

INSTRUKCJA TECHNICZNA

Zestaw Maxwell[®] CSC RNA FFPE Kit

Instrukcja użytkowania produktu
AS1360

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



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanower, Niemcy



INSTRUKCJA
UŻYTKOWANIA PRODUKTU
AS1360



Zestaw Maxwell[®] CSC RNA FFPE Kit

Dokumentacja techniczna jest dostępna na stronie internetowej pod adresem: 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.

1. Opis	2
2. Elementy produktu, warunki przechowywania i objaśnienie symboli	3
3. Przeznaczenie/zastosowanie produktu	5
4. Ograniczenia stosowania produktu	5
5. Przed rozpoczęciem	6
5.A. Przygotowanie próbek FFPE	6
5.B. Przygotowanie kartridża Maxwell [®] CSC RNA FFPE	8
6. Przebieg pracy urządzenia	9
7. Czynności po zakończeniu oczyszczania	12
8. Ocena wydajności analitycznej	12
8.A. Ilość, jakość i amplifikacja RNA	12
8.B. Odtwarzalność	13
8.C. Substancje zakłócające (inhibicja)	13
8.D. Zanieczyszczenie krzyżowe	14
9. Ocena wydajności klinicznej	14
9.A. Ilość, jakość i zdolność do amplifikacji RNA	14
9.B. Odtwarzalność	15
9.C. Zanieczyszczenie krzyżowe	15
10. Rozwiązywanie problemów	16
11. Tworzenie środowiska wolnego od rybonukleaz	18
12. Źródło	18
13. Powiązane produkty	19
14. Podsumowanie zmian	19

Zestaw Maxwell® CSC RNA FFPE Kit jest dostępny wyłącznie w niektórych krajach.

1. Opis

Zestaw Maxwell® CSC RNA FFPE Kit^(a) jest przeznaczony do stosowania w połączeniu z urządzeniami Maxwell® CSC Instruments przedstawionymi w Tabeli 1 w celu zapewnienia łatwej metody wydajnego i zautomatyzowanego oczyszczania RNA z próbek FFPE (utrwalonych w parafinie) pobranych z ludzkiej piersi, płuca lub okrężnicy. Urządzenia Maxwell® CSC Instruments 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. Urządzenia Maxwell® CSC Instruments mogą przetworzyć od jednej do maksymalnej liczby próbek w ciągu około 45 minut, a oczyszczone RNA nadaje się do bezpośredniego wykorzystania w różnych opartych na amplifikacji zastosowaniach na dalszych etapach, takich jak RT-PCR.

Tabela 1. Kompatybilny z urządzeniami

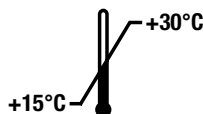
Urządzenie	Cat. #	Instrukcja techniczna
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

Podstawy metody: Zestaw Maxwell® CSC RNA FFPE Kit umożliwia oczyszczanie kwasu nukleinowego przy wykorzystaniu cząsteczek paramagnetycznych, które zapewniają ruchomą fazę stałą stwarzającą optymalne warunki do wychwytywania próbki, przemywania i oczyszczania RNA. Urządzenia Maxwell® CSC Instruments są urządzeniami 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 wykorzystującymi materiały płynne, takich jak zatkane końcówki lub częściowe przeniesienie odczynnika, które obniżają jakość procesów oczyszczania w innych powszechnie stosowanych zautomatyzowanych systemach.

2. Elementy produktu, warunki przechowywania i objaśnienie symboli

PRODUKT	ILOŚĆ	CAT.#
Zestaw Maxwell® CSC RNA FFPE Kit	48 preparatów	AS1360

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



Zawartość zestawu:

- 25 ml oleju mineralnego
- 20 ml buforu lizującego
- 2 × 1 ml proteinazy K
- 100 µl niebieskiego barwnika
- 2 × 1 ml MnCl₂, 0,09 M
- 1 ml buforu DNazy
- 3 fiołki DNazy I (liofilizowanej)
- 48 kartridży Maxwell® FFPE
- 50 tłoczków CSC/RSC
- 50 probówek do elucji (0,5 ml)
- 25 ml Nuclease-Free Water

Warunki przechowywania: Zestaw Maxwell® CSC RNA FFPE Kit należy przechowywać w temperaturze otoczenia (+15 do +30°C). Przechowywać ponownie uwodnioną DNazę I w temperaturze od –30°C do –10°C. Nie przekraczać 10 cykli zamrażania i rozmrażania.



Informacje dotyczące bezpieczeństwa: Kartridże zawierają etanol i izopropanol. Substancje te należy traktować jako łatwopalne, szkodliwe i drażniące.



Elementy zestawu Maxwell® CSC RNA FFPE Kit zaprojektowano do użytkowania z czynnikami potencjalnie zakaźnymi. Podczas pracy z czynnikami zakaźnymi należy nosić odpowiednie środki ochrony indywidualnej (np. rękawiczki i okulary ochronne). Należy przestrzegać obowiązujących w instytucji wytycznych dotyczących postępowania z czynnikami zakaźnymi używanymi z tym systemem oraz utylizacji takich czynników.

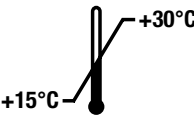


Przestroga: Z kartridżami należy obchodzić się ostrożnie; krawędzie zamknięcia kartridża mogą być ostre.

Informacje dodatkowe: Elementy Maxwell® CSC RNA FFPE 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 partii. Należy używać wyłącznie elementów dostarczonych w zestawie. Nie używać kartridży, jeśli zamknięcie na kartridżu było naruszone w momencie dostawy.

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

Objaśnienie symboli

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

3. Przeznaczenie/zastosowanie produktu

Zestaw Maxwell® CSC RNA FFPE Kit jest przeznaczony do stosowania w połączeniu z urządzeniami Maxwell® CSC Instruments oraz metodą oczyszczania Maxwell® CSC RNA FFPE jako urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro (IVD), służące do zautomatyzowanej izolacji RNA z próbek FFPE (utrwalonych w parafinie) ludzkich tkanek pobranych z piersi, płuca lub okrężnicy. Oczyszczone RNA nadaje się do stosowania w oznaczeniach wykonywanych na potrzeby diagnostyki in vitro opartych na amplifikacji.

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

Próbki FFPE przygotowane z zastosowaniem 10-procentowej obojętnie buforowanej formaliny mogą być stosowane razem z zestawem Maxwell® CSC RNA FFPE Kit.

Zestaw Maxwell® CSC RNA FFPE 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

Działanie zestawu Maxwell® CSC RNA FFPE Kit oceniano przy użyciu próbek tkanek FFPE pobranych z ludzkich piersi, płuc i okrężnicy. Nie jest przeznaczony do użytku z próbkami tkanek innymi niż FFPE, takimi jak świeże lub zamrożone tkanki. Zestaw Maxwell® CSC RNA FFPE Kit nie jest przeznaczony do stosowania z próbkami innego rodzaju, w tym z próbkami innymi niż ludzkie, ani do oczyszczania DNA.

Zestaw Maxwell® CSC RNA FFPE Kit nie jest przeznaczony do użytku z próbkami tkanek przygotowanymi przy użyciu utrwalaczy innych niż 10-procentowa obojętnie buforowana formalina.

Charakterystykę roboczą zestawu Maxwell® CSC RNA FFPE Kit oceniono poprzez wyizolowanie RNA z próbek FFPE tkanek o wielkości od 0,1 do 2,0 mm³.

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 FFPE Kit.

5. Przed rozpoczęciem

Materiały zapewniane przez użytkownika

- mikrowirówka
- pipetory i końcówki pipet do wstępnego przetwarzania i transferu próbek do wstępnie napełnionych kartridży z odczynnikami
- probówki o pojemności 1,5–2,0 ml do inkubacji próbek (np. Microtubes, 1,5 ml, Cat.# V1231)
- zespół bloków grzejnych ustawionych na temperaturę 56°C i 80°C
- próbki FFPE o całkowitej objętości tkanki w zakresie 0,1–2,0 mm³; grubość wycinka nie powinna przekraczać 5 µm (**Uwaga:** Probki należy przechowywać w temperaturze pokojowej [15–30°C].)
- żyłki (**Uwaga:** Podczas korzystania z żyłek w celu usunięcia próbki ze szkiełka podstawowego należy zachować ostrożność.)



W razie konieczności przygotować fiolkę liofilizowanej DNazy I z zastosowaniem 275 µl Nuclease-Free Water. Odwrócić fiolkę w celu wypłukania DNazy I ze spodu zatyczki i obracać delikatnie ruchem wirowym, aby ją wymieszać; nie wytrząsać w wytrząsarce typu vortex.

5.A. Przygotowanie próbek FFPE

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 11 — Tworzenie środowiska wolnego od rybonukleaz.

Obróbka wstępna wycinków

1. Umieścić wycinek w probówce mikrowirówkowej o pojemności 1,5 ml. W przypadku pracy z wycinkami umieszczonymi na szkiełku podstawowym należy je usunąć przy użyciu czystej żyłki.
2. Do próbek z próbką należy dodać 300 µl oleju mineralnego. Wytrząsać przez 10 sekund na wytrząsarce typu vortex.
3. Probki podgrzewać przez 2 minuty do temperatury 80°C. Podczas przygotowywania mieszaniny wzorcowej umieścić próbki w temperaturze pokojowej.
4. Zgodnie z poniższą tabelą należy przygotować mieszaninę wzorcową przy użyciu bufora lizującego, proteinazy K oraz niebieskiego barwnika.

Odczynnik	Ilość/Reakcja	Reakcje (liczba przebiegów + 1)	Łącznie
Bufor lizujący	224 µl	n + 1	224 µl × (n + 1)
Proteinaza K	25 µl	n + 1	25 µl × (n + 1)
Niebieski barwnik	1 µl	n + 1	1 µl × (n + 1)

5. Do każdej z próbek z próbką dodać 250 µl mieszaniny wzorcowej i wytrząsać przez 5 sekund na wytrząsarce typu vortex.

6. Odwirować próbówki z próbką przy $10\,000 \times g$ przez 20 sekund w celu oddzielenia warstw. Jeśli w warstwie wodnej (niższa, niebieska warstwa) obecna jest grudka, należy delikatnie wymieszać fazę wodną, aby rozpuścić grudkę. Pozostawić obie fazy w próbówce.
7. Probówki z próbką należy przenieść do bloku grzejnego podgrzanego do temperatury 56°C i inkubować przez 15 minut.
8. Probówki z próbką należy przenieść do bloku grzejnego podgrzanego do temperatury 80°C i inkubować przez 1 godzinę.
9. Wyjąć próbówki z próbką z bloku grzejnego, a następnie pozostawić je na 15 minut do ostygnięcia do temperatury pokojowej. W trakcie stygnięcia próbek przygotować koktajl DNazy opisany w Kroku 10.
10. Przygotować koktajl zawierający MnCl_2 , bufor DNazy i DNazy I w następującej kolejności:

Odczynnik ¹	Ilość/Reakcja	Reakcje (liczba przebiegów + 1)	Łącznie
MnCl_2 , 0,09 M	26 μl	n + 1	26 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
Bufor DNazy ²	14 μl	n + 1	14 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
DNaza I ³	10 μl	n + 1	10 $\mu\text{l} \times (n + 1)$

¹Jeżeli odczynniki DNazy w koktajlu są oddzielnie dodawane do próbek, należy upewnić się, że zostały dodane w powyższej kolejności. Dołączyć każdy odczynnik poprzez dokładne pipetowanie przed dodaniem kolejnego odczynnika.

²Przechowywać bufor DNazy w temperaturze $15\text{--}30^{\circ}\text{C}$; podczas przechowywania w niższej temperaturze może nastąpić wytrącanie. Jeżeli bufor zawiera wytrącony osad, należy go ponownie rozpuścić, podgrzewając do 56°C przez 2 minuty, a następnie krótko wytrząsać na wytrząsarce typu vortex.

³Pozostałą przygotowaną DNazę I przechowywać w temperaturze od -30 do -10°C .

11. Dodać 50 μl koktajlu DNazy do niebieskiej fazy wodnej w każdej próbówce z próbką. Wymieszać przez pipetowanie 10 razy.
12. Inkubować próbówki z próbką przez 15 minut w temperaturze pokojowej ($15\text{--}30^{\circ}\text{C}$). Podczas inkubacji przygotować kartridże w sposób opisany w rozdziale 5.B.
13. Wirować próbówki z próbką w mikrowirówce z pełną prędkością przez 5 minut.
14. Natychmiast przenieść niebieską fazę wodną do dolka nr 1 w kartridżu Maxwell® CSC RNA FFPE.

5.B. Przygotowanie kartridża Maxwell® CSC RNA FFPE

1. Przed rozpoczęciem pracy z kartridżami Maxwell® FFPE, tłoczkami CSC/RSC i probówkami do elucji należy zmienić rękawiczki. Kartridże są ustawiane na stojakach na kartridże na zewnątrz urządzenia, po czym stojaki na kartridże, zawierające kartridże i próbki, są następnie przenoszone do urządzenia w celu rozpoczęcia oczyszczania. Umieścić każdy kartridż w stojaku na kartridże 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 się obchodzić ostrożnie. Krawędzie zamknięcia kartridża mogą być ostre.

2. Umieścić jeden tłoczek w dołku nr 8 każdego kartridża.
3. Umieścić pustą probówkę do elucji w położeniu probówki do elucji dla każdego kartridża na stojakach na kartridże.

Uwaga: Należy używać wyłącznie probówek do elucji dostarczonych w zestawie Maxwell® CSC RNA FFPE Kit. Inne probówki do elucji mogą nie być zgodne z urządzeniem Maxwell® CSC Instrument, co może wpłynąć na wynik oczyszczania RNA.

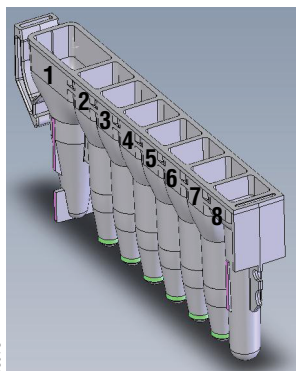
4. Na dnie każdej probówki do elucji umieścić 50 µl Nuclease-Free Water. Probówki do elucji muszą być otwarte podczas oczyszczania RNA.

Uwaga: Należy używać wyłącznie Nuclease-Free Water dostarczonej w zestawie Maxwell® CSC RNA FFPE Kit. Stosowanie innych buforów do elucji może wpłynąć na wydajność procesu oczyszczania RNA i dalsze zastosowanie.

Uwagi dotyczące przygotowania kartridży Maxwell® CSC RNA FFPE



Wycieki próbki lub odczynnika na dowolną część stojaka na kartridże 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 urządzenia.



Zawartość dołka dodawana przez użytkownika:

1. Wstępnie przetworzone próbki
8. Tłoczek CSC/RSC

Rysunek 1. Kartridż Maxwell® CSC. Wstępnie przetworzona próbka FFPE zostaje dodana do dołka nr 1, a tłoczek do dołka nr 8.



Rysunek 2. Ustawianie i konfiguracja stojaka na kartridże. Nuclease-Free Water jest dodawana do próbek do elucji w sposób przedstawiony na rysunku.

6. Przebieg pracy urządzenia

Metodę Maxwell® CSC RNA FFPE do urządzenia Maxwell® CSC Instrument można pobrać ze strony internetowej firmy Promega: www.promega.com/resources/tools/maxwellcscmethod. Metodę Maxwell® CSC RNA FFPE do urządzenia Maxwell® CSC 48 Instrument można pobrać ze strony internetowej firmy Promega: www.promega.com/resources/tools/maxwellcsc48method

W przypadku podejrzenia, że urządzenie zostało zanieczyszczone RNazą, wyczyścić je przed uruchomieniem za pomocą roztworu detergentu, np. Steris LpH®. Należy przestrzegać wytycznych w punkcie dotyczącym czyszczenia i konserwacji w *instrukcji obsługi urządzenia Maxwell® CSC Instrument #TM457* lub *instrukcji obsługi urządzenia Maxwell® CSC 48 Instrument #TM623*.

1. Włączyć urządzenie Maxwell® Instrument i tablet. Załogować się na tablecie i uruchomić oprogramowanie Maxwell® IVD Mode, dwukrotnie dotykając ikony na pulpicie. Urządzenie przeprowadzi autotest i ustawi w położeniu wyjściowym wszystkie ruchome części.
2. Wybrać opcję **Start** na ekranie głównym.

6. Przebieg pracy urządzenia (ciąg dalszy)

3. Zeskanować lub wprowadzić kod kreskowy znajdujący się w prawym górnym rogu etykiety zestawu Maxwell® CSC RNA FFPE Kit i nacisnąć przycisk **OK**, aby automatycznie wybrać metodę, która zostanie zastosowana (Rysunek 3).

Uwaga: Kod kreskowy metody zestawu Maxwell® CSC RNA FFPE Kit jest wymagany do przeprowadzenia oczyszczania RNA przy użyciu urządzenia Maxwell® CSC Instruments. Etykieta zestawu zawiera dwa kody kreskowe. Kod kreskowy metody pokazano 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 urządzenia Maxwell® CSC 48 Instrument nacisnąć przycisk **Przód** lub **Tył**, aby wybrać lub cofnąć wybór pozycji kartridża na każdym stojaku na kartridże.

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 urządzenia, czy otwarte próbki do elucji zawierające bufor do elucji są obecne oraz czy tłoczki zostały umieszczone w dolku nr 8. Przenieść stojak na kartridże zawierający przygotowane kartridże do platformy urządzenia Maxwell®.

Wkładanie stojaka na kartridże Maxwell®: Stojak na kartridże należy trzymać za brzegi, aby uniknąć wypadnięcia kartridży. Upewnić się, że stojak na kartridże został umieszczony w urządzeniu Maxwell® w taki sposób, że próbki do elucji znajdują się możliwie jak najbliżej drzwi. Przetawić tył stojaka na kartridże w dół i ustawić ją na urządzeniu tak, aby jej tył był oparty o tylną część platformy urządzenia. Docisnąć przednią część stojaka na kartridże, aby osadzić go na platformie urządzenia. 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 urządzenia.

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

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

Uwaga: W przypadku korzystania z urządzenia Maxwell® Instrument z 48 pozycjami i włączenia systemu wizualizacji skanowanie stojaków na kartridże rozpocznie się po zamknięciu drzwi. Wszelkie błędy w konfiguracji stojaków na kartridże (np. tłoczki nieznajdujące się w dołku nr 8, brak otwartych probówek 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. Urządzenie 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. Próbkki 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 urządzenia Maxwell® Instrument (patrz Tabela 1), aby przeprowadzić procedurę **Czyszczenie** i podjąć próbę rozładunku tłoczków.
10. Natychmiast po zakończeniu przebiegu należy zatkać i wyjąć probówki do elucji zawierające RNA, aby zapobiec odparowaniu eluatów. Wyjąć stojaki na kartridże Maxwell® z urządzenia.

Uwaga: Podczas zdejmowania stojaka na kartridże z platformy urządzenia trzymać go za krawędzie. Przed uruchomieniem protokołu odkażania przy użyciu promieniowania ultrafioletowego upewnić się, że próbki zostały usunięte z urządzenia w celu zapobieżenia uszkodzeniu oczyszczonego kwasu nukleinowego. Próbkki RNA można przechować przez noc w temperaturze od -30 do -10°C, a w przypadku dłuższego przechowywania w temperaturze poniżej -60°C.



11. Wyjąć kartridże i tłoczki ze stojaków na kartridże Maxwell® i zutylizować je jako odpady niebezpieczne zgodnie z procedurami obowiązującymi w instytucji. Kartridże, tłoczki i probówki do elucji są przeznaczone do jednorazowego użytku. Nie wolno ponownie używać kartridży Maxwell® CSC, tłoczków CSC/RSC ani probówek do elucji.

7. Czynności po zakończeniu oczyszczania

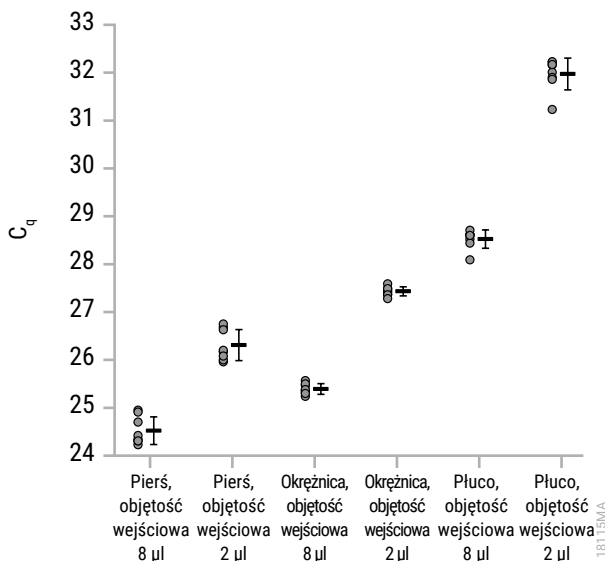
Ustalić, czy uzysk i czystość próbki oczyszczonego RNA spełniają wymogi wejściowe dla dalszego oznaczenia przed ich wykorzystaniem w tym oznaczeniu. Działanie zestawu oceniono na podstawie oczyszczania amplifikowanego RNA. Inne metody ilościowego oznaczania, w tym absorbancja i wiązanie barwnika fluorescencyjnego, mogą nie korelować z amplifikacją (1). Odczyty absorbancji dla próbek FFPE mogą przeszacować uzyskaną wydajność reakcji; zalecamy stosowanie bardziej dokładnych metod określania uzyskanej wydajności (1).

8. Ocena wydajności analitycznej

Wydajność analityczna zestawu Maxwell® CSC RNA FFPE Kit została oceniona przy użyciu próbek ludzkiej tkanki FFPE piersi, okrężnicy i płuc w urządzeniu Maxwell® CSC Instrument. Dodatkowo wydajność zestawu Maxwell® CSC RNA FFPE Kit została oceniona za pomocą urządzenia Maxwell® CSC 48 Instrument w celu wykazania równoważnej wydajności zestawu na obu urządzeniach.

8.A. Ilość, jakość i amplifikacja RNA

Ilość, jakość i amplifikację RNA oceniono dla eluatów przygotowanych z próbek FFPE piersi, okrężnicy i płuc w postaci wycinków przy użyciu zestawu Maxwell® CSC RNA FFPE Kit i urządzenia Maxwell® CSC Instrument. Probki (2 μ l i 8 μ l) każdego eluatu badano w teście RT-qPCR nakierowanym na gen metabolizmu podstawowego, HPRT1 (fosforybzylotransferaza hipoksantyny 1). Do oceny hamowania wykorzystano eluat wprowadzony do RT-qPCR w ilości 2 μ l i 8 μ l, ponieważ czterokrotna różnica danych wejściowych powinna skutkować różnicą C_q wynoszącą około 2 cykle. Wszystkie próbki zostały pomyślnie zamplifikowane przy obu objętościach wejściowych.



Rysunek 4. Wartości C_q RT-qPCR, średnia i odchylenie standardowe dla eluatów przygotowanych próbek FFPE piersi, okrężnicy i płuc w postaci wycinków. W przypadku każdego zestawu próbek kropki po lewej stronie oznaczają wartości C_q danej próbki, a średnia z odchyleniem standardowym jest widoczna po prawej stronie.

8.B. Odtwarzalność

Tabela 2. Powtarzalność pomiędzy użytkownikami. Aby ocenić zmienność w zależności od użytkownika, wstępnie przetworzone próbki tkanek FFPE połączono, a następnie wyekstrahowano przy użyciu zestawu Maxwell® CSC RNA FFPE Kit i urządzenia Maxwell® CSC Instrument. Eluaty amplifikowano w teście RT-qPCR nakierowanym na gen HPRT1, a stężenia RNA obliczono z wartości C_q . Średnie i procentowy współczynnik zmienności (% CV) dla stężenia RNA uzyskanego z eluatów od 3 różnych użytkowników przedstawiono poniżej.

		Stężenie (ng/μl)	Odchylenie standardowe (ng/μl)	% CV
Numer użytkownika	1 (n = 8)	1,47	0,123	8,4
	2 (n = 8)	1,45	0,082	5,7
	3 (n = 7)*	1,39	0,100	7,2
Średnia dla trzech różnych użytkowników		1,44	0,104	7,2

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

8.C. Substancje zakłócające (inhibicja)

Tabela 3. Hamowanie przez substancje endogenne w próbce. Eluaty przygotowano z próbek tkanek FFPE piersi, płuc i okrężnicy przy użyciu zestawu Maxwell® CSC RNA FFPE Kit i urządzenia Maxwell® CSC Instrument. Próbkę (2 μl i 8 μl) każdego eluatu amplifikowano w RT-qPCR ukierunkowanym na gen HPRT i obliczono ΔC_q (różnica między średnią C_q dla każdej wejściowej objętości eluatu). Wartość ΔC_q między 2 μl a 8 μl na wejściu mieściła się w zakresie od 1,94 do 2,04 cykli. Wartość ΔC_q pomiędzy wprowadzonymi objętościami 2 cykli odpowiada brakowi wykrywalnego hamowania amplifikacji DNA. W żadnej z badanych tkanek nie wykryto zahamowania.

Tkanka (n = 8)	C_q dla objętości wejściowej 8 μl (cykle)	C_q dla objętości wejściowej 2 μl (cykle)	ΔC_q
FFPE z piersi	24,52	26,46	1,94
FFPE z okrężnicy	25,39	27,43	2,04
FFPE z płuca	28,52	30,49	1,96

8.D. Zanieczyszczenie krzyżowe

RNA oczyszczono z 8 różnych próbek tkanek FFPE i 8 próbek kontroli ujemnej przy użyciu urządzenia Maxwell® CSC Instrument i zestawu Maxwell® CSC RNA FFPE Kit. Kartridże Maxwell® zawierające próbki tkanek FFPE i kartridże Maxwell® zawierające kontrolę ujemną (wodę) przetwarzano w naprzemiennych pozycjach w urządzeniu Maxwell® CSC Instrument, a powstałe eluaty testowano w dwóch egzemplarzach metodą RT-qPCR ukierunkowaną na HPRT1 w celu wyszukania zanieczyszczenia RNA kontroli ujemnych z sąsiednich próbek. W kontrolach ujemnych nie zaobserwowano żadnego zanieczyszczającego RNA.

9. Ocena wydajności klinicznej

Wydajność kliniczna zestawu Maxwell® CSC RNA FFPE Kit została oceniona przez zewnętrzne laboratorium kliniczne przy użyciu próbek ludzkich tkanek FFPE i urządzenia Maxwell® CSC Instrument.

9.A. Ilość, jakość i zdolność do amplifikacji RNA

Tabela 4. Porównanie metod. RNA oczyszczono z 15 próbek tkanek FFPE za pomocą zestawu Maxwell® CSC RNA FFPE Kit i standardową laboratoryjną metodą ekstrakcji (Laboratoryjna Metoda Referencyjna), a następnie amplifikowano przez RT-qPCR ukierunkowany na gen HPRT1 i porównano wyniki C_q z dwóch metod. RNA oczyszczono przy użyciu zestawu Maxwell® CSC RNA FFPE Kit zamplifikowano dla wszystkich próbek i uzyskano wartości C_q między 25,86 a 35,35. Eluaty przygotowane przy użyciu laboratoryjnej metody referencyjnej nie uległy amplifikacji w 3 z 15 badanych próbek. 3 eluaty, które nie uległy amplifikacji, miały wyższe wartości C_q niż eluaty z tych samych próbek przygotowanych za pomocą zestawu Maxwell® CSC RNA FFPE Kit.

Próbka tkanki FFPE	Średnia wartość C_q	
	Maxwell® CSC	Laboratoryjna metoda referencyjna
1	29,55	33,78
2	35,35	Bez wartości C_q
3	25,86	31,37
4	27,75	34,49
5	32,27	Bez wartości C_q
6	33,02	34,49
7	32,69	Bez wartości C_q
8	27,60	36,49
9	31,43	36,77
10	30,35	34,06
11	33,00	35,83
12	31,71	33,39
13	31,27	35,49
14	30,98	34,75
15	33,18	43,71

9.B. Odtwarzalność

Tabela 5. Odtwarzalność między testerami. Aby potwierdzić zgodność wyników pomiędzy testerami w typowym środowisku testera, RNA został wyekstrahowany z ośmiu próbek tkanek FFPE przez dwóch niezależnych testerów przy użyciu zestawu Maxwell® CSC RNA FFPE Kit i urządzenia Maxwell® CSC Instrument. Otrzymane eluaty amplifikowano przy użyciu RT-qPCR ukierunkowanego na gen HPRT1 i porównano wyniki uzyskane z każdej próbki między dwoma testerami.

Próbka tkanki FFPE	Średnia wartość C_q	
	Tester 1	Tester 2
1	29,55	28,30
2	35,35	35,31
3	25,86	26,39
4	27,75	25,92
5	32,64	32,72
6	28,45	27,72
7	31,93	29,70
8	28,09	27,03

9.C. Zanieczyszczenie krzyżowe

Aby potwierdzić, że zanieczyszczenie krzyżowe między próbkami nie występuje w typowym środowisku użytkownika, RNA oczyszczono z 8 różnych próbek tkanek FFPE i 8 próbek kontroli ujemnej (wody) przy użyciu urządzenia Maxwell® CSC Instrument i zestawu Maxwell® CSC RNA FFPE Kit. Kartridże Maxwell® zawierające próbki tkanek FFPE i kartridże Maxwell® zawierające kontrolę ujemną (wodę) były przetwarzane w naprzemiennych pozycjach w urządzeniu Maxwell® CSC Instrument. Eluaty próbek i eluaty kontroli ujemnej badano w dwóch egzemplarzach metodą RT-qPCR ukierunkowaną na gen HPRT1 w celu określenia, czy wystąpiło jakiekolwiek zanieczyszczenie krzyżowe próbek ujemnych. Osiem z 8 ujemnych próbek dało ujemne wyniki, potwierdzając, że nie wystąpiło wykrywalne zanieczyszczenie krzyżowe.

10. 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

Niższe niż oczekiwane stężenie RNA w eluacie (wycinek FFPE powinien przynieść amplifikowalne RNA w oparciu o wielkość tkanki, skład komórkowy, stan utrwalenia formaliną i postępowanie proceduralne).

Przyczyny i komentarze

Charakterystykę roboczą zestawu oceniono poprzez wyizolowanie RNA z próbek FFPE tkanek o wielkości od 0,1 mm³ do 2,0 mm³. Należy używać wycinków, które mieszczą się w podanym zakresie.

Zestaw jest przeznaczony wyłącznie do użytku z próbkami tkanek FFPE pobranymi z ludzkich piersi, płuc i okrężnicy. Czasy i temperatury inkubacji mogą nie być optymalne dla innych typów próbek.

Zestaw nie jest przeznaczony do użytku z próbkami tkanek przygotowanymi przy użyciu utrwalaczy innych niż 10% obojętnie buforowana formalina. Należy się upewnić, że nie zastosowano innego utrwalacza.

Mogło dojść do wprowadzenia RNaz podczas przetwarzania lub ilościowego oznaczania próbek. Aby dowiedzieć się, jak stworzyć środowisko wolne od rybonukleaz, należy zapoznać się z rozdziale 11.

Zastosowano tkankę pochodzącą z barwionego szkiełka podstawowego lub wycinka. Roszczenia wynikające z zastosowania barwionych szkiełek podstawowych lub wycinków nie będą rozpatrywane. Proces oczyszczania należy powtórzyć z użyciem bezbarwnego szkiełka podstawowego lub wycinka.

Działanie zestawu oceniono na podstawie oczyszczania amplifikowanego RNA. Inne metody ilościowego oznaczania, w tym absorbancja i wiązanie barwnika fluorescencyjnego, mogą nie korelować z amplifikacją. Zastosować metodę ilościowego oznaczania amplifikacji w celu oceny wydajności.

Objawy

Jakość poniżej oczekiwań
(eluat zawiera znacznie pofragmentowane RNA lub inhibitory do dalszego oznaczania analitycznego).

Przyczyny i komentarze

Utrwalenie formaliną oraz wynikające z tego zerwanie połączeń prowadzi do fragmentacji RNA. Jeśli RNA było pofragmentowane przed ekstrakcją/oczyszczaniem, pofragmentowane RNA zostanie oczyszczone przy użyciu tego zestawu. Należy powtórzyć proces przy użyciu sąsiedniego wycinka w celu oceny, czy problem dotyczy wybranego wycinka, czy procesu.

Niektóre oznaczenia oparte na amplifikacji są szczególnie wrażliwe na obecność inhibitorów. Dalsze kontrole oznaczeń powinny zidentyfikować obecność inhibitorów amplifikacyjnych w eluacie. Użytkownik jest odpowiedzialny za sprawdzenie kompatybilności produktu z oznaczeniami na dalszych etapach.

DNA występuje w eluatach
(eluaty są zanieczyszczone DNA, co może zakłócać dalsze oznaczanie analityczne).

Koktajl DNazy dodany do próbki powoduje nadmierną aktywność DNazy użytej z próbkami tkanki FFPE o wielkości od 0,1 mm³ do 2,0 mm³. Nie jest przeznaczony do próbek o innej wielkości i może być nieoptymalny. Należy używać wycinków, które mieszczą się w podanym zakresie.

Niedostateczne wymieszanie koktajlu DNazy z próbką podczas wstępnego przetwarzania może skutkować niepełną degradacją DNA. Należy upewnić się, że koktajl DNazy został dokładnie wymieszany z próbką.

Jeżeli składniki koktajlu DNazy są oddzielnie dodawane do próbki, należy upewnić się, że zostały dodane w kolejności opisanej w rozdziale 5.A, krok 10. Ponadto należy upewnić się, że każdy składnik został dokładnie wymieszany przy dodawaniu do próbki. Dodawanie składników w innej kolejności lub niedostateczne wymieszanie może dezaktywować DNazę.

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.

11. Tworzenie środowiska wolnego od rybonukleaz

Rybonukleazy są bardzo trudne do zdezaktywowania. Należy uważać, aby nie wprowadzić aktywności RNazy do próbek RNA podczas lub po izolacji. Jest to szczególnie ważne w przypadku gdy materiał wyjściowy jest dostępny tylko w ograniczonych ilościach. Poniższe uwagi mogą pomóc w zapobieganiu przypadkowej kontaminacji próbek RNazą.

1. Dwa najczęstsze źródła kontaminacji RNazą to dłonie użytkownika oraz bakterie lub pleśnie, które mogą występować na cząsteczkach kurzu unoszących się w powietrzu. Aby zapobiec zanieczyszczeniu pochodzącego z tych źródeł, należy stosować technikę aseptyczną 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, jednorazowe wyroby z tworzyw sztucznych. Materiały te są zwykle wolne od RNaz i nie wymagają zabiegów mających na celu ich dezaktywację.
3. Niesterylne artykuły szklane i plastikowe należy poddać obróbce przed użyciem, aby upewnić się, że są wolne od RNazy. 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.
4. Roztwory niedostarczone wraz z systemem odkażać przez dodanie pirowęglań dietylu (DEPC) do osiągnięcia stężenia 0,1% 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.

12. Źródło

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

13. Powiązane produkty

Urządzenie 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
Micrtoube, 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.

14. Podsumowanie zmian

W wersji 11/22 niniejszego dokumentu wprowadzono następujące zmiany:

1. Rozdział 3 został zmieniony na Przeznaczenie/zastosowanie produktu.
2. Dodano rozdziały 8 i 9.
3. Dokument został zaktualizowany pod kątem zgodności z Rozporządzeniem (UE) 2017/746 w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro.

^(a)Amerykańska publikacja patentowa nr 7,329,488 oraz południowokoreańska publikacja patentowa nr 10-0483684.

© 2013–2022 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.