mieszaninę 1-tioglicerolu/roztworu B przechowywać w temperaturze 2–10°C, w której pozostaje stabilna do 30 dni.

### **DNaza I**

Do fiolki z liofilizowaną DNazą I dodać 275 µl Nuclease-Free Water. Odwrócić celu wypłukania DNazy I ze spodu zatyczki i obracać delikatnie ruchem wirowym, aby ją wymieszać; nie mieszać na mieszadle typu vortex. Dodać 25 µl niebieskiego barwnika do przygotowanej DNazy I w celu zapewnienia lepszej widoczności podczas pipetowania i przygotowania kartridży. Każde oczyszczenie wymaga 10 µl przygotowanego roztworu DNazy I. Przechowywać przygotowaną DNazę I w temperaturze od –30°C do –10°C. Nie przekraczać dziesięciu cykli zamrażania i rozmrażania przygotowanej DNazy I.



**Przestroga:** Fiolkę DNazy I otwierać z zachowaniem ostrożności; krawędzie fiolki mogą być ostre.

## **6. Oczyszczanie RNA ze świeżej pełnej krwi pobranej do próbek EDTA do pobierania próbek**

Podczas procedury należy utrzymać środowisko wolne od RNaz. Zawsze stosować końcówki pipet wolne od RNaz i odporne na aerozole. Należy często zmieniać rękawiczki w celu zmniejszenia szansy na zanieczyszczenie RNazami. Więcej szczegółów w rozdziale 12 — Tworzenie środowiska wolnego od rybonukleaz.

### **Materiały zapewniające przez użytkownika**

- pełna krew w próbkach z EDTA (niezamrożonych); przed oczyszczaniem krew można przechowywać do 3 dni w temperaturze 2–10°C
- mikrowirówka
- pipety serologiczne 10 ml (sterylne)
- pipetory oraz końcówki pipet wolne od RNaz i odporne na aerozole
- próbki o pojemności 15 ml (sterylne)
- wirówka wyposażona w rotor z bębnem obrotowym



## **6.A. Wstępne przetwarzanie próbek pełnej krwi**

1. Przenieść 2,5 ml dobrze wymieszanej pełnej krwi (niezamrożonej) z probówki EDTA do pobierania próbek do sterylnej probówki o pojemności 15 ml.
2. Dodać 7,5 ml roztworu A i odwrócić probówkę 5–10 razy celem wymieszania. Jest to etap lizy różnicowej. Czerwone krwinki ulegają lizie, a białe krwinki pozostają niezmienione.
3. Lizat inkubować przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Podczas inkubacji odwrócić próbkę dwa razy celem wymieszania, tak jak w kroku 2.
4. Wirować probówkę/probówki przy  $3000 \times g$  przez 10 minut w rotorze z bębnem obrotowym.
5. Usunąć supernatant przez dekantację lub pipetowanie. Wirować probówkę krótko, aby zebrać pozostały płyn na dnie probówki. Za pomocą pipety usunąć możliwie jak najwięcej pozostałego supernatantu tak, aby nie naruszyć widocznego pelletu białych krwinek.
6. Dodać 200 µl schłodzonej mieszaniny 1-tioglicerolu/roztworu B do pelletu i mieszać na mieszadle typu vortex, aby ponownie zawiesić osad.
7. Dodać 200 µl buforu lizującego oraz 25 µl proteinazy K do odtworzonej zawiesiny pelletu. Mieszać na mieszadle typu vortex przez 15–20 sekund.  
**Uwaga:** Istnieje możliwość wstrzymania procedury podczas wstępnego przetwarzania; po kroku 7 próbki można przechowywać w temperaturze od  $-30^{\circ}\text{C}$  do  $-10^{\circ}\text{C}$  do 5 dni. W takich temperaturach przechowywania próbki mogą całkowicie zamarznąć. W przypadku gotowości do wznowienia procedury oczyszczania próbki — przed rozpoczęciem kolejnego kroku należy rozmrażać probówki w temperaturze pokojowej przez 10 minut.
8. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 10 minut. W tym czasie przygotować kartridże zgodnie z opisem w rozdziale 6.B.
9. Dodać lizat do dolka nr 1 kartridża Maxwell® CSC RNA Blood Cartridge (największy dołek w kartridżu).

## 6.B. Przygotowanie kartridży Maxwell® CSC RNA Blood Cartridge

1. Przed rozpoczęciem pracy z kartridżami Maxwell® CSC RNA Blood Cartridge, tłoczkami CSC/RSC i probówkami do elucji należy zmienić rękawiczki. Kartridże są ustawiane na tacach blatowych na zewnątrz aparatu, po czym tace blatowe, zawierające kartridże i próbki są następnie przenoszone do aparatu w celu rozpoczęcia oczyszczania. Umieścić każdy kartridż na tacy blatowej tak, aby dołek nr 1 (największy dołek w kartridżu) znajdował się jak najdalej od probówek do elucji (Rysunek 2). Nacisnąć kartridż, aby zatrzasknął się w odpowiednim położeniu. Upewnić się, że oba końce kartridża znajdują się w całości na stojaku na kartridże. Ostrożnie zdjąć zamknięcie tak, aby usunąć całe zamknięcie z górnej części kartridża. Upewnić się, że cała taśma uszczelniająca i pozostałości kleju zostały usunięte z kartridża.



**Przestroga:** Z kartridżami należy obchodzić się ostrożnie; krawędzie zamknięcia kartridża mogą być ostre.

2. Umieścić tłoczek CSC/RSC w dolku nr 8 każdego kartridża.
3. Umieścić pustą probówkę do elucji w położeniu probówki do elucji dla każdego kartridża na tacach blatowych.  
**Uwaga:** Używać wyłącznie probówek do elucji dołączonych do zestawu Maxwell® CSC RNA Blood Kit. Inne probówki do elucji mogą nie być zgodne z aparatami Maxwell® CSC Instrument, co może wpłynąć na wynik oczyszczania RNA.
4. Na dnie każdej probówki do elucji umieścić 50 µl Nuclease-Free Water. Probówki do elucji muszą być otwarte podczas oczyszczania RNA.

**Uwaga:** Używać wyłącznie Nuclease-Free Water dołączonej do zestawu Maxwell® CSC RNA Blood Kit. Stosowanie innych buforów do elucji może wpłynąć na wydajność procesu oczyszczania RNA i dalsze zastosowanie.

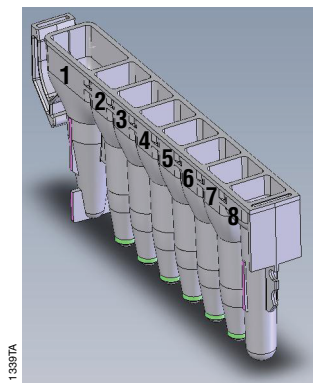
## 6.B. Przygotowanie kartridży Maxwell® CSC RNA Blood Cartridge (ciąg dalszy)

5. Dodać 10 µl przygotowanej DNazy I (niebieskiej) do dołka nr 4 (żółtego) każdego kartridża. Uzyskany kolor zielony to wizualny wskaźnik, iż do dołka nr 4 dodano roztwór DNazy I.

### Uwagi dotyczące przygotowania kartridży Maxwell® CSC RNA Blood Cartridge



Wycieki próbki lub odczynnika na dowolną część tacy blatowej należy usuwać za pomocą roztworu detergentu i wody. Następnie należy spryskać powierzchnię sprayem bakteriobójczym lub wytrzeć ściereczką i przemyć ją wodą. Nie należy stosować wybielacza do czyszczenia części aparatu.



### Zawartość dołka dodawana przez użytkownika:

1. Wstępnie przetworzony lizat próbki
4. 10 µl przygotowanej DNazy I
8. Tłoczek CSC/RSC

**Rysunek 1. Kartridż Maxwell® CSC Cartridge.** Do dołka nr 1 dodaje się wstępnie przetworzony lizat próbki krwi, do dołka nr 4 dodaje się 10 µl DNazy I, natomiast do dołka nr 8 dodaje się tłoczek CSC/RSC.



**Rysunek 2. Ustawianie i konfiguracja tacy blatowej.** Do probówek do elucji dodaje się Nuclease-Free Water (50 µl), jak przedstawiono na rysunku.

## 7. Przebieg pracy aparatu

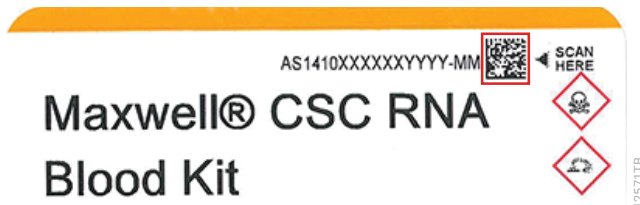
Metodę oczyszczania RNA z krwi Maxwell® CSC do aparatu Maxwell® CSC Instrument można pobrać ze strony internetowej firmy Promega: [www.promega.com/resources/tools/maxwellcscmethod](http://www.promega.com/resources/tools/maxwellcscmethod). Metodę oczyszczania RNA z krwi Maxwell® CSC do aparatu Maxwell® CSC 48 Instrument można pobrać ze strony internetowej firmy Promega:

[www.promega.com/resources/software-firmware/maxwell-maxprep/maxwell-csc-48-methods/](http://www.promega.com/resources/software-firmware/maxwell-maxprep/maxwell-csc-48-methods/)

W przypadku podejrzenia, że aparat został zanieczyszczony RNazą, wyczyścić go przed uruchomieniem za pomocą roztworu detergentu, np. Steris LpH®. Należy przestrzegać wytycznych w punkcie dotyczącym czyszczenia i konserwacji w odpowiedniej instrukcji obsługi aparatu Maxwell® CSC Instrument.

1. Włączyć aparat Maxwell® Instrument i tablet. Zalogować się na tablecie i uruchomić oprogramowanie Maxwell® IVD Mode, dwukrotnie dotykając ikony na pulpicie. Aparat przeprowadzi autotest i ustawi w położeniu wyjściowym wszystkie ruchome części.
2. Dotknąć opcji **Start** na ekranie głównym.
3. Zeskanować lub wprowadzić kod kreskowy znajdujący się w prawym górnym rogu etykiety zestawu Maxwell® CSC RNA Blood Kit i dotknąć przycisku **OK**, aby automatycznie wybrać metodę, która zostanie zastosowana (Rysunek 3).

**Uwaga:** Kod kreskowy metody zestawu Maxwell® CSC RNA Blood Kit jest wymagany do przeprowadzenia oczyszczania RNA przy użyciu aparatu Maxwell® CSC Instrument. Etykieta zestawu zawiera dwa kody kreskowe. Kod kreskowy metody przedstawiono na Rysunku 3. Jeżeli nie można zeskanować kodu kreskowego, należy skontaktować się z działem Promega Technical Services.



**Rysunek 3. Etykieta zestawu z kodem kreskowym do zeskanowania.** Zeskanować kod kreskowy znajdujący się w czerwonym polu w prawym górnym rogu etykiety zestawu, aby rozpocząć cykl oczyszczania.

4. Na ekranie „Konfiguracja kartridży” dotknąć pozycji kartridża, aby zaznaczyć lub odznaczyć wszelkie położenia, które mają zostać użyte w ramach przebiegu ekstrakcji. Wprowadzić wymagane dane identyfikacyjne próbek i nacisnąć przycisk **Rozpocznij**, aby kontynuować.

**Uwaga:** Podczas użytkowania aparatu Maxwell® CSC 48 Instrument nacisnąć przycisk **Przód** lub **Tył**, aby wybrać lub cofnąć wybór pozycji kartridża na każdym stojaku na kartridże.

## 7. Przebieg pracy aparatu (ciąg dalszy)

5. Po otwarciu drzwi potwierdzić, czy wykonano wszystkie czynności z listy kontrolnej ekstrakcji. Sprawdzić, czy wstępnie przetworzone próbki zostały dodane do dolka nr 1 kartridży, czy kartridże zostały załadowane do aparatu, czy otwarte próbówki do elucji zawierające bufor do elucji są obecne oraz czy tłoczki zostały umieszczone w dolku nr 8. Przenieść tacę blatową zawierającą przygotowane kartridże do platformy aparatu Maxwell®.

**Wkładanie tacy blatowej Maxwell®:** Stojak na kartridże należy trzymać za brzegi, aby uniknąć wypadnięcia kartridży. Upewnić się, że taca blatowa została umieszczona w aparacie Maxwell® w taki sposób, że próbówki do elucji znajdują się możliwie jak najbliżej drzwi. Przetawić tył stojaka na kartridże w dół i ustawić go na aparacie tak, aby jego tył był oparty o tylną część platformy aparatu. Docisnąć przednią część stojaka na kartridże, aby osadzić go na platformie aparatu. W przypadku trudności z ustawieniem stojaka na kartridże na platformie sprawdzić, czy stojak na kartridże jest ułożony w prawidłowej orientacji. Upewnić się, że stojak na kartridże jest odpowiednio wyrównany i osadzony na platformie aparatu.

**Uwaga:** Sprawdzić identyfikator na stojakach na kartridże Maxwell® z 24 pozycjami, aby określić, czy powinny zostać umieszczone z przodu, czy z tyłu aparatu.

6. Potwierdzić, że wszystkie czynności wskazane przed rozpoczęciem przetwarzania zostały wykonane, i dotknąć przycisku **Start**, aby zamknąć drzwi aparatu i rozpocząć przetwarzanie.

**Uwaga:** W przypadku korzystania z aparatu Maxwell® Instrument z 48 pozycjami i włączenia systemu wizualizacji skanowanie tac blatowych rozpocznie się po zamknięciu drzwi. Wszelkie błędy w konfiguracji stojaków na kartridże (np. tłoczki nieznajdujące się w dolku nr 8, brak otwartych próbek do elucji) spowoduje, że oprogramowanie powróci do ekranu „Konfiguracja kartridża”, a problematyczne pozycje zostaną oznaczone wykrzyknikiem w czerwonym okręgu. Dotknąć wykrzyknika, aby uzyskać opis błędu i rozwiązać problemy związane z błędami. Ponownie dotknąć przycisku **Start**, aby powtórzyć skanowanie stojaków na kartridże i rozpocząć przebieg ekstrakcji.



**Ostrzeżenie:** Niebezpieczeństwo zmiążdżenia.

7. Aparat Maxwell® Instrument natychmiast rozpocznie cykl oczyszczania. Na ekranie będą wyświetlane wykonywane kroki oraz przybliżony czas do zakończenia cyklu.

**Uwagi:**

1. Dotknięcie przycisku **Przerwij** spowoduje przerwanie przebiegu. Wszystkie próbki z przerwanej przebiegu zostaną utracone.
  2. Jeśli przebieg zostanie przerwany przed ukończeniem, może wyświetlić się monit z prośbą o sprawdzenie, czy tłoczki są nadal załadowane na słupku tłoczków. Jeśli tłoczki znajdują się na słupku tłoczków, należy przeprowadzić procedurę **Czyszczenie** po wyświetleniu monitu. Jeśli tłoczki nie znajdują się na słupku tłoczków, można pominąć procedurę **Czyszczenie** po wyświetleniu monitu. Próbki zostaną utracone.
8. Po zakończeniu przebiegu w interfejsie użytkownika zostanie wyświetlony komunikat informujący o zakończeniu metody.

## Koniec przebiegu

9. Po zakończeniu metody postępować zgodnie z instrukcjami wyświetlanymi na ekranie, aby otworzyć drzwi. Sprawdzić, czy po zakończeniu przebiegu tłoczki znajdują się w dołku nr 8 kartridża. Jeśli tłoczki nie zostaną usunięte ze słupka tłoczków, należy postępować zgodnie z wytycznymi przedstawionymi w instrukcji obsługi określonego aparatu Maxwell® Instrument (patrz Tabela 1), aby przeprowadzić procedurę **Czyszczenie** i podjąć próbę rozładunku tłoczków.

10. Natychmiast po zakończeniu przebiegu należy zatkać i wyjąć próbówki do elucji zawierające RNA, aby zapobiec odparowaniu eluatów. Wyjąć tace blatowe Maxwell® z aparatu.

**Uwaga:** Podczas zdejmowania tacy blatowej z platformy aparatu trzymać ją za krawędzie. Próbkę RNA można przechować przez noc w temperaturze od  $-30^{\circ}\text{C}$  do  $-10^{\circ}\text{C}$ , a w przypadku dłuższego przechowywania w temperaturze poniżej  $-60^{\circ}\text{C}$ .

Przed uruchomieniem protokołu odkażania przy użyciu promieniowania ultrafioletowego upewnić się, że próbki zostały usunięte z aparatu w celu zapobieżenia uszkodzeniu oczyszczonego kwasu nukleinowego.



11. Kartridże i tłoczki należy usunąć z tac blatowych Maxwell® i wyrzucić jako odpady niebezpieczne zgodnie z procedurami instytucjonalnymi. Kartridże, tłoczki i próbówki do elucji są przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku. Nie wolno ponownie używać kartridży Maxwell® CSC Cartridge, tłoczków CSC/RSC ani próbek do elucji.

## 8. Czynności po zakończeniu oczyszczania

Ustalić, czy uzysk i czystość próbki oczyszczonego RNA spełniają wymogi wejściowe dla dalszego oznaczenia przed ich wykorzystaniem w tym oznaczeniu.

## 9. Ocena wydajności analitycznej

Wydajność analityczna zestawu Maxwell® CSC RNA Blood Kit została oceniona przy użyciu próbek ludzkiej krwi pełnej w aparacie Maxwell® CSC Instrument. Działanie zestawu Maxwell® CSC RNA Blood Kit porównywalne z aparatem Maxwell® CSC 48 Instrument zostało wykazane jako część rozwoju aparatu.

### 9.A. Ilość i jakość RNA

**Tabela 2. RNA ekstrahowany z powtórzeń próbek wysłanej krwi pełnej.** RNA ekstrahowano z ośmiu powtórzeń próbek 2,5 ml wysłanej krwi pełnej i eluowano w 50 µl. Absorbancję oczyszczonego RNA mierzono przy 230 nm, 260 nm, 280 nm i 340 nm. Stężenie RNA określano przy użyciu absorbancji przy 260 nm po odjęciu absorbancji próby ślepej i skorygowaniu o szumy aparatu (absorbancja przy 340 nm), a współczynniki  $A_{260}/A_{280}$  i  $A_{260}/A_{230}$  obliczano w celu oceny jakości RNA. Zestaw Maxwell® CSC RNA Blood Kit pozwolił uzyskać stężenie RNA wynoszące średnio 127,54 ng/µl przy średnim stosunku  $A_{260}/A_{280}$  wynoszącym 2,12 i średnim stosunku  $A_{260}/A_{230}$  wynoszącym 2,10.

| Powtarzalność  | Stężenie RNA (ng/µl) | Stosunek $A_{260}/A_{280}$ | Stosunek $A_{260}/A_{230}$ |
|----------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1              | 118,22               | 2,11                       | 2,01*                      |
| 2              | 137,85               | 2,12                       | 2,08                       |
| 3              | 107,23               | 2,12                       | 2,09                       |
| 4              | 133,07               | 2,12                       | 2,09                       |
| 5              | 137,18               | 2,12                       | 2,11                       |
| 6              | 93,90                | 2,12                       | 2,09                       |
| 7              | 145,42               | 2,13                       | 2,12                       |
| 8              | 147,45               | 2,13                       | 2,12                       |
| <b>Średnia</b> | <b>127,54</b>        | <b>2,12</b>                | <b>2,10</b>                |

\* Próba wartości oddalonych Dixona pozwoliła na wykluczenie jednego powtórzenia w tym zestawie jako odstającego przy progu ufności 95%. To powtórzenie zostało wykluczone z analizy.

## 9.B. Amplifikacja RNA

**Tabela 3. Ocena możliwości amplifikacji RNA z krwi pełnej.** Aby ocenić zdolność do amplifikacji RNA wyekstrahowanego z krwi pełnej przy użyciu zestawu Maxwell® CSC RNA Blood Kit i aparatu Maxwell® CSC Instrument, każda wyekstrahowana próbka RNA była amplifikowana w dwóch powtórzeniach przy użyciu testu RT-qPCR skierowanego na gen regulatorowy, HPRT1 (fosforybozylotransferaza hipoksantyny 1). Wszystkie próbki RNA uległy amplifikacji w zakresie liniowym testu, z wydajnością w zakresie 117,84–182,79 ng/μl i średnią wydajnością dla wszystkich próbek wynoszącą 151,58 ng/μl.

| Próbka RNA     | Stężenie RNA (ng/μl) określone przy użyciu testu RT-qPCR |
|----------------|----------------------------------------------------------|
| 1              | 144,70                                                   |
| 2              | 136,90                                                   |
| 3              | 117,84                                                   |
| 4              | 151,06                                                   |
| 5              | 173,55                                                   |
| 6              | 124,25                                                   |
| 7              | 182,79                                                   |
| 8              | 181,55                                                   |
| <b>Średnia</b> | <b>151,58</b>                                            |

## 9.C. Odtwarzalność

**Tabela 4. Zmienność pomiędzy użytkownikami w ekstrakcji RNA z krwi pełnej.** Aby ocenić zmienność między użytkownikami, RNA był ekstrahowany z próbek krwi pełnej przez trzech różnych użytkowników przy użyciu zestawu Maxwell® CSC RNA Blood Kit i aparatu Maxwell® CSC Instrument. Wyekstrahowany RNA amplifikowano w teście RT-qPCR nakierowanym na gen HPRT1, a stężenia RNA obliczono z wartości  $C_q$ . Każdy zestaw próbek zawierał osiem powtórzeń. Procentowy współczynnik zmienności (% CV) dla zestawów próbek trzech użytkowników wyniósł 9,83.

| Użytkownik                | Średni uzysk (ng/μl) | % CV  |
|---------------------------|----------------------|-------|
| 1 (n = 7)*                | 134,44               | 3,24  |
| 2 (n = 7)*                | 134,42               | 4,64  |
| 3 (n = 8)                 | 122,95               | 15,13 |
| % CV, użytkownicy 1, 2, 3 |                      | 9,83  |

\* Próba wartości oddalonych Dixona pozwoliła na wykluczenie jednego powtórzenia w tym zestawie jako odstającego przy progu ufności 95%. To powtórzenie zostało wykluczone z analizy.



## 9.D. Inhibicja (substancje zakłócające)

### Tabela 5. Badanie zanieczyszczenia RNazą i hamowania amplifikacji RNA przez substancje zakłócające.

RNA został wyekstrahowany z ośmiu powtórzeń próbek tej samej próbki krwi pełnej przy użyciu zestawu Maxwell® CSC RNA Blood Kit i aparatu Maxwell® CSC Instrument. Do badania obecności aktywnej RNazy w eluatach użyto dostępnego w handlu testu do wykrywania RNazy. Nie zaobserwowano wykrywalnej aktywności RNazy. Oceniono również wpływ substancji zakłócających, które łączą się z RNA z krwi pełnej. Dla każdego eluatu RNA zostały zebrane dwa zestawy amplifikacji – jeden przy użyciu 2 µl nierozcieńczonego RNA na test RT-qPCR dla celu HPRT1 i drugi przy użyciu 2 µl ośmiokrotnego rozcieńczenia – i obliczono wartości  $\Delta C_q$ . Wartości  $\Delta C_q$  wynosiły najmniej 2,256 cyklu i najwięcej 3,116 cyklu. Wszystkie wartości  $\Delta C_q$  mieściły się w zakresie 3 cykli  $\pm$  1 cykl oczekiwanych dla ośmiokrotnego rozcieńczenia, potwierdzając, że wszelkie substancje, które łączyły się z RNA z krwi pełnej miały minimalny wpływ na amplifikację.

| Numer próbki | $C_q$ dla nierozcieńczonego RNA (cykle) | $C_q$ dla ośmiokrotnego rozcieńczenia RNA (cykle) | $\Delta C_q$ (cykle) |
|--------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------|
| 1            | 25,528                                  | 27,881                                            | 2,353                |
| 2            | 23,530                                  | 26,647                                            | 3,116                |
| 3            | 23,836                                  | 26,888                                            | 3,052                |
| 4            | 23,602                                  | 26,618                                            | 3,016                |
| 5            | 24,139                                  | 26,407                                            | 2,268                |
| 6            | 23,567                                  | 25,824                                            | 2,256                |
| 7            | 23,694                                  | 26,469                                            | 2,774                |
| 8            | 24,298                                  | 27,189                                            | 2,891                |

## 9.E. Zanieczyszczenie krzyżowe

RNA wyekstrahowano z 8 powtórzeń jednej próbki krwi pełnej i 8 kontroli ujemnych (woda) przy użyciu zestawu Maxwell® CSC RNA Blood Kit i aparatu Maxwell® CSC Instrument. Kartridże Maxwell® CSC zawierające próbki krwi pełnej lub kontrolę ujemną (woda) były przetwarzane w naprzemiennych pozycjach w aparacie Maxwell® CSC Instrument. Otrzymane eluaty RNA badano w dwóch powtórzeniach metodą RT-qPCR ukierunkowaną na HPRT1, aby wykryć wszelkie zanieczyszczenia RNA w kontrolach ujemnych z sąsiednich próbek krwi pełnej. W kontrolach ujemnych nie wykryto żadnego zanieczyszczającego RNA.

## 10. Ocena wydajności klinicznej

Wydajność kliniczna zestawu Maxwell® CSC RNA Blood Kit została oceniona przez zewnętrzne laboratorium kliniczne przy użyciu próbek ludzkiej krwi pełnej i aparatu Maxwell® CSC Instrument.

## 10.A. Ilość, jakość i amplifikacja RNA

**Tabela 6. Porównanie metod.** RNA został wyekstrahowany z 2,5 ml próbek z łącznie 24 różnych próbek krwi pełnej przy użyciu zestawu Maxwell® CSC RNA Blood Kit i aparatu Maxwell® CSC Instrument. RNA został wyekstrahowany z tych samych próbek przy użyciu standardowej metody oczyszczania kwasów nukleinowych (laboratoryjna metoda referencyjna) dla celów porównawczych. Wyekstrahowany RNA badano w RT-qPCR dla BCR-ABL1 ukierunkowanego na transkrypt ABL1 typu dzikiego (protoonkogen ABL 1) zgodnie ze standardowymi procedurami laboratorium klinicznego, a wydajność określano jako liczbę wykrytych kopii ABL1. Eluaty RNA z tej samej próbki krwi pełnej były badane w tym samym teście RT-qPCR, aby zminimalizować wpływ zmienności testu na wyniki. RNA wyekstrahowany przy użyciu zestawu Maxwell® CSC RNA Blood Kit dawało  $\geq 10\,000$  kopii ABL1 w teście RT-qPCR. Wydajność uzyskana przy użyciu RNA ekstrahowanego z tej samej próbki krwi była zgodna z RNA ekstrahowanym przy użyciu zestawu Maxwell® CSC RNA Blood Kit i laboratoryjnej metody referencyjnej.

| Próbka krwi | Uzysk RNA (kopie ABL1) |                                   | Średnia wartość $C_q$ |                                   | $\Delta C_q$ (Maxwell® CSC – laboratoryjna metoda referencyjna) |
|-------------|------------------------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
|             | System Maxwell® CSC    | Laboratoryjna metoda referencyjna | System Maxwell® CSC   | Laboratoryjna metoda referencyjna |                                                                 |
| 1           | 69 083,3               | 40 833,2                          | 22,06                 | 22,86                             | -0,80                                                           |
| 2           | 223 597,5              | 80 162,6                          | 20,29                 | 21,84                             | -1,55                                                           |
| 3           | 124 624,0              | 45 716,7                          | 21,17                 | 22,69                             | -1,52                                                           |
| 4           | 108 277,1              | 46 241,3                          | 21,39                 | 22,71                             | -1,32                                                           |
| 5           | 121 341,0              | 64 340,2                          | 21,21                 | 22,17                             | -0,96                                                           |
| 6           | 83 351,0               | 52 905,5                          | 21,78                 | 22,46                             | -0,68                                                           |
| 7           | 143 918,0              | 61 427,5                          | 20,95                 | 22,24                             | -1,29                                                           |
| 8           | 118 185,0              | 50 284,7                          | 21,25                 | 22,54                             | -1,29                                                           |
| 9           | 58 022,8               | 40 434,3                          | 22,76                 | 23,30                             | -0,54                                                           |
| 10          | 101 240,1              | 45 860,7                          | 21,94                 | 23,11                             | -1,17                                                           |
| 11          | 59 266,0               | 44 276,5                          | 22,74                 | 23,16                             | -0,42                                                           |
| 12          | 71 620,9               | 50 254,9                          | 22,45                 | 22,98                             | -0,53                                                           |
| 13          | 92 923,4               | 60 768,8                          | 22,07                 | 22,69                             | -0,62                                                           |
| 14          | 62 285,3               | 47 983,2                          | 22,66                 | 23,04                             | -0,38                                                           |
| 15          | 81 094,3               | 50 554,7                          | 22,27                 | 22,97                             | -0,70                                                           |
| 16          | 88 203,5               | 56 790,2                          | 22,14                 | 22,79                             | -0,65                                                           |
| 17          | 35 307,2               | 29 342,7                          | 22,85                 | 23,11                             | -0,26                                                           |
| 18          | 30 544,4               | 30 890,3                          | 23,08                 | 23,04                             | 0,04                                                            |
| 19          | 35 016,3               | 37 702,2                          | 22,86                 | 22,74                             | 0,12                                                            |
| 20          | 26 850,8               | 29 618,1                          | 23,25                 | 23,10                             | 0,16                                                            |
| 21          | 26 792,4               | 34 277,7                          | 23,25                 | 22,88                             | 0,37                                                            |
| 22          | 35 179,1               | 30 662,9                          | 22,84                 | 23,05                             | -0,20                                                           |
| 23          | 47 123,3               | 40 675,5                          | 22,41                 | 22,63                             | -0,22                                                           |
| 24          | 50 146,0               | 30 248,6                          | 22,31                 | 23,07                             | -0,75                                                           |

## 10.B. Odtwarzalność

**Tabela 7. Odtwarzalność ekstrakcji RNA przez różnych testerów.** Aby potwierdzić zgodność wyników pomiędzy użytkownikami w typowym środowisku użytkownika, RNA został wyekstrahowany z ośmiu różnych próbek krwi pełnej przez dwóch niezależnych testerów przy użyciu zestawu Maxwell® CSC RNA Blood Kit i aparatu Maxwell® CSC Instrument. Otrzymane eluaty RNA amplifikowano przy użyciu testu RT-qPCR dla BCR-ABL1 ukierunkowanego na transkrypt ABL1 typu dzikiego, a wyniki uzyskane z każdej próbki porównano między dwoma testerami. RNA wyekstrahowany przez obu testerów ze wszystkich próbek był amplifikowany i dawał  $\geq 10\,000$  kopii ABL1, ze średnią różnicą  $C_q$  ( $\Delta C_q$ ) między testerami mniejszą niż 1 cykl. Wartość  $\Delta C_q$  mieściła się w zakresie od 0,03 do 1,25.

| Próbka krwi | Uzysk RNA (kopie ABL1) |           | Średnia wartość $C_q$ |          | $\Delta C_q$ między testerami |
|-------------|------------------------|-----------|-----------------------|----------|-------------------------------|
|             | Tester 1               | Tester 2  | Tester 1              | Tester 2 |                               |
| 1           | 69 083,3               | 68 042,8  | 22,06                 | 22,09    | 0,03                          |
| 2           | 223 597,5              | 102 244,2 | 20,29                 | 21,47    | 1,18                          |
| 3           | 124 624,0              | 68 351,6  | 21,17                 | 22,08    | 0,91                          |
| 4           | 108 277,1              | 48 271,9  | 21,39                 | 22,60    | 1,21                          |
| 5           | 121 341,0              | 133 669,5 | 21,21                 | 21,53    | 0,32                          |
| 6           | 83 351,0               | 64 549,4  | 21,78                 | 22,60    | 0,82                          |
| 7           | 143 918,0              | 84 824,5  | 20,95                 | 22,20    | 1,25                          |
| 8           | 118 185,0              | 83 599,3  | 21,25                 | 22,22    | 0,97                          |

## 10.C. Zanieczyszczenie krzyżowe

Oceniono zanieczyszczenie krzyżowe występujące pomiędzy próbkami podczas ekstrakcji RNA przy użyciu zestawu Maxwell® CSC RNA Blood Kit w typowym środowisku użytkownika. Ekstrakcję RNA przy użyciu zestawu Maxwell® CSC RNA Blood Kit przeprowadzono z ośmiu różnych próbek krwi pełnej i ośmiu kontroli ujemnych (woda) w tym samym przebiegu pracy aparatu. Kartridże Maxwell® CSC zawierające próbki krwi pełnej lub kontrole ujemne były przetwarzane w naprzemiennych pozycjach w aparacie Maxwell® CSC Instrument. Otrzymane eluaty były badane w dwóch powtórzeniach za pomocą RT-qPCR skierowanego na gen ABL1 typu dzikiego w celu określenia, czy próbki kontroli ujemnej zawierały jakikolwiek zanieczyszczający RNA z próbek krwi. W kontrolach ujemnych nie wykryto żadnego zanieczyszczającego RNA, co potwierdza, że nie było wykrywalnego zanieczyszczenia krzyżowego podczas ekstrakcji RNA przy użyciu systemu Maxwell® CSC.

## 11. Rozwiązywanie problemów

W przypadku pytań, na które nie można znaleźć odpowiedzi w niniejszym dokumencie, należy skontaktować się z lokalnym oddziałem firmy Promega lub jej dystrybutorem. Informacje kontaktowe są dostępne pod adresem: **www.promega.com**. Adres e-mail: **techserv@promega.com**

| Objawy                                                                                                      | Możliwe przyczyny i komentarze                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Niższe niż oczekiwane stężenie RNA w eluacie (typowa próbka powinna zawierać > 50 ng/μl oczyszczonego RNA). | <p>Liczba białych krwinek (WBC) w próbce krwi była niższa lub wyższa niż zakres, do którego produkt jest przeznaczony: od <math>4 \times 10^6</math> do <math>10 \times 10^6</math> WBC/ml. Zestaw został zoptymalizowany pod kątem oczyszczania RNA z próbek krwi o liczbie białych krwinek od <math>4 \times 10^6</math> do <math>10 \times 10^6</math> WBC/ml.</p> <p>Użyto nieprawidłowej objętości pełnej krwi. Dodanie pełnej krwi w ilości większej lub mniejszej niż 2,5 ml może prowadzić do gorszych rezultatów.</p> <p>Próbka krwi była za stara. Najlepsze rezultaty uzyskuje się z użyciem świeżych próbek krwi. Zastosowanie próbek przechowywanych w temperaturze 2–10°C przez ponad 3 dni może prowadzić do gorszych rezultatów.</p> <p>Przed procedurą oczyszczania próbkę przechowywano w temperaturze poniżej 2°C lub powyżej 10°C. Nieprawidłowe temperatury przechowywania mogą spowodować lizę białych krwinek lub degradację RNA.</p> <p>Mogło dojść do wprowadzenia RNAz podczas przetwarzania lub ilościowego oznaczania próbek. Aby dowiedzieć się, jak stworzyć środowisko wolne od rybonukleaz, należy zapoznać się z rozdziałem 12.</p> <p>Niewystarczające usunięcie supernatantu po lizie różnicowej. Upewnić się, że supernatant usunięto w najwyższym możliwym stopniu.</p> <p>Pellet białych krwinek uległ przesunięciu podczas usuwania supernatantu. Unikać dotykania pelletu WBC podczas usuwania supernatantu.</p> <p>Nieprawidłowy typ próbki. Zestaw jest przeznaczony do stosowania z pełną ludzką krwią. Zestawu nie przetestowano z użyciem innych typów próbek (np. szpik kostny, osocze, kożuszek krwi itp.).</p> <p>Nieprawidłowy typ próbek do pobierania krwi. Zestaw jest przeznaczony do stosowania z pełną krwią ludzką w próbkach EDTA do pobierania próbek. Zestawu nie przetestowano z użyciem innych typów próbek i mogą one nie nadawać się do oczyszczania.</p> |

## 11. Rozwiązywanie problemów (ciąg dalszy)

| Objawy                                                                                                                                                                           | Możliwe przyczyny i komentarze                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Niska jakość RNA (eluaty powinny charakteryzować się stosunkiem <math>A_{260}/A_{280}</math> wyższym niż 1,8 oraz stosunkiem <math>A_{260}/A_{230}</math> od 1,8 do 2,4).</p> | <p>Liczba białych krwinek (WBC) w próbce krwi była wyższa niż zakres, do którego produkt jest przeznaczony: od <math>4 \times 10^6</math> do <math>10 \times 10^6</math> WBC/ml. Zestaw został zoptymalizowany pod kątem oczyszczania RNA z próbek krwi o liczbie białych krwinek od <math>4 \times 10^6</math> do <math>10 \times 10^6</math> WBC/ml.</p> <p>Użyto nieprawidłowej objętości pełnej krwi. Dodanie pełnej krwi w ilości większej niż 2,5 ml może prowadzić do słabej czystości eluatu.</p> <p>Próbka krwi była za stara. Najlepsze rezultaty uzyskuje się z użyciem świeżych próbek krwi. Zastosowanie próbek przechowywanych w temperaturze 2–10°C przez ponad 3 dni może prowadzić do gorszej jakości RNA.</p> <p>Przed procedurą oczyszczania próbkę przechowywano w temperaturze poniżej 2°C lub powyżej 10°C. Nieprawidłowe temperatury przechowywania mogą spowodować lizę białych krwinek lub degradację RNA.</p> <p>Niewystarczające usunięcie supernatantu po lizie różnicowej. Upewnić się, że supernatant usunięto w najwyższym możliwym stopniu.</p> <p>Nieprawidłowy typ próbki. Wyrób jest przeznaczony do stosowania z pełną krwią ludzką. Wyrobu nie przetestowano z użyciem innych typów próbek (np. szpik kostny, osocze, kożuszek krwi itp.).</p> |
| <p>W eluatach znajdują się wysokie poziomy DNA (eluaty są zanieczyszczone DNA, który może zakłócić dalsze testy).</p>                                                            | <p>Liczba białych krwinek (WBC) w próbce krwi jest wyższa niż zakres, do którego produkt jest przeznaczony: od <math>4 \times 10^6</math> do <math>10 \times 10^6</math> WBC/ml.</p> <p>Użyto nieprawidłowej objętości pełnej krwi. Dodanie pełnej krwi w ilości większej niż 2,5 ml może doprowadzić do zanieczyszczenia eluatów materiałem DNA.</p> <p>Do kartridży nie dodano DNazy I. W miarę możliwości sprawdzić dołek nr 4 w zużytych kartridżach. Dołek nr 4 powinien być zabarwiony na zielono (nie żółto), jeżeli DNazę I dodano do kartridży w kroku 5 opisanym w rozdziale 6.B.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

## Objawy

Wstępnie przetworzony lizat jest zbyt lepki do pipetowania

## Możliwe przyczyny i komentarze

Liczba białych krwinek (WBC) w próbce krwi była wyższa niż zakres, do którego produkt jest przeznaczony: od  $4 \times 10^6$  do  $10 \times 10^6$  WBC/ml.

Użyto nieprawidłowej objętości pełnej krwi. Dodanie pełnej krwi w ilości większej niż 2,5 ml może doprowadzić do uzyskania lizatów, które są lepkie i trudne w pipetowaniu.

Wszelkie poważne incydenty, które miały miejsce w związku z urządzeniem, które doprowadziły lub mogą prowadzić do śmierci lub poważnych obrażeń użytkownika lub pacjenta, należy niezwłocznie zgłaszać producentowi. Użytkownicy mający siedzibę w Unii Europejskiej powinni również zgłaszać wszelkie poważne incydenty właściwemu organowi państwa członkowskiego, w którym użytkownik i/lub pacjent ma siedzibę.

## 12. Tworzenie środowiska wolnego od rybonukleaz

Rybonukleazy są bardzo trudne do dezaktywowania. Należy uważać, aby nie wprowadzić aktywności RNazy do próbek RNA podczas lub po izolacji. Jest to szczególnie istotne, jeżeli materiał wyjściowy był trudny do zdobycia lub jest niemożliwy do zastąpienia. Poniższe uwagi mogą pomóc w zapobieganiu przypadkowej kontaminacji próbek RNazą.

1. Dwa najczęstsze źródła kontaminacji RNazą to dłonie użytkownika oraz bakterie lub pleśń, które mogą występować na cząsteczkach kurzu unoszących się w powietrzu. Aby zapobiec zanieczyszczeniu pochodzącego z tych źródeł, należy stosować technikę sterylną podczas obchodzenia się z odczynnikami dostarczonymi wraz z niniejszym systemem. Należy zawsze nosić rękawiczki. Należy zmieniać rękawiczki za każdym razem, gdy występuje podejrzenie, że mogło dojść do kontaktu z rybonukleazami.
2. W miarę możliwości do przenoszenia RNA należy stosować sterylne wyroby z tworzyw sztucznych. Materiały te są zwykle wolne od RNaz i nie wymagają zabiegów mających na celu ich dezaktywację.
3. Niesterylne wyroby ze szkła i z plastiku oraz komory do elektroforezy należy przed użyciem odkazić, aby upewnić się, że są wolne od RNaz. Wyżarzać szkło w temperaturze 200°C przez noc, a wyroby plastikowe dokładnie opłukać, używając 0,1 N NaOH, 1 mM EDTA, a następnie wodą wolną od RNazy. Można również użyć dostępnych na rynku produktów do usuwania RNaz, przestrzegając instrukcji producenta.

**Uwaga:** Komory do elektroforezy mogą być zanieczyszczone rybonukleazami, szczególnie RNazą A, które pochodzą z analizy próbek DNA. W miarę możliwości wyznaczyć nowy lub odkazony aparat wyłącznie do analizy RNA.

4. Roztwory niedostarczone wraz z systemem odkazić przez dodanie pirowęgłanu dietylu (DEPC) do osiągnięcia stężenia 0,1% obj./obj. w wyciągu laboratoryjnym. Inkubować przez noc, mieszając w temperaturze pokojowej w wyciągu laboratoryjnym. Umieścić w autoklawie na 30 minut, aby usunąć wszelkie ślady DEPC.



**Przestroga:** DEPC jest środkiem podejrzanym o właściwości rakotwórcze i należy go stosować wyłącznie w wyciągu laboratoryjnym odprowadzającym opary chemiczne. DEPC szybko reaguje z aminami i nie można go stosować do obróbki buforów Tris.

**Uwaga:** W przypadku wszystkich dalszych zastosowań ochrona próbek RNA przez RNazami jest niezbędna. Nosić czyste rękawiczki oraz stosować roztwory i próbówki wirówkowe wolne od RNaz.

### 13. Źródła

1. Clinical Laboratory Standards Institute (2007) Handling, transport, and storage of specimens for molecular methods. Dokument dostępny online pod adresem: **www.clsi.org**
2. Murray, P.R. *et al.* (2007) *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition, ASM Press.

### 14. Powiązane produkty

#### Aparatura i akcesoria

| Produkt                             | Ilość            | Cat.#  |
|-------------------------------------|------------------|--------|
| Maxwell® CSC Instrument*            | 1 szt.           | AS6000 |
| Maxwell® RSC/CSC Deck Tray          | 1 szt.           | SP6019 |
| Maxwell® CSC 48 Instrument*         | 1 szt.           | AS8000 |
| Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray | 1 szt.           | AS8401 |
| Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray  | 1 szt.           | AS8402 |
| Microtube, 1,5 ml                   | 1000 szt./zestaw | V1231  |

\* Do stosowania w diagnostyce in vitro. Niniejszy produkt jest dostępny wyłącznie w niektórych krajach.

#### Zestawy odczynników Maxwell® CSC

Na stronie **www.promega.com** znajduje się lista dostępnych zestawów do oczyszczania Maxwell® CSC.

### 15. Podsumowanie zmian

W wersji 10/22 niniejszego dokumentu wprowadzono następujące zmiany:

1. Rozdział 3 została zmieniona na Przeznaczenie/zastosowanie produktu.
2. Dodano rozdziały 9 i 10, a kolejne zmieniły numerację.
3. Dokument zaktualizowany pod kątem zgodności z Rozporządzeniem (UE) 2017/746 w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro.

<sup>(a)</sup>Amerykańska publikacja patentowa nr 7,329,488 oraz południowokoreańska publikacja patentowa nr 100483684.

© 2014–2022 Promega Corporation. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Maxwell jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Promega Corporation.

LpH jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Steris Corporation.

Produkty mogą być przedmiotem zgłoszonych bądź przyznanych patentów lub mogą podlegać pewnym ograniczeniom. Więcej informacji można znaleźć na naszej stronie internetowej.

Wszystkie ceny i dane techniczne mogą ulec zmianie bez wcześniejszego powiadomienia.

Oświadczenia dotyczące produktów mogą ulec zmianie. Aby uzyskać aktualne informacje na temat produktów firmy Promega, należy skontaktować się z działem Promega Technical Services lub zapoznać się z katalogiem produktów firmy Promega dostępnym w Internecie.