

INSTRUKCJA TECHNICZNA

Zestaw Maxwell[®] CSC Genomic DNA Kit

Instrukcja użytkowania produktu
AS1850

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

Zestaw Maxwell[®] CSC Genomic DNA 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	5
5.A. Przygotowanie próbek krwi pełnej i kożuska krwi	6
5.B. Przygotowanie próbek aspiratu szpiku kostnego	7
5.C. Przygotowywanie próbek osadu komórkowego	8
5.D. Przygotowanie lizatów na podstawie próbek krwi pełnej, kożuska krwi, szpiku kostnego i osadu komórkowego	9
5.E. Przygotowanie lizatów z próbek tkanek	10
5.F. Przygotowanie lizatów z próbek wymazów policzkowych	11
5.G. Przygotowanie kartridża Maxwell [®] CSC Genomic DNA Cartridge	13
6. Przebieg pracy urządzenia Maxwell [®] Instrument	15
7. Czynności po zakończeniu oczyszczania	17
8. Ocena wydajności analitycznej	17
8.A. Uzysk DNA	17
8.B. Jakość DNA (czystość)	23
8.C. Odtwarzalność	30
8.D. Zdolność do amplifikacji	31
8.E. Inhibicja (substancje zakłócające)	40
8.F. Zanieczyszczenie krzyżowe	46
9. Ocena wydajności klinicznej	47
10. Rozwiązywanie problemów	48
11. Powiązane produkty	51

Zestaw Maxwell® CSC Genomic DNA Kit jest dostępny wyłącznie w niektórych krajach.

1. Opis

Zestaw Maxwell® CSC Genomic DNA Kit^(a) jest przeznaczony do stosowania w połączeniu z urządzeniami Maxwell®, które zostały przedstawione w Tabeli 1, w celu zapewnienia łatwej metody wydajnego i zautomatyzowanego przygotowania próbek i oczyszczania genomowego DNA (gDNA) w różnych próbkach ludzkiego materiału biologicznego. Urządzenia Maxwell® CSC Instrument są przeznaczone do stosowania ze wstępnie napełnionymi kartridżami z odczynnikami i wstępnie zaprogramowanymi metodami oczyszczania, co zwiększa wygodę i upraszcza stosowanie. Metoda Maxwell® dla zestawu CSC Genomic DNA Kit może przetworzyć od jednej do maksymalnej liczby próbek w urządzeniu Maxwell® CSC Instrument w mniej niż 40 minut. Oczyszczone DNA może być stosowane bezpośrednio w różnych aplikacjach, takich jak oznaczenia PCR.

Tabela 1. Kompatybilny z urządzeniami.

Urządzenie	Cat.#	Instrukcja techniczna	Maksymalna liczba próbek
Maxwell® CSC	AS6000	TM457	16
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623	48

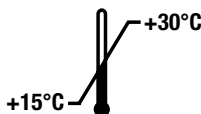
Zasada metody

Zestaw Maxwell® CSC Genomic DNA Kit umożliwia oczyszczanie kwasu nukleinowego z próbek przy wykorzystaniu cząsteczek paramagnetycznych, co zapewnia ruchomą fazę stałą stwarzającą optymalne warunki do wychwytywania próbki, przemywania i oczyszczania gDNA. Urządzenia Maxwell® Instrument są urządzeniami przeprowadzającymi analizy w oparciu o cząsteczki magnetyczne, które wiążą kwasy nukleinowe do cząsteczek magnetycznych w pierwszym dołku wstępnie napełnionego kartridża. Próbkę są przetwarzane w ramach cykli płukania, zanim gDNA zostanie eluowane. Zastosowanie magnetycznego wychwytywania pozwala na uniknięcie często występujących problemów, takich jak zatkanie 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.#
Maxwell® CSC Genomic DNA Kit	48 preparatów	AS1850

Do stosowania w diagnostyce in vitro. Wyłącznie do użytku przez specjalistów. Zawiera ilość odczynników wystarczającą do przeprowadzenia 48 zautomatyzowanych izolacji z różnych próbek ludzkiego materiału biologicznego. Kartridże są przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku.



Zawartość zestawu:

- 2 × 1 ml roztworu proteiny K (PK)
- 1 ml roztworu RNazy A
- 20 ml buforu lizującego
- 20 ml wzmacniacza litycznego (LE2)
- 48 kartridży Maxwell® CSC Cartridge (CSCQ)
- 50 tłoczków CSC/RSC
- 50 probówek do elucji (0,5 ml)
- 20 ml buforu do elucji

Warunki przechowywania: Zestaw Maxwell® CSC Genomic DNA Kit należy przechowywać w temperaturze od +15°C do +30°C.



Informacje dotyczące bezpieczeństwa: Kartridże Maxwell® CSC Cartridge (CSCQ) zawierają etanol i alkohol izopropylowy. Substancje te należy traktować jako łatwopalne, szkodliwe i drażniące. Więcej informacji na temat bezpieczeństwa znajduje się w karcie charakterystyki produktu (Safety Data Sheet, SDS). Należy przestrzegać obowiązujących w instytucji wytycznych dotyczących postępowania ze wszystkimi odpadami chemicznymi używanymi z tym systemem oraz utylizacji takich odpadów.



Kartridże Maxwell® CSC Cartridge (CSCQ) są przeznaczone do stosowania z czynnikami potencjalnie zakaźnymi. Podczas pracy z czynnikami zakaźnymi należy nosić odpowiednie środki ochrony (np. rękawiczki i okulary ochronne). Należy przestrzegać obowiązujących w instytucji wytycznych dotyczących postępowania ze wszystkimi czynnikami zakaźnymi używanymi z tym systemem oraz utylizacji takich czynników.



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



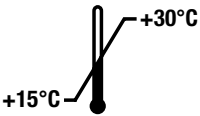













Informacje dodatkowe: Elementy zestawu Maxwell® CSC Genomic DNA Kit zostały dopuszczone do łącznego stosowania na podstawie odpowiednich procedur kwalifikacyjnych i testów kontroli jakości. Nie mieszać elementów zestawu z elementami zestawów różnych serii. Należy używać wyłącznie elementów dostarczonych w zestawie.

Dodatkowe informacje dotyczące bezpieczeństwa znajdują się w karcie charakterystyki dostępnej na stronie:

www.promega.com.

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°C do +30°C.		Wytwórca
	Zagrożenie dla zdrowia		Środek żrący
	Środek drażniący		Łatwopalny
	Conformité Européenne		Zawiera ilość wystarczającą do przeprowadzenia „n” badań
	Ostrzeżenie. Niebezpieczeństwo zmiążdżenia.		Przestroga
	Numer serii		Ostrzeżenie. Zagrożenie biologiczne.
	Nie używać ponownie		Numer katalogowy

3. Przeznaczenie/zastosowanie produktu

Zestaw Maxwell® CSC Genomic DNA Kit jest przeznaczony do stosowania w połączeniu z urządzeniami Maxwell® CSC Instrument oraz metodami oczyszczania Maxwell® CSC Maxwell® CSC 48 Genomic DNA jako wyrób medyczny do diagnostyki in vitro (IVD) w celu automatycznego wyizolowania genomowego DNA z różnych próbek ludzkiego materiału biologicznego. Oczyszczone genomowe DNA jest odpowiednie do stosowania w oznaczeniach wykonywanych na potrzeby diagnostyki in vitro opartych na amplifikacji.

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

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

4. Ograniczenia stosowania produktu

Zestaw Maxwell® CSC Genomic DNA Kit został zatwierdzony pod kątem stosowania wraz z próbkami ludzkiej krwi pełnej, kożuszka krwi, szpiku kostnego, wymazów policzkowych, tkanek i komórek. Użytkownik jest odpowiedzialny za zweryfikowanie jego stosowania w zakresie ekstrakcji DNA z innych typów próbek.

W przypadku dalszych zastosowań diagnostycznych należy zastosować odpowiednie środki kontrolne w zakresie używania genomowego DNA oczyszczonego za pomocą zestawu Maxwell® CSC Genomic DNA Kit. Użytkownik jest odpowiedzialny za weryfikację charakterystyki wydajności wymaganej do dalszych zastosowań diagnostycznych.

5. Przed rozpoczęciem

Materiały zapewniane przez użytkownika

- wytrząsarka typu vortex
- pipetory i końcówki pipet do przenoszenia próbek do wstępnie napełnionych kartridży z odczynnikami
- probówki o pojemności 1,5–2,0 ml do inkubacji próbek (np. mikroprobówki o pojemności 1,5 ml [Cat. # V1231]). Inne typy probówek powinny zostać poddane ocenie przez laboratorium.
- suchy blok grzejny, łaźnia wodna lub mieszadło termiczne ustawione na 56°C
- woda dejonizowana lub woda wolna od nukleaz (Cat. # MC1191) do próbek osadu komórkowego (rozdział 5.C) i próbek tkanek (rozdział 5.E)
- sól fizjologiczna buforowana fosforanami 1X (PBS) do próbek osadu komórkowego pozyskanych z moczu (rozdział 5.C)
- **opcjonalnie:** Kolumny czyszczące (Cat. # Z3871) do próbek wymazów policzkowych (rozdział 5.F)
- **opcjonalnie:** obrotowe mieszadło do probówek

5.A. Przygotowanie próbek krwi pełnej i kożuszka krwi

Wydajność przetwarzania próbek

Łączny uzysk genomowego DNA z próbek krwi pełnej i kożuszka krwi zależy od objętości próbki i liczby krwinek białych (WBC) na milimetr. W przypadku tych typów próbek można stosować zakres objętości próbek wynoszący 50–300 µl. Podczas opracowywania przetestowano próbki krwi pełnej i kożuszka krwi pozyskanego z krwi pełnej o zakresie od 4×10^6 do 10×10^6 WBC/ml i wykazano, że zapewniają one akceptowalną wydajność. Probki niemieszczące się w tym zakresie mogą być zgodne z substancjami chemicznymi do ekstrakcji, lecz powinny zostać poddane ocenie przez laboratorium w zakresie wydajności ekstrakcji i zgodności z dalszymi oznaczeniami.

W przypadku próbek krwi pełnej można stosować zakres objętości elucji wynoszący 50–200 µl. W związku z tym, że próbki kożuszka krwi cechują się zazwyczaj wysokim uzyskiem genomowego DNA, zalecamy elucję z wykorzystaniem 200 µl, aby zapewnić jej najwyższą skuteczność. W przypadku próbek kożuszka krwi można stosować objętości elucji wynoszące 50–200 µl, lecz objętości mniejsze niż 200 µl mogą nie zapewnić optymalnych wyników.

Uwagi:

- a. Zestaw ten przetestowano z wykorzystaniem próbek krwi pełnej i kożuszka krwi przygotowanych na bazie ludzkiej krwi pełnej pobranej do probówek zawierających sól EDTA, cytrynian lub heparynę. Wydajność tego zestawu wraz z innymi probówkami do pobierania krwi powinna zostać poddana ocenie przez użytkownika.
 - b. Zestaw ten przetestowano z wykorzystaniem próbek krwi pełnej i kożuszka krwi przechowywanych w następujących warunkach: przechowywane w temperaturze 15–30°C przez maksymalnie 72 godziny, przechowywane w temperaturze 2–10°C przez maksymalnie 7 dni lub przechowywane w temperaturze –65°C lub niższej przed rozpoczęciem oczyszczania DNA. Inne warunki przechowywania próbek mogą zapewnić akceptowalną wydajność, lecz powinny zostać poddane ocenie przez laboratorium. Zamrożone próbki należy całkowicie rozmrozić przed rozpoczęciem przetwarzania. Wszystkie próbki krwi i kożuszka krwi należy dokładnie wymieszać przed użyciem.
1. Mieszać wszystkie próbki krwi i kożuszka krwi przez co najmniej 5 minut w temperaturze 15–30°C. Można tego dokonać, korzystając z obrotowego mieszadła do probówek lub wytrząsarki typu vortex.
 2. Aby zapoznać się z instrukcjami dotyczącymi przygotowania lizatu, należy przejść do rozdziału 5.D.

5.B. Przygotowanie próbek aspiratu szpiku kostnego

Wydajność przetwarzania próbek

Łączny uzysk genomowego DNA z próbek aspiratu szpiku kostnego zależy od łącznej liczby przetworzonych komórek. Podczas opracowywania przetestowano próbki aspiratu szpiku kostnego o zakresie objętości wynoszącym 50–300 µl i wykazano, że zapewniają one akceptowalną wydajność. Próbki niemieszczące się w tym zakresie mogą być zgodne z substancjami chemicznymi do ekstrakcji, lecz powinny zostać poddane ocenie przez laboratorium w zakresie wydajności ekstrakcji i zgodności z dalszymi oznaczeniami.

W związku z tym, że próbki aspiratu szpiku kostnego cechują się zazwyczaj wysokim uzyskiem genomowego DNA, zalecamy elucję z wykorzystaniem 200 µl, aby zapewnić jej najwyższą skuteczność. W przypadku próbek szpiku kostnego można stosować objętości elucji 50–200 µl, lecz objętości mniejsze niż 200 µl mogą nie zapewnić optymalnych wyników.

Uwagi:

- a. Zestaw ten przetestowano na próbkach aspiratu szpiku kostnego pobranych do probówek zawierających sól EDTA, cytrynian lub heparynę. Wydajność tego zestawu wraz z innymi probówkami do pobierania krwi powinna zostać poddana ocenie przez użytkownika.
 - b. Zestaw ten przetestowano na próbkach aspiratu szpiku kostnego przechowywanych w stanie zamrożonym (przechowywanych w temperaturze –65°C lub niższej) przed rozpoczęciem oczyszczania DNA. Inne warunki przechowywania próbek mogą zapewnić akceptowalną wydajność, lecz powinny zostać poddane ocenie przez laboratorium. Zamrożone próbki należy całkowicie rozmrozić przed rozpoczęciem przetwarzania. Wszystkie zaaspirowane próbki szpiku kostnego należy dokładnie wymieszać przed użyciem.
1. Mieszać wszystkie próbki aspiratu szpiku kostnego przez co najmniej 30 minut w temperaturze 15–30°C za pomocą obrotowego mieszadła do probówek lub wytrząsarki typu vortex.
 2. Aby zapoznać się z instrukcjami dotyczącymi przygotowania lizatu, należy przejść do rozdziału 5.D.

5.C. Przygotowywanie próbek osadu komórkowego

Wydajność przetwarzania próbek

Osady komórkowe mogą być wytwarzane na bazie wielu typów próbek, z uwzględnieniem płynów ustrojowych (np. mocz lub płyn owodniowy), oczyszczonych komórek (np. komórki jednojądrzaste krwi obwodowej) lub hodowlanych komórek. Procedura wirowania próbki jest stosowana w celu wytworzenia osadu komórkowego. Osad ten jest ponownie zawieszany w 300 µl wody wolnej od nukleaz. Łączny uzysk genomowego DNA z próbek osadu komórkowego zależy od liczby komórek występujących w próbce. Podczas opracowywania przetestowano osady komórkowe z maksymalnie 5×10^6 komórek (patrz Tabela 2) i wykazano, że zapewniają one akceptowalną wydajność. Próbki niemieszczące się w tym zakresie mogą być zgodne z substancjami chemicznymi do ekstrakcji, lecz powinny zostać poddane ocenie przez laboratorium w zakresie wydajności ekstrakcji i zgodności z dalszymi oznaczeniami.

Tabela 2. Ocena typów próbek osadu komórkowego.

Typ próbki	Przetestowany zakres próbek	Sugerowana objętość elucji
Mocz	15–50 ml	50 µl
Płyn owodniowy	1–5 ml	50 µl
Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC)	5×10^4 – 5×10^6 komórek	50–200 µl
Hodowlane komórki	5×10^2 – 5×10^6 komórek	50–200 µl

W przypadku próbek osadu komórkowego zastosować zakres objętości elucji wynoszący 50–200 µl. Podczas przetwarzania próbek, które wytwarzają niewielką liczbę komórek w osadzie komórkowym, zalecamy zastosowanie objętości elucji 50 µl. W przypadku próbek zawierających więcej komórek większa objętość elucji może skutkować wyższymi uzyskami genomowego DNA. Laboratoria powinny potwierdzić, że objętość elucji dla danego typu próbki osadu komórkowego zapewnia wystarczającą czystość i stężenie w zakresie dalszego oznaczania.

Uwagi:

- a. Zestaw ten przetestowano na próbkach osadu komórkowego przetworzonych natychmiast po wytworzeniu osadu komórkowego i przechowywanych w stanie zamrożonym (przechowywanych w temperaturze -65°C lub niższej) przed rozpoczęciem oczyszczania DNA. Inne warunki przechowywania próbek mogą zapewnić akceptowalną wydajność, lecz powinny zostać poddane ocenie przez laboratorium. Zamrożone próbki należy całkowicie rozmrozić przed rozpoczęciem przetwarzania.
 - b. Jeśli zamrożenie próbki jest wymagane, próbki powinny być przechowywane w stanie zamrożonym po wytworzeniu osadu komórkowego. Pobieranie osadu komórkowego z próbki, która została zamrożona i odmrożona, może skutkować utratą wydajności.
1. Odwirowywać próbkę o żądanej objętości z szybkością wynoszącą co najmniej $2000 \times g$ przez 20 minut, aby wytworzyć osad komórkowy.
 - a. W przypadku próbek moczu zmyć osad komórkowy poprzez odtworzenie zawiesiny 750 µl roztworu PBS 1X.
 - b. Odwirować próbkę z zawiesiną PBS, aby uzyskać osad komórkowy.

2. Przelać lub zaaspirować płyn z osadzonych komórek. Ponownie zawiesić osad w 300 µl wody wolnej od nukleaz.
3. Aby zapoznać się z instrukcjami dotyczącymi przygotowania lizatu, należy przejść do rozdziału 5.D.

5.D. Przygotowanie lizatów na podstawie próbek krwi pełnej, kożuszka krwi, szpiku kostnego i osadu komórkowego

1. Przygotować i oznaczyć próbki do inkubacji, które zostaną umieszczone w bloku grzejnym ustawionym na temperaturę 56°C.
2. Dodać 30 µl roztworu proteiny K (PK) do każdej próbki do inkubacji.
3. Przelać próbkę o żądanej objętości do każdej próbki do inkubacji. Wymienić końcówki pipet po przeniesieniu każdej próbki w celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego.

Uwaga: Przelanie skrzepłych lub tłustych materiałów albo innych ciał stałych do próbki do inkubacji może skutkować niewystarczającą lizą próbki. Przelać wyłącznie płynną próbkę do próbki do inkubacji.

4. Zatknąć i wytrząsać każdą próbkę z maksymalną szybkością przez 10 sekund na wytrząsarce typu vortex.
5. Dolać 300 µl wzmacniacza litycznego (LE2) do każdej próbki do inkubacji. Zmieniać końcówki pipet po każdym dozowaniu wzmacniacza litycznego (LE2), aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu.

Uwaga: Przejść do kroku 6 bez mieszania lub wytrząsania na wytrząsarce typu vortex.

6. Dodać 300 µl buforu lizującego do każdej próbki do inkubacji. Zmieniać końcówki pipet po każdym dozowaniu buforu lizującego, aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu.
7. Zatknąć i wytrząsać każdą próbkę z maksymalną szybkością przez 10 sekund na wytrząsarce typu vortex.

Uwaga: Sprawdzić, czy wytrząsanie na wytrząsarce typu vortex pozwoliło na uzyskanie jednorodnego lizatu.

8. Inkubować każdą próbkę w bloku grzejnym ustawionym na temperaturę 56°C przez 20 minut. Podczas inkubacji przygotować kartridże Maxwell® CSC Cartridge w sposób opisany w rozdziale 5.G.
9. Wytrząsać każdą próbkę z maksymalną szybkością przez 10 sekund na wytrząsarce typu vortex.
10. Przenieść każdą próbkę lizatu z próbki do inkubacji do dołka nr 1 oddzielnego kartridża i odpowiednio wymieszać z roztworem wiążącym w dołku nr 1 poprzez aspirację i 5–10 dozowań po przeniesieniu w celu uzyskania jednorodnej mieszaniny (dołek nr 1 to największy dołek w kartridżu). Wymienić końcówki pipet po przeniesieniu każdej próbki w celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego próbki.

Uwaga: Nieuzyskanie jednorodnej mieszaniny lizatu próbki i roztworu wiążącego w dołku nr 1 kartridża może skutkować zmniejszonym uzyskiem i czystością w końcowym eluacie.

5.E. Przygotowanie lizatów z próbek tkanek

Wydajność przetwarzania próbek

Łączny uzysk genomowego DNA z próbek tkanek zależy od masy i typu przetwarzanych tkanek. W przypadku próbek tkanek można stosować zakres objętości próbek wynoszący 5–50 mg. Podczas opracowywania próbki tkanek serca, trzustki, mózgu i gruczołu sutkowego oceniono jako przykłady i wykazano, że zapewniają one akceptowalną wydajność. Więcej typów tkanek może być zgodnych z substancjami chemicznymi do ekstrakcji, lecz powinny one zostać poddane ocenie przez laboratorium w zakresie wydajności ekstrakcji i zgodności z dalszymi oznaczeniami.

W przypadku próbek tkanek można stosować zakres objętości elucji wynoszący 50–200 µl. Objętość bufora do elucji do zastosowania zależy od masy i typu przetwarzanych tkanek. Laboratoria powinny poddać ocenie objętości elucji, które zapewniają akceptowalną wydajność w dalszych oznaczeniach w zakresie masy i typów przetwarzanych próbek.

Uwaga: Zestaw ten przetestowano na próbkach tkanek przechowywanych w stanie zamrożonym (przechowywanych w temperaturze –65°C lub niższej) przed rozpoczęciem oczyszczania DNA. Inne warunki przechowywania próbek mogą zapewnić akceptowalną wydajność, lecz powinny zostać poddane ocenie przez laboratorium. Zamrożone próbki należy całkowicie rozmrozić przed rozpoczęciem przetwarzania.

1. Aby poddać lizie próbki tkanek, ustawić temperaturę suchego bloku grzejnego, łaźni wodnej lub mieszadła termicznego na 56°C. Przygotować i oznaczyć probówki do inkubacji, które zostaną umieszczone w określonym urządzeniu do ogrzewania.
2. Przenieść 5–50 mg tkanki do każdej probówki. Pocięcie tkanki na mniejsze fragmenty może skrócić czas lizy. Odwirowywać probówkę z najwyższą szybkością przez 15 sekund, aby pobrać kawałki tkanki z dna probówki.
3. Dodać 300 µl wody wolnej od nukleaz (Cat.# MC1191 lub odpowiednik) do każdej probówki do inkubacji.
4. Dodać 30 µl roztworu proteiny K (PK) do każdej probówki do inkubacji. Zmieniać końcówki pipet po każdym dozowaniu roztworu proteiny (PK), aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu.
5. Zatknąć i wytrząsać każdą probówkę z maksymalną szybkością przez 10 sekund na wytrząsarce typu vortex.
6. Dodać 300 µl wzmacniacza litycznego (LE2) do każdej probówki do inkubacji. Zmieniać końcówki pipet po każdym dozowaniu wzmacniacza litycznego (LE2), aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu.
7. Zatknąć i wytrząsać każdą probówkę z maksymalną szybkością przez 10 sekund na wytrząsarce typu vortex.
8. Inkubować każdą probówkę w temperaturze 56°C za pomocą jednej z poniższych opcji:
 - a. Korzystając z mieszadła termicznego, mieszać z wysoką szybkością (np. 1500 obr./min) przez maksymalnie 2 godziny.
 - b. Korzystając z suchego bloku grzejnego lub łaźni wodnej, stosować bez potrząsania przez co najmniej 16 godzin.
9. Wytrząsać każdą probówkę z maksymalną szybkością przez 10 sekund na wytrząsarce typu vortex.
10. Odwirowywać każdą probówkę w mikrowirówce z maksymalną szybkością przez 5 minut, aby uzyskać osad z nieprzetworzonego materiału.

11. Przenieść cały supernatant z każdej próbówki do inkubacji do nowej próbówki. Unikać przenoszenia osadzonego materiału. Jeśli po odwirowaniu na górze próbki znajduje się widoczna tłusta warstwa, nie należy przenosić tej warstwy do nowej próbówki.
12. Dodać 300 µl buforu lizującego do każdej próbówki. Zmieniać końcówki pipet po każdym dozowaniu buforu lizującego, aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu.
13. Zatknąć i wytrząsać każdą próbówkę z maksymalną szybkością przez 10 sekund na wytrząsarce typu vortex.
14. Przygotować kartridże zgodnie z instrukcjami przedstawionymi w rozdziale 5.G.
15. Przenieść próbkę lizatu tkanek z każdej próbówki do dołka nr 1 oddzielnego kartridża i odpowiednio wymieszać z roztworem wiążącym w dołku nr 1 poprzez aspirację i 10 dozowań po przeniesieniu w celu uzyskania jednorodnej mieszaniny (dołek nr 1 to największy dołek w kartridżu). Wymienić końcówki pipet po przeniesieniu każdej próbki w celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego próbki.

Uwagi:

- a. Przeniesienie osadu tkanek lub tłustej warstwy z próbówki do inkubacji do nowej próbówki może skutkować niskim poziomem uzysku lub czystości.
- b. Nieuzyskanie jednorodnej mieszaniny lizatu próbki i roztworu wiążącego w dołku nr 1 kartridża może skutkować zmniejszonym uzyskiem i czystością w końcowym eluacie.

5.F. Przygotowanie lizatów z próbek wymazów policzkowych**Wydajność przetwarzania próbek**

Łączny uzysk genomowego DNA z próbek wymazów policzkowych zależy od skuteczności przenoszenia komórek policzkowych na patyczek. Podczas opracowywania przetestowano 1 i 2 wymazy policzkowe i wykazano, że zapewniają one akceptowalną wydajność. W przypadku próbek wymazów policzkowych można stosować zakres objętości elucji wynoszący 50–200 µl. Laboratoria powinny wybrać objętość elucji dla próbek wymazów policzkowych, która zapewnia wystarczającą czystość i stężenie w zakresie dalszego oznaczania.

Uwaga: Zestaw ten przetestowano na suchych próbkach wymazów policzkowych przechowywanych w temperaturze 15–30°C przed rozpoczęciem oczyszczania DNA. Inne warunki przechowywania próbek mogą zapewnić akceptowalną wydajność, lecz powinny zostać poddane ocenie przez laboratorium.

1. Przygotować i oznaczyć próbówki do inkubacji o pojemności 1,5–2,0 ml, które zostaną umieszczone w bloku grzejmym ustawionym na temperaturę 56°C.
2. **Opcjonalnie:** Umieścić kolumnę czyszczącą (Cat.# Z3871) w każdej próbówce do inkubacji.
3. Umieścić 1–2 główki patyczka w każdej próbówce do inkubacji lub kolumnie czyszczącej znajdującej się w każdej próbówce do inkubacji. Odłączyć patyczek od główek z wymazami policzkowymi, odcinając lub odłamując go nad główką z wymazem, aby umożliwić założenie zatyczki na próbówkę lub kolumnę czyszczącą zawierającą główkę z wymazem.

5.F. Przygotowanie lizatów z próbek wymazów policzkowych (ciąg dalszy)

4. W oddzielnej probówce połączyć 300 µl wzmacniacza litycznego (LE2) z 30 µl roztworu proteiny K (PK) dla każdej próbki i jednej dodatkowej próbki. Patrz tabela poniżej. Na przykład, aby przetworzyć 16 próbek, utworzyć mieszaninę Master Mix w zakresie 17 reakcji, łącząc $300 \mu\text{l} \times 17 = 5100 \mu\text{l}$ wzmacniacza litycznego (LE2) i $30 \mu\text{l} \times 17 = 510 \mu\text{l}$ roztworu proteiny K.

Odczynnik	Ilość na reakcję	Reakcje (Numer próbki + 1)	Łącznie
Wzmacniacz lityczny (LE2)	300 µl	n + 1	$300 \times (n + 1) \mu\text{l}$
Roztwór proteiny K (PK)	30 µl	n + 1	$30 \times (n + 1) \mu\text{l}$

5. Wymieszać wzmacniacz lityczny (LE2)/proteinę K (PK) poprzez odwrócenie próbki co najmniej 10 razy.
6. Dodać 330 µl wzmacniacza litycznego (LE2)/proteiny K (PK) do każdej próbki i zamknąć probówkę. Zmieniać końcówki pipet po każdym dozowaniu wzmacniacza litycznego (LE2)/proteiny (PK), aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu.
7. Inkubować każdą probówkę w temperaturze 56°C przez 20 minut. Podczas inkubacji przygotować kartridże w sposób opisany w rozdziale 5.G.
8. Użyć jednego z poniższych sposobów na usunięcie główek z wymazami z próbki:
 - a. Jeśli używana jest kolumna czyszcząca, umieścić probówkę w mikrowirówce i wirować ją z maksymalną szybkością przez 2 minuty. Wyjąć probówkę z mikrowirówki. Otworzyć probówkę, a następnie wyjąć i zutylizować kolumnę czyszcząca zawierającą główki z wymazami.
 - b. Jeśli kolumna czyszcząca nie jest używana, użyć pęsety, aby wyjąć główki z wymazami z próbki, ostrożnie ściskając pozostałości lizatu z główek z wymazami. Zutylizować główki z wymazami. Czyścić pęsetę i zmieniać rękawiczki pomiędzy usuwaniem poszczególnych główek z wymazami, aby nie dopuścić do zanieczyszczenia krzyżowego.
9. Dodać 300 µl buforu lizującego do dołka nr 1 każdego kartridża przeznaczonego do użycia (dołek nr 1 to największy dołek w kasecie).
10. Przenieść każdą próbkę lizatu z próbki do inkubacji do dołka nr 1 oddzielnego kartridża i odpowiednio wymieszać z buforem lizującym w dołku nr 1 poprzez aspirację i 5–10 dozowań po przeniesieniu w celu uzyskania jednorodnej mieszaniny (dołek nr 1 to największy dołek w kartridżu). Wymienić końcówki pipet po przeniesieniu każdej próbki w celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego próbki.

Uwaga: Nieuzyskanie jednorodnej mieszaniny lizatu próbki, buforu lizującego i roztworu wiążącego w dołku nr 1 kartridża może skutkować zmniejszonym uzyskiem i czystością w końcowym eluacie.

5.G. Przygotowanie kartridża Maxwell® CSC Genomic DNA Cartridge

1. Przed rozpoczęciem pracy z kartridżami, tłoczkami CSC/RSC Plunger i probówkami do elucji (0,5 ml) należy zmienić rękawiczki. Kartridże są ustawiane na stojakach na kartridże na zewnątrz urządzenia, a następnie stojaki na kartridże zawierające kartridże i próbki przenoszone do urządzenia w celu rozpoczęcia oczyszczania. Umieścić każdy kartridż na 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 zatrzasnął 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.



Przeostroga: Z kartridżami należy się obchodzić ostrożnie. Krawędzie zamknięcia kartridża mogą być ostre.

2. Dodać 15 µl roztworu RNazy A do dołka nr 3 kartridża Maxwell® CSC Cartridge (CSCQ).
3. Umieścić jeden tłoczek w dołku nr 8 każdego kartridża.
4. 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 Genomic DNA Kit. Inne probówki do elucji mogą nie być zgodne z urządzeniami Maxwell® CSC Instrument, co może wpłynąć na wynik oczyszczania DNA.

5. Na dnie każdej probówki do elucji umieścić 50–200 µl buforu do elucji.

Uwaga: Należy używać wyłącznie buforu do elucji dostarczonego w zestawie Maxwell® CSC Genomic DNA Kit. Stosowanie innych buforów do elucji może wpłynąć na wynik oczyszczania DNA.

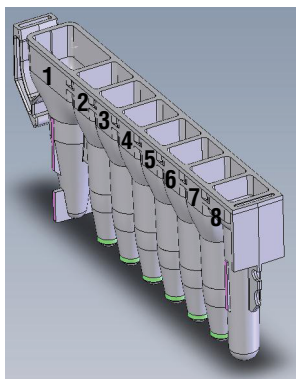
6. Przejść do rozdziału 6 — Przebieg pracy urządzenia Maxwell® Instrument.

5.G. Przygotowanie kartridża Maxwell® CSC Genomic DNA Cartridge (ciąg dalszy)

Uwagi dotyczące przygotowania kartridży Maxwell® CSC Genomic DNA Cartridge:



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.



Użytkownik dodaje do dołków

1. Próbką poddana lizie
3. 15 µl roztworu RNazy A
8. Tłoczek CSC/RSC Plunger

Rysunek 1. Kartridż Maxwell® CSC Cartridge. Próbką poddana lizie jest dodawana do dołka nr 1, 15 µl roztworu RNazy A jest dodawane do dołka nr 3, a tłoczek jest wprowadzany do dołka nr 8.



Rysunek 2. Ustawianie i konfiguracja stojaków na kartridże. Bufor do elucji jest dodawany do próbek do elucji we wskazany sposób. Przedstawiony stojak na kartridże pochodzi z urządzenia Maxwell® CSC Instrument (Cat.# AS6000).

6. Przebieg pracy urządzenia Maxwell® Instrument

Więcej informacji znajduje się w instrukcji technicznej określonego urządzenia Maxwell® CSC Instrument. Patrz Tabela 1.

1. Włączyć urządzenie Maxwell® Instrument i tablet. Zalogować 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. Dotknąć opcji **Start** na ekranie głównym.
3. Zeskanować lub wprowadzić kod kreskowy znajdujący się w prawym górnym rogu etykiety zestawu Maxwell® CSC Genomic DNA Kit i nacisnąć przycisk **OK**, aby automatycznie wybrać metodę, która zostanie zastosowana (Rysunek 3).

Uwaga: Kod kreskowy metody zestawu Maxwell® CSC Genomic DNA Kit jest wymagany do przeprowadzenia oczyszczania DNA przy użyciu urządzeń Maxwell® CSC Instrument. 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. Kod kreskowy do zeskanowania, służący do uruchomienia cyklu oczyszczania, znajduje się w czerwonej ramce, w prawym górnym rogu etykiety zestawu.

4. Na ekranie „Konfiguracja kasety” sprawdzić, czy metoda Maxwell® CSC Genomic DNA jest wyświetlana na górze ekranu. 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 w przypadku odpowiedniego stojaka na kartridże.

6. Przebieg pracy urządzenia Maxwell® Instrument (ciąg dalszy)

5. Po otwarciu drzwi potwierdzić, czy wykonano wszystkie czynności z listy kontrolnej ekstrakcji. Sprawdzić, czy próbki zostały dodane do dołka 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 dołku nr 8. Przenieść stojak na kartridże zawierającą przygotowane kartridże na platformę urządzenia Maxwell® Instrument.

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® Instrument w taki sposób, że próbki do elucji znajdują się możliwie jak najbliżej drzwi. Przesunąć 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. Nacisnąć przycisk **Start**, aby rozpocząć przebieg ekstrakcji. Platforma zostanie wsunięta, a drzwi zostaną zamknięte.



Ostrzeżenie: Niebezpieczeństwo zmiążdżenia.

Uwaga: W przypadku korzystania z urządzenia Maxwell® Instrument z 48 pozycjami i włączenia systemu wizualizacji skanowanie stojaków na kartridże rozpocznie się po wsunięciu platformy. Wszelkie błędy w konfiguracji stojaków na kartridże (np. tłoczki nieznajdujące się w dołku nr 8, brak otwartych próbek do elucji) spowoduje, że oprogramowanie powróci do ekranu „Konfiguracja kasety”, 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.

7. Urządzenie Maxwell® Instrument natychmiast rozpocznie cykl oczyszczania. Na ekranie będą wyświetlone wykonywane czynności oraz przybliżony czas pozostały do zakończenia przebiegu.

Uwagi:

- Dotknięcie przycisku **Przerwij** spowoduje przerwanie przebiegu. Wszystkie próbki z przerwane go przebiegu zostaną utracone.
 - 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 tłoczki znajdują się w dołku nr 8 kartridża po zakończeniu cyklu. 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. Wyjąć stojaki na kartridże z urządzenia natychmiast po zakończeniu cyklu, aby zapobiec odparowaniu eluatów. Wyjąć próbówki do elucji zawierające DNA i zatkać próbówki.

Uwaga: Po zakończeniu procedury automatycznego czyszczenia stojaki na kartridże będą nagrzane. Podczas zdejmowania stojaka na kartridże z platformy urządzenia należy chwycić ją za krawędzie.

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

11. Wyjąć kartridże i tłoczki ze stojaków na kartridże Maxwell®. Zutyliżować je jako odpady niebezpieczne zgodnie z procedurami obowiązującymi w instytucji. Nie wolno ponownie używać kartridży Maxwell® CSC Cartridge, tłoczków CSC/RSC Plunger ani próbówek do elucji.



7. Czynności po zakończeniu czyszczenia

Ustalić, czy uzysk i czystość próbki oczyszczonego DNA spełniają wymogi wejściowe dla odpowiedniego dalszego oznaczenia na potrzeby diagnostyki przed ich wykorzystaniem w tym oznaczeniu.

8. Ocena wydajności analitycznej

Ocena wydajności analitycznej została przeprowadzona z wykorzystaniem próbek ludzkich, zestawu Maxwell® CSC Genomic DNA Kit i urządzeń Maxwell® CSC Instrument.

8.A. Uzysk DNA

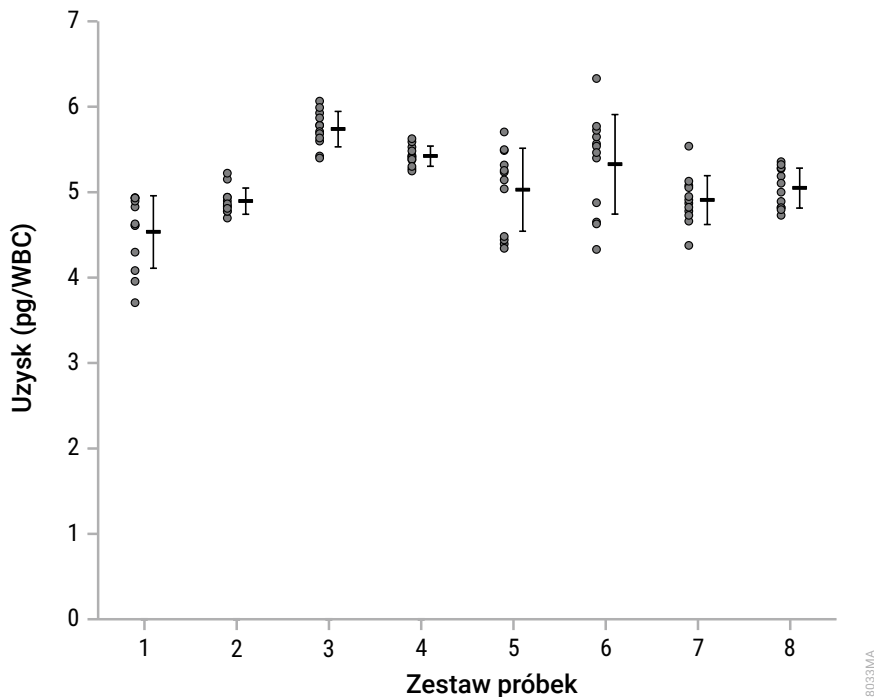
Uzysk DNA oceniono za pomocą DNA oczyszczonego przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Genomic DNA Kit na świeżych i zamrożonych próbkach krwi pełnej pobranych do próbówek z solą EDTA; zamrożonych próbkach krwi pełnej pobranych do próbówek z cytrynianem i heparyną; świeżych i zamrożonych próbkach kożuszka krwi uzyskanych z krwi pełnej i pobranych do próbówek z solą EDTA; zamrożonych próbkach kożuszka krwi uzyskanych z krwi pełnej i pobranych do próbówek z cytrynianem i heparyną; jednym i dwóch wymazach policzkowych wstępnie przetworzonych za pomocą kolumny czyszczącej; próbkach tkanek serca, trzustki i mózgu; próbkach komórek hodowli tkankowej i zamrożonych zaaspirowanych próbkach szpiku kostnego pobranych do próbówek z solą EDTA, cytrynianem i heparyną.

Wykresy i tabela w tym rozdziale odzwierciedlają uzysk absorbancji każdej repliki, która została oczyszczona dla danego typu próbki. Po lewej stronie każda kropka na wykresach odzwierciedla pojedynczy pomiar, a średnia z odchyleniem standardowym jest przedstawiona po prawej stronie. Każdy zestaw danych zawiera łącznie 12 replik, cztery repliki oczyszczone za pomocą urządzenia Maxwell® CSC Instrument i osiem replik oczyszczonych przy użyciu urządzenia Maxwell® CSC 48 Instrument.

Tabele poniżej podpisów do rysunków zawierają opis informacji o próbkach dla każdego zestawu próbek przedstawionego na powiązanych wykresach.

8.A. Uzysk DNA (ciąg dalszy)

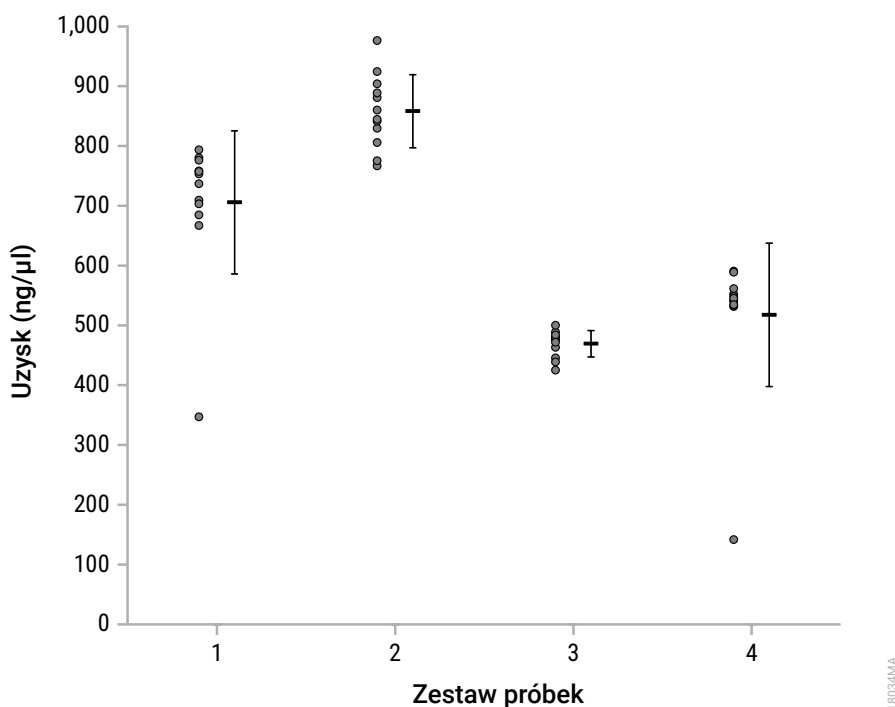
Krew pełna



Rysunek 4. Uzysk DNA z próbek krwi pełnej. W przypadku 300 μ l świeżych i zamrożonych próbek krwi pełnej, które pobrano do probówek z solą EDTA, i zamrożonych próbek krwi pełnej, które pobrano do probówek z cytrynianem i heparyną, średni uzysk DNA mieścił się w zakresie 4,5–5,7 pg/WBC.

Zestaw próbek	Antykoagulant	Przechowywanie	Wartość wejściowa (μ l)	Objętość elucji (μ l)
1	Sól EDTA	Zamrożone	300	50
2	Sól EDTA	Zamrożone	300	200
3	Sól EDTA	Świeże	300	50
4	Sól EDTA	Świeże	300	200
5	Cytrynian	Zamrożone	300	50
6	Cytrynian	Zamrożone	300	200
7	Heparyna	Zamrożone	300	50
8	Heparyna	Zamrożone	300	200

Kożuszek krwi

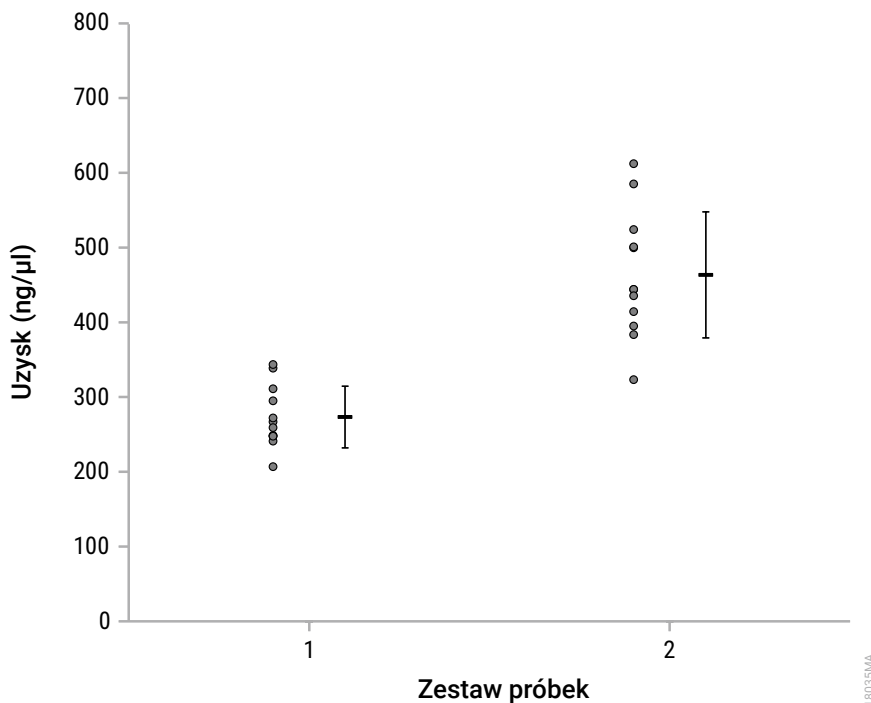


Rysunek 5. Uzysk DNA z próbek kożuszka krwi. W przypadku objętości wejściowej próbek 300 μl i objętości elucji 200 μl w zakresie świeżych i zamrożonych próbek kożuszka krwi, uzyskanych z krwi pełnej i pobranych do probówek z solą EDTA, oraz zamrożonych próbek kożuszka krwi, uzyskanych z krwi pełnej i pobranych do probówek z cytrynianem i heparyną, średnie stężenia DNA mieściły się w zakresie wynoszącym 469,3–858,2 ng/μl.

Zestaw próbek	Antykoagulant	Przechowywanie	Wartość wejściowa (μl)	Objętość elucji (μl)
1	Sól EDTA	Zamrożone	300	200
2	Sól EDTA	Świeże	300	200
3	Cytrynian	Zamrożone	300	200
4	Heparyna	Zamrożone	300	200

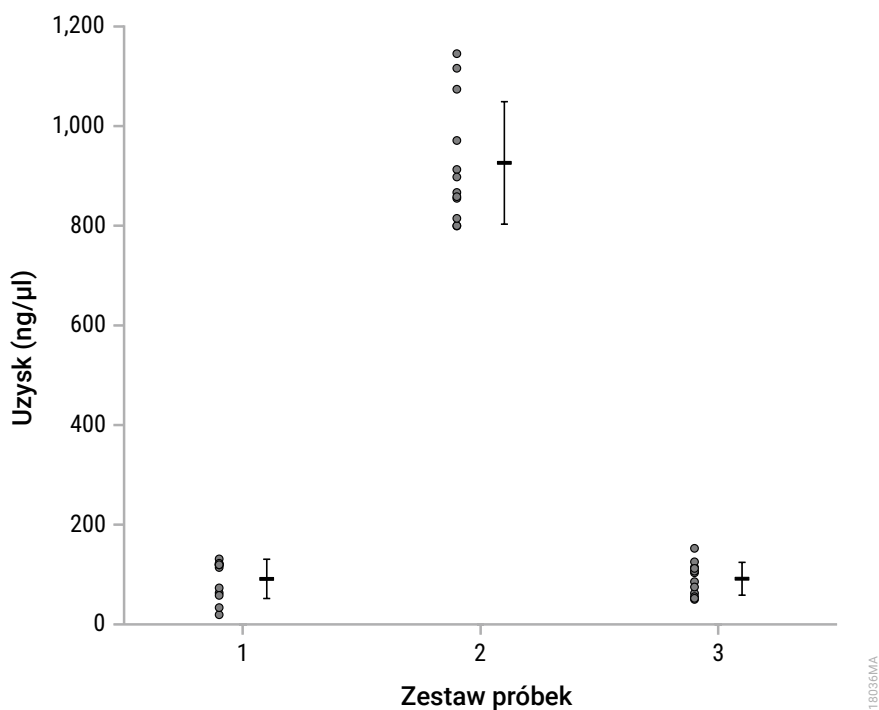
8.A. Uzysk DNA (ciąg dalszy)

Wymaz policzkowy



Rysunek 6. Uzysk DNA z próbek wymazów policzkowych. W przypadku jednego i dwóch wejściowych wymazów policzkowych, które wstępnie przetworzono za pomocą kolumny czyszczącej, średnie stężenia DNA mieściły się w zakresie wynoszącym 273,2–463,5 ng/μl. Zestaw próbek 1 odnosi się do jednego wymazu, a zestaw próbek 2 odnosi się do dwóch wymazów. W przypadku wszystkich próbek zastosowano objętość elucji wynoszącą 50 μl.

Tkanki



Rysunek 7. Uzysk DNA z próbek tkanek. W przypadku tkanek serca, trzustki i mózgu o objętości 50 mg przy elucji o objętości 200 μl średnie stężenia DNA mieściły się w zakresie 91,2–926,0 ng/μl. Zestaw próbek 1 odnosi się do tkanek serca, zestaw próbek 2 odnosi się do tkanek trzustki, a zestaw próbek 3 odnosi się do tkanek mózgu.

8.A. Uzysk DNA (ciąg dalszy)

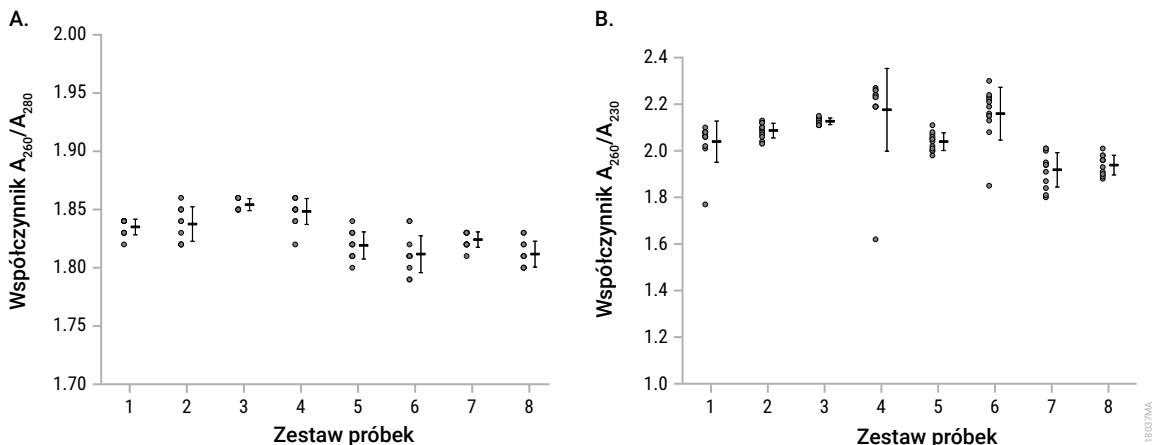
Komórki

W przypadku 5×10^6 komórek hodowli tkankowej HEK293 przy elucji o objętości 200 μl średnie stężenie DNA wynosiło 550,2 ng/ μl .

Typ komórek	Wejściowa liczba komórek	Objętość elucji	Stężenie (ng/ μl)
Komórki hodowli tkankowej HEK293	5×10^6	200 μl	523,4
			526,8
			536,1
			650,1
			481,6
			522,9
			530,4
			618,9
			546,5
			550,1
			569,9
545,4			
Średnia			550,2

8.B. Jakość DNA (czystość; ciąg dalszy)

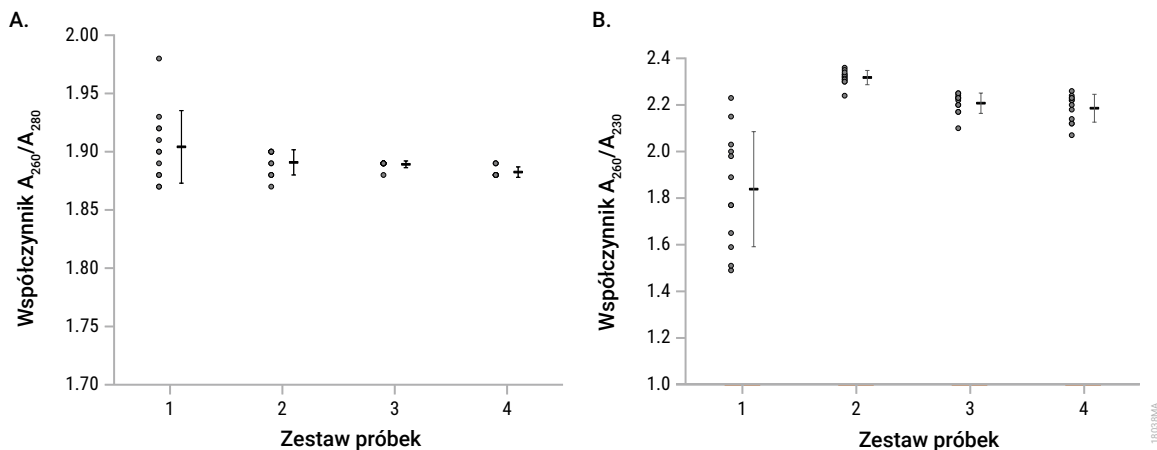
Krew pełna



Rysunek 9. Jakość DNA z próbek krwi pełnej. W przypadku 300 μ l świeżych i zamrożonych próbek krwi pełnej, pobranych do probówek z solą EDTA, i zamrożonych próbek krwi pełnej, pobranych do probówek z cytrynianem i heparyną, średnie współczynniki A_{260}/A_{280} mieściły się w zakresie wynoszącym 1,8–1,9 (**Panel A**), a średnie współczynniki A_{260}/A_{230} mieściły się w zakresie wynoszącym 1,9–2,2 (**Panel B**).

Zestaw próbek	Antykoagulant	Przechowywanie	Wartość wejściowa (μ l)	Objętość elucji (μ l)
1	Sól EDTA	Zamrożone	300	50
2	Sól EDTA	Zamrożone	300	200
3	Sól EDTA	Świeże	300	50
4	Sól EDTA	Świeże	300	200
5	Cytrynian	Zamrożone	300	50
6	Cytrynian	Zamrożone	300	200
7	Heparyna	Zamrożone	300	50
8	Heparyna	Zamrożone	300	200

Kożuszek krwi

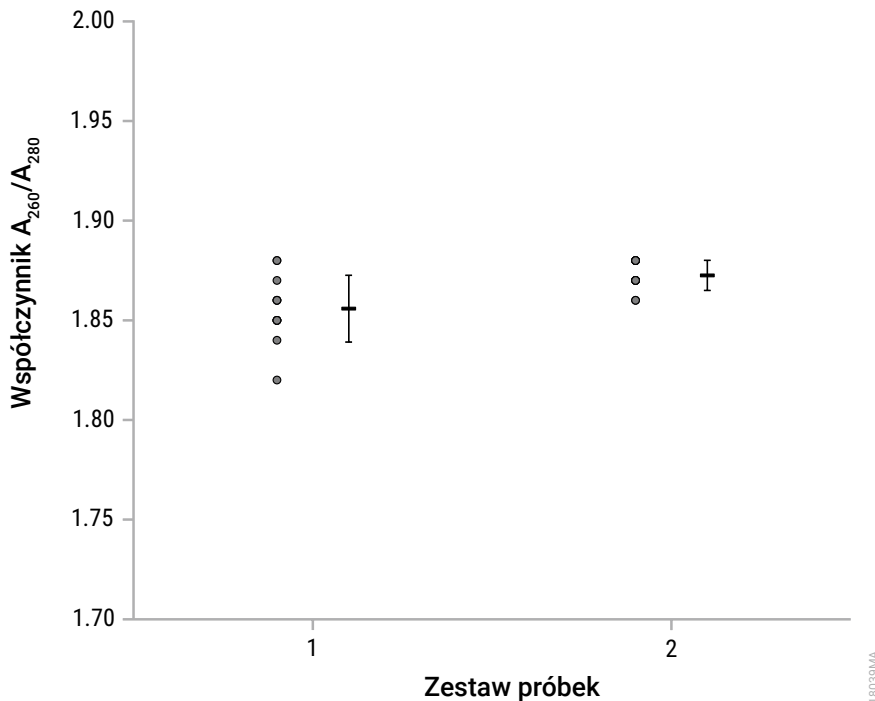


Rysunek 10. Jakość DNA z próbek kożuszka krwi. W przypadku objętości wejściowej próbek 300 µl i objętości elucji 200 µl w zakresie świeżych i zamrożonych próbek kożuszka krwi, wytworzonych na bazie krwi pełnej i pobranych do probówek z solą EDTA, i zamrożonych próbek kożuszka krwi, wytworzonych na bazie krwi pełnej i pobranych do probówek z cytrynianem i heparyną, średnie współczynniki A_{260}/A_{280} wynosiły około 1,9 (**Panel A**), a średnie współczynniki A_{260}/A_{230} mieściły się w zakresie wynoszącym 1,8–2,3 (**Panel B**).

Zestaw próbek	Antykoagulant	Przechowywanie	Wartość wejściowa (µl)	Objętość elucji (µl)
1	Sól EDTA	Zamrożone	300	200
2	Sól EDTA	Świeże	300	200
3	Cytrynian	Zamrożone	300	200
4	Heparyna	Zamrożone	300	200

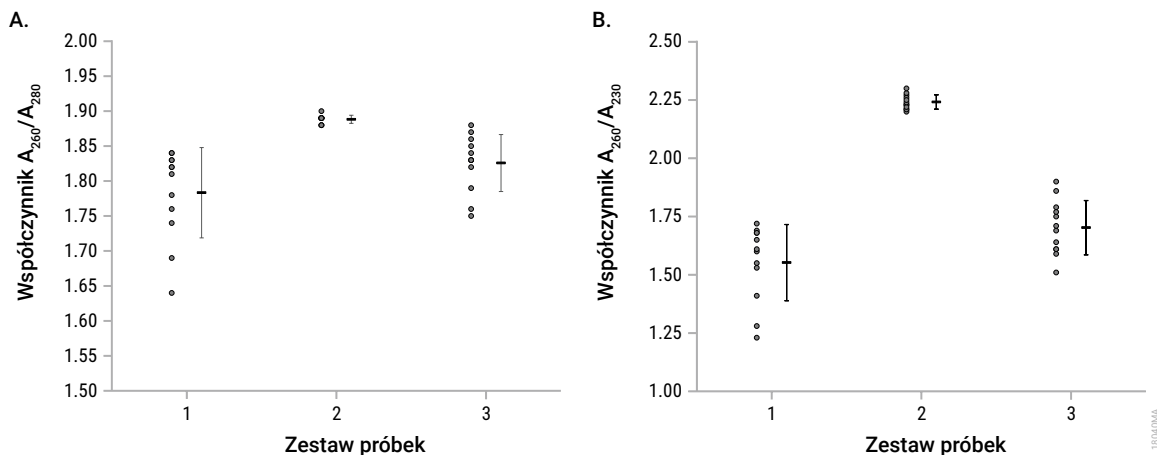
8.B. Jakość DNA (czystość; ciąg dalszy)

Wymaz policzkowy



Rysunek 11. Jakość DNA z próbek wymazów policzkowych. W przypadku jednego i dwóch wejściowych wymazów policzkowych, wstępnie przetworzonych za pomocą kolumny czyszczącej, i objętości elucji 50 μ l, średnie współczynniki A_{260}/A_{280} mieściły się w zakresie 1,8–1,9. Na wykresie zestaw próbek 1 odnosi się do jednego wymazu, a zestaw próbek 2 odnosi się do dwóch wymazów.

Tkanki



Rysunek 12. Jakość DNA z próbek tkanek. W przypadku 50 mg próbek tkanek serca, trzustki i mózgu oraz objętości elucji 200 μ l średnie współczynniki A_{260}/A_{280} mieściły się w zakresie wynoszącym 1,7–1,9 (**Panel A**), a średnie współczynniki A_{260}/A_{230} mieściły się w zakresie wynoszącym 1,5–2,3 (**Panel B**). Na wykresie zestaw próbek 1 odnosi się do tkanek serca, zestaw próbek 2 odnosi się do tkanek trzustki, a zestaw próbek 3 odnosi się do tkanek mózgu.

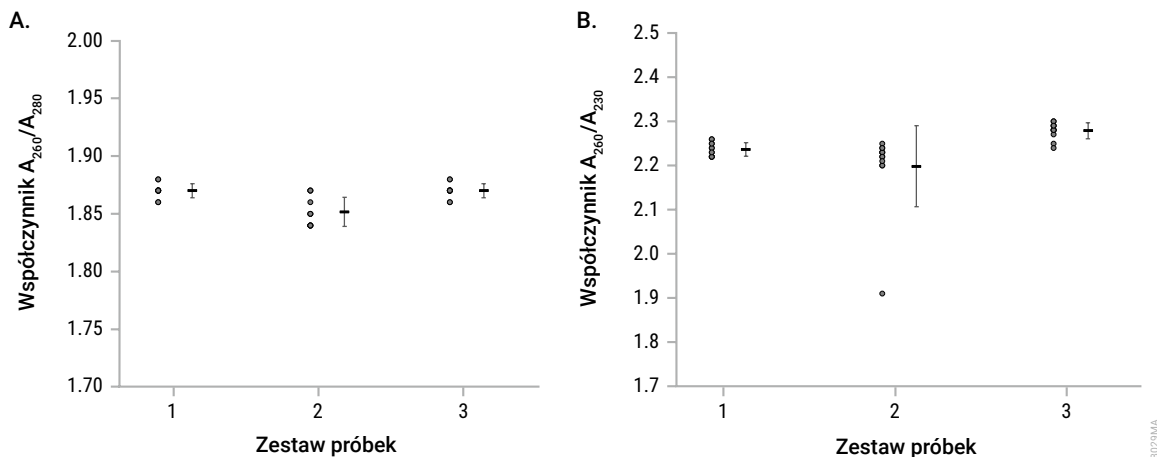
8.B. Jakość DNA (czystość; ciąg dalszy)

Komórki

W przypadku 5×10^6 komórek hodowli tkankowej HEK293 i objętości elucji 200 μ l średni współczynnik A_{260}/A_{280} wynosił 1,9, a średni współczynnik A_{260}/A_{230} wynosił 2,3.

Typ komórek	Wejściowa liczba komórek	Objętość elucji	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
Komórki hodowli tkankowej HEK293	5×10^6	200 μ l	1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,2
			1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,2
			1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,3
		Średnia	1,9	2,3

Szpiik kostny



Rysunek 13. Jakość DNA z próbek szpiku kostnego. W przypadku 300 μ l zaaspirowanych próbek szpiku kostnego, pobranych do probówek z solą EDTA, cytrynianem i heparyną, i objętości elucji 200 μ l średnie współczynniki A_{260}/A_{280} mieściły się w zakresie 1,8–1,9 (**Panel A**), a średnie współczynniki A_{260}/A_{230} mieściły się w zakresie 2,2–2,3 (**Panel B**). Na wykresie zestaw próbek 1 odnosi się do zaaspirowanych próbek pobranych do probówek z solą EDTA, zestaw próbek 2 odnosi się do zaaspirowanych próbek pobranych do probówek z cytrynianem, a zestaw próbek 3 odnosi się do zaaspirowanych próbek pobranych do probówek z heparyną.

8.C. Odtwarzalność

Aby ocenić dokładność w zakresie oczyszczania DNA w ramach każdego przebiegu ekstrakcji, DNA zostało oczyszczone z ośmiu replik o objętości 300 µl z pojedynczej próbki ludzkiej krwi pełnej w ramach trzech przebiegów w urządzeniu 1 i czterech replik o objętości 300 µl z pojedynczej próbki ludzkiej krwi pełnej w ramach trzech przebiegów w urządzeniu 2. Uzysk DNA został określony ilościowo poprzez absorbancję i współczynnik zmienności (wartość CV w procentach), a następnie obliczony dla każdego z trzech przebiegów w danym urządzeniu. Uzysk DNA z wykorzystaniem zestawu Maxwell® CSC Genomic DNA Kit był odtwarzalny w ramach każdego przebiegu przy wartości procentowej CV w obrębie przebiegu wynoszącej 6–9% dla urządzenia 1 i wartości procentowej CV w obrębie przebiegu wynoszącej 5–12% dla urządzenia 2.

Aby określić dokładność w zakresie oczyszczania DNA pomiędzy przebiegami ekstrakcji, DNA zostało oczyszczone z ośmiu replik o objętości 300 µl z pojedynczej próbki ludzkiej krwi pełnej w ramach trzech przebiegów w urządzeniu 1 i czterech replik o objętości 300 µl z pojedynczej próbki ludzkiej krwi pełnej w ramach trzech przebiegów w urządzeniu 2. Uzysk DNA został określony ilościowo poprzez absorbancję i współczynnik zmienności (wartość CV w procentach), a następnie obliczony dla każdej z wszystkich próbek z trzech przebiegów w danym urządzeniu. Uzysk DNA z wykorzystaniem zestawu Maxwell® CSC Genomic DNA Kit był odtwarzalny w zakresie przebiegów przy wartości procentowej CV między przebiegami wynoszącej 7% dla urządzenia 1 i wartości procentowej CV między przebiegami wynoszącej 8% dla urządzenia 2.

Urządzenie	Liczba przebiegów	Wartość procentowa CV w obrębie przebiegu	Wartość procentowa CV między przebiegami
1	1 (n = 8)	9%	7%
	2 (n = 8)	7%	
	3 (n = 8)	6%	
2	1 (n = 4)	12%	8%
	2 (n = 4)	7%	
	3 (n = 4)	5%	

8.D. Zdolność do amplifikacji

Zgodność z dalszą amplifikacją oceniono za pomocą DNA oczyszczonego przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Genomic DNA Kit na świeżych i zamrożonych próbkach krwi pełnej pobranych do probówek z solą EDTA, zamrożonych próbkach krwi pełnej pobranych do probówek z cytrynianem i heparyną, świeżych i zamrożonych próbkach kożuska krwi uzyskanych z krwi pełnej i pobranych do probówek z solą EDTA, zamrożonych próbkach kożuska krwi uzyskanych z krwi pełnej i pobranych do probówek z cytrynianem i heparyną, 1 i 2 wymazach policzkowych z i bez wstępnego przetwarzania za pomocą kolumny czyszczącej, próbkach tkanek serca, trzustki i mózgu, próbkach komórek hodowli tkankowej, płynu owodniowego, moczu i komórek jednojądrzastych krwi obwodowej oraz zaaspirowanych próbkach szpiku kostnego pobranych do probówek z solą EDTA, cytrynianem i heparyną.

Procedury oczyszczania DNA przeprowadzono dla każdego typu próbki o najwyższej i najniższej objętości wejściowej i objętości elucji. Komórki hodowli tkankowej i komórki jednojądrzaste krwi obwodowej również zostały uwzględnione w szeregu rozcieńczeń komórek.

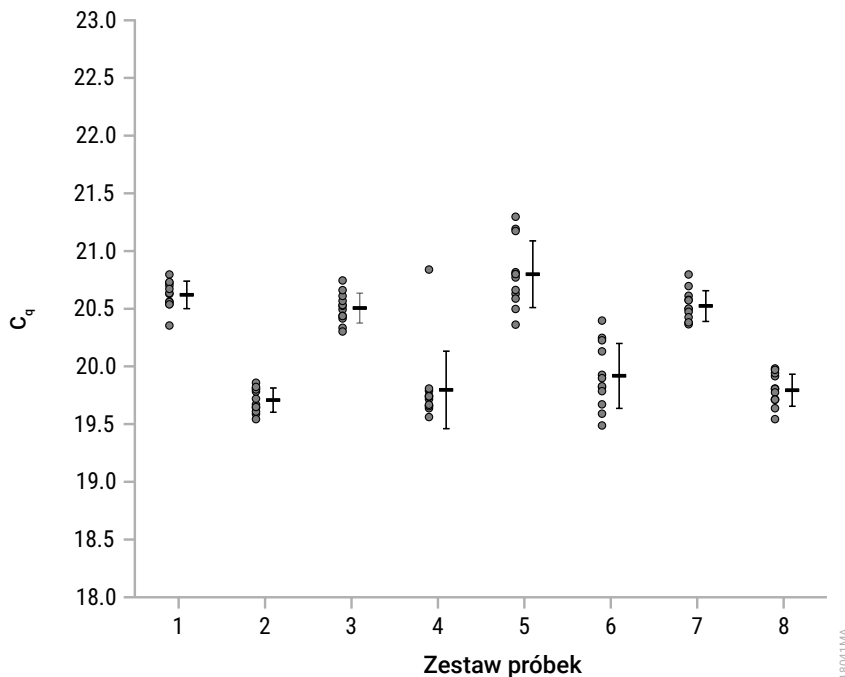
Uzyskane DNA ze wszystkich próbek zostało określono ilościowo poprzez absorbancję, rozcieńczone do stężenia mieszczącego się na standardowej krzywej qPCR, a następnie zamplifikowane za pomocą oznaczenia qPCR z zastosowaniem wartości docelowej 300 bp. Zgłaszana jest wartość C_q dla każdej próbki oczyszczonego DNA i średnia wartość C_q dla trzech replik wzorca ludzkiego genomowego DNA o objętości 0,0032 ng/μl dostarczonego z oznaczeniem qPCR.

Wykresy w tym rozdziale przedstawiają wartości C_q każdej repliki, która została oczyszczona dla danego typu próbki. Po lewej stronie każda kropka na wykresach odzwierciedla pojedynczy pomiar, a średnia z odchyleniem standardowym jest przedstawiona po prawej stronie. Każdy zestaw danych zawiera łącznie 12 replik, cztery repliki oczyszczone za pomocą urządzenia Maxwell® CSC Instrument i osiem replik oczyszczonych przy użyciu urządzenia Maxwell® CSC 48 Instrument.

Tabele poniżej podpisów do rysunków zawierają opis informacji o próbkach dla każdego zestawu próbek przedstawionego na powiązanych wykresach.

8.D. Zdolność do amplifikacji (ciąg dalszy)

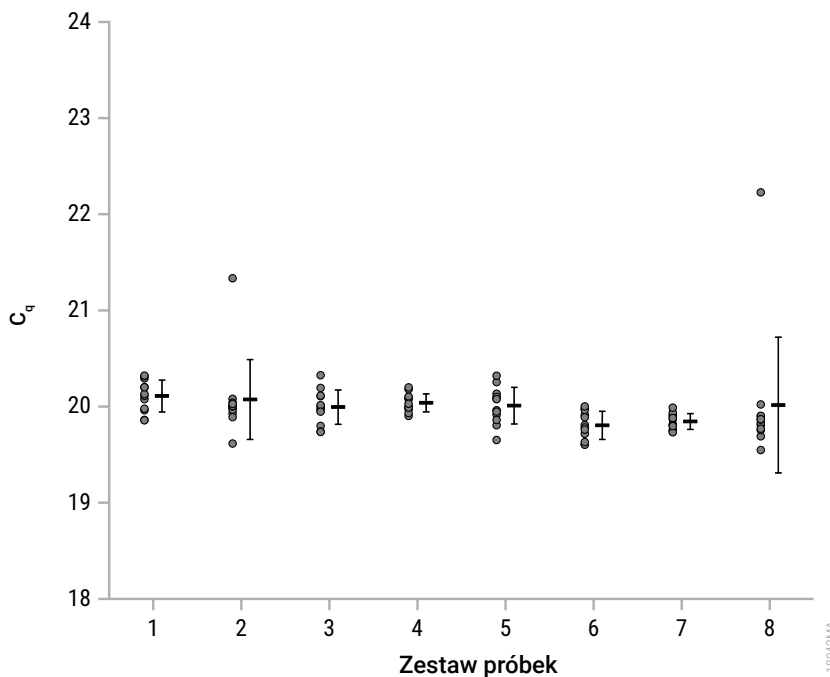
Krew pełna



Rysunek 14. Amplifikacja DNA z próbek krwi pełnej. W przypadku świeżych i zamrożonych próbek krwi pełnej, pobranych do probówek z solą EDTA, wartości C_t mieściły się w zakresie 19,54–20,80 cyklu i wszystkie były niższe niż średnia wartość C_t dla wzorca DNA o objętości 0,0032 ng/µl (33,11 cyklu). W przypadku zamrożonych próbek krwi pełnej, pobranych do probówek z cytrynianem i heparyną, wartości C_t mieściły się w zakresie 19,49–21,30 cyklu i wszystkie były niższe niż średnia wartość C_t dla wzorca DNA o objętości 0,0032 ng/µl (32,88 cyklu).

Zestaw próbek	Antykoagulant	Przechowywanie	Wartość wejściowa (µl)	Objętość elucji (µl)
1	Sól EDTA	Zamrożone	50	50
2	Sól EDTA	Zamrożone	300	200
3	Sól EDTA	Świeże	50	50
4	Sól EDTA	Świeże	300	200
5	Cytrynian	Zamrożone	50	50
6	Cytrynian	Zamrożone	300	200
7	Heparyna	Zamrożone	50	50
8	Heparyna	Zamrożone	300	200

Kożuszek krwi

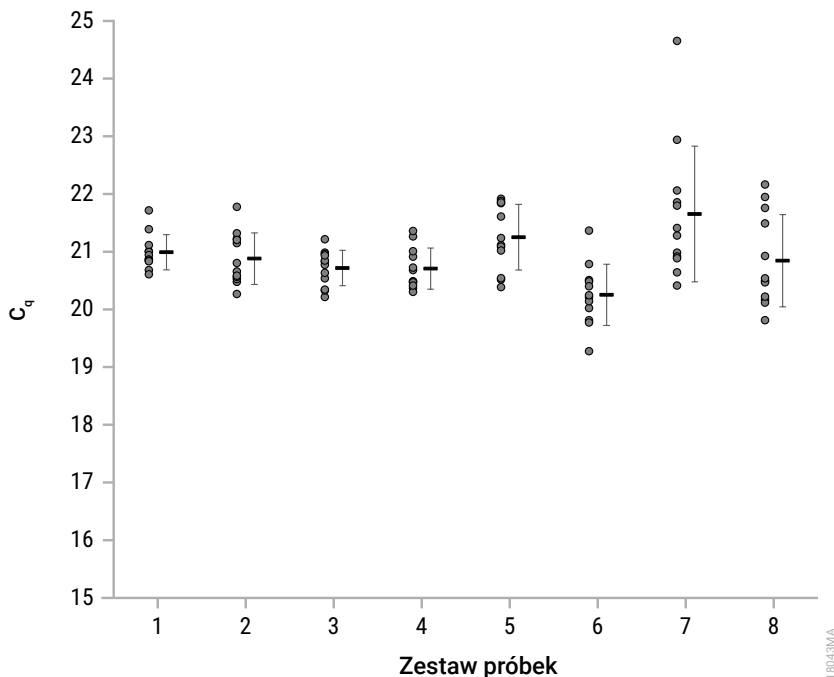


Rysunek 15. Amplifikacja DNA z próbek kożuszka krwi. W przypadku świeżych i zamrożonych próbek kożuszka krwi, pobranych do probówek z solą EDTA, wartości C_q mieściły się w zakresie 19,62–21,34 cyklu i wszystkie były niższe niż średnia wartość C_q dla wzorca DNA o objętości 0,0032 ng/µl (33,09 cyklu). W przypadku zamrożonych próbek kożuszka krwi, pobranych do probówek z cytrynianem i heparyną, wartości C_q mieściły się w zakresie 19,55–22,23 cyklu i wszystkie były niższe niż średnia wartość C_q dla wzorca DNA o objętości 0,0032 ng/µl (32,86 cyklu).

Zestaw próbek	Antykoagulant	Przechowywanie	Wartość wejściowa (µl)	Objętość elucji (µl)
1	Sól EDTA	Zamrożone	50	50
2	Sól EDTA	Zamrożone	300	200
3	Sól EDTA	Świeże	50	50
4	Sól EDTA	Świeże	300	200
5	Cytrynian	Zamrożone	50	50
6	Cytrynian	Zamrożone	300	200
7	Heparyna	Zamrożone	50	50
8	Heparyna	Zamrożone	300	200

8.D. Zdolność do amplifikacji (ciąg dalszy)

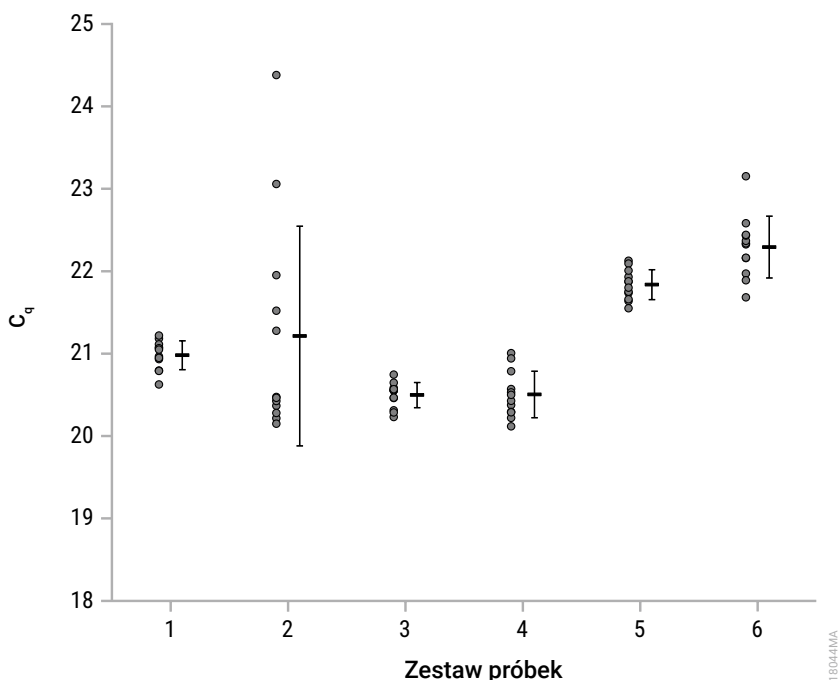
Wymaz policzkowy



Rysunek 16. Amplifikacja DNA z próbek wymazów policzkowych. W przypadku jednego i dwóch wymazów policzkowych, wstępnie przetworzonych za pomocą kolumny czyszczącej, wartości C_q mieściły się w zakresie 20,22–21,78 cyklu i wszystkie były niższe niż średnia wartość C_q dla wzorca DNA o objętości 0,0032 ng/ μ l (32,45 cyklu). W przypadku jednego i dwóch wejściowych wymazów policzkowych, wstępnie przetworzonych bez kolumny czyszczącej, wartości C_q mieściły się w zakresie 19,28–24,65 cyklu i wszystkie były niższe niż średnia wartość C_q dla wzorca DNA o objętości 0,0032 ng/ μ l (32,54 cyklu).

Zestaw próbek	Liczba wymazów	Wstępne przetwarzanie	Objętość elucji (μ l)
1	1 wymaz	Z kolumną czyszczącą	50
2	1 wymaz	Z kolumną czyszczącą	200
3	2 wymazy	Z kolumną czyszczącą	50
4	2 wymazy	Z kolumną czyszczącą	200
5	1 wymaz	Bez kolumny czyszczącej	50
6	1 wymaz	Bez kolumny czyszczącej	200
7	2 wymazy	Bez kolumny czyszczącej	50
8	2 wymazy	Bez kolumny czyszczącej	200

Tkanki

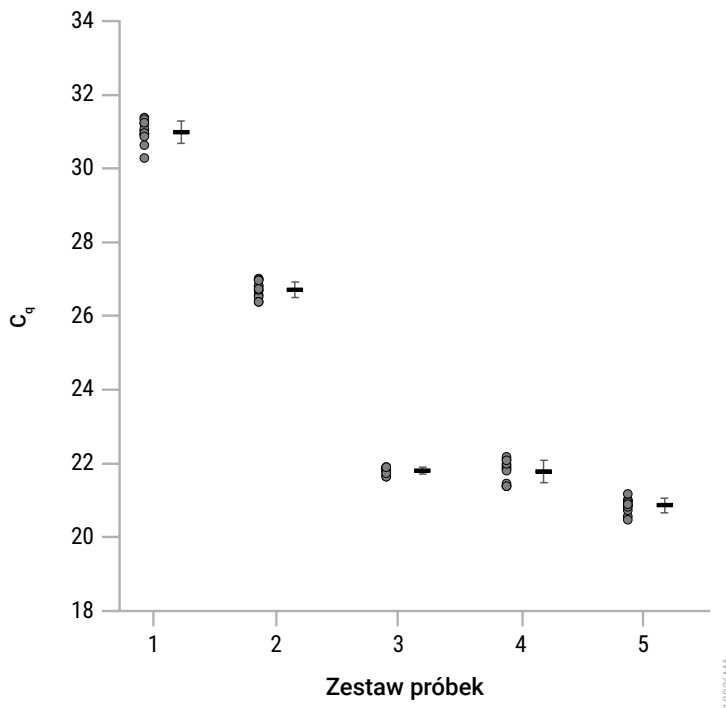


Rysunek 17. Amplifikacja DNA z próbek tkanek. W przypadku próbek tkanek serca i trzustki wartości C_q mieściły się w zakresie 20,12–24,38 cyklu i wszystkie były niższe niż średnia wartość C_q dla wzorca DNA o objętości 0,0032 ng/µl (32,98 cyklu). W przypadku próbek tkanek mózgu wartości C_q mieściły się w zakresie 21,55–23,15 cyklu i wszystkie były niższe niż średnia wartość C_q dla wzorca DNA o objętości 0,0032 ng/µl (33,68 cyklu).

Zestaw próbek	Typ tkanek	Ilość wejściowa (mg)	Objętość elucji (µl)
1	Serce	5	50
2	Serce	50	200
3	Trzustka	5	50
4	Trzustka	50	200
5	Mózg	5	50
6	Mózg	50	200

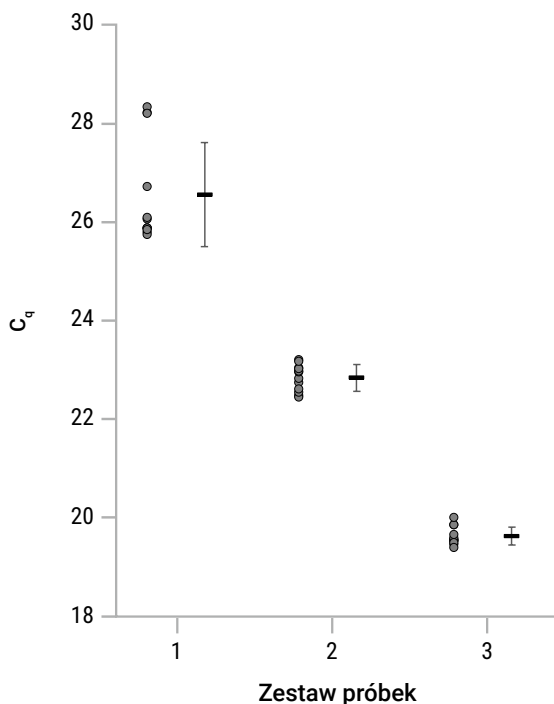
8.D. Zdolność do amplifikacji (ciąg dalszy)

Komórki



Rysunek 18. Amplifikacja DNA z komórek hodowli tkankowej. W przypadku szeregu rozcieńczeń komórek hodowli tkankowej HEK293 wartości C_q mieściły się w zakresie 20,48–31,38 cyklu i wszystkie były niższe niż średnia wartość C_q dla wzorca DNA o objętości 0,0032 ng/μl (33,04 cyklu).

Zestaw próbek	Typ komórek	Liczba komórek	Objętość elucji (μl)
1	Komórki hodowli tkankowej HEK293	5×10^2	50
2	Komórki hodowli tkankowej HEK293	5×10^3	50
3	Komórki hodowli tkankowej HEK293	5×10^4	50
4	Komórki hodowli tkankowej HEK293	5×10^5	200
5	Komórki hodowli tkankowej HEK293	5×10^6	200



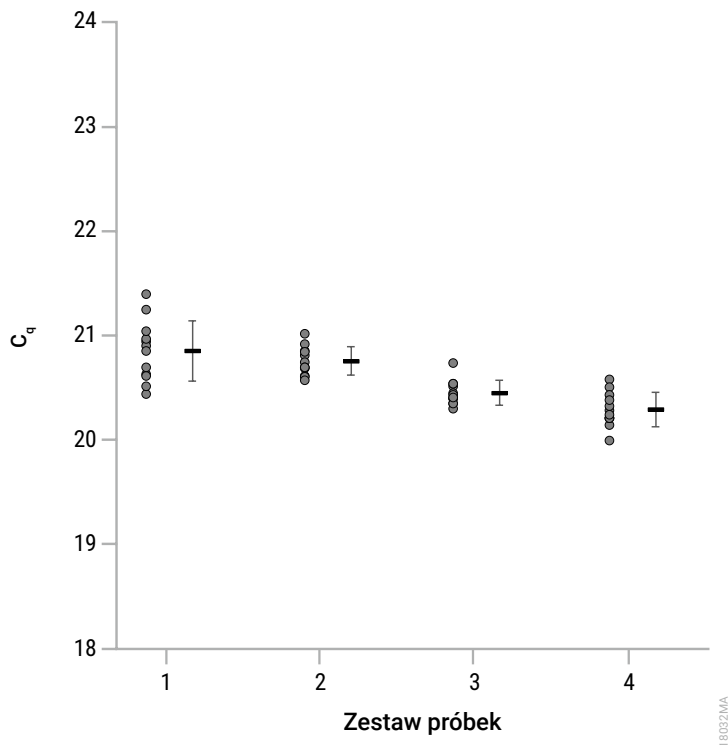
Rysunek 19. Amplifikacja DNA z próbek komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC).

W przypadku szeregu rozcieńczeń komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) wartości C_q mieściły się w zakresie 19,40–28,33 cyklu i wszystkie były niższe niż średnia wartość C_q dla wzorca DNA o objętości 0,0032 ng/ μ l (32,80 cyklu).

Zestaw próbek	Typ komórek	Liczba komórek	Objętość elucji (μ l)
1	Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC)	5×10^4	50
2	Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC)	5×10^5	100
3	Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC)	5×10^6	200

8.D. Zdolność do amplifikacji (ciąg dalszy)

Komórki (ciąg dalszy)



Rysunek 20. Amplifikacja DNA z próbek moczu i płynu owodniowego. W przypadku komórek pozyskanych z próbek moczu i płynu owodniowego wartości C_q mieściły się w zakresie 20,00–21,40 cyklu i wszystkie były niższe niż średnia wartość C_q dla wzorca DNA o objętości 0,0032 ng/µl (32,71 cyklu).

Zestaw próbek	Typ komórek	Objętość wejściowa (µl)	Objętość elucji (µl)
1	Mocz	15	50
2	Mocz	50	50
3	Płyn owodniowy	1	50
4	Płyn owodniowy	5	50

Szpik kostny



Rysunek 21. Amplifikacja DNA z próbek szpiku kostnego. W przypadku zamrożonych zaaspirowanych próbek szpiku kostnego, pobranych do probówek z solą EDTA i cytrynianem, wartości C_t mieściły się w zakresie 19,07–20,84 cyklu i wszystkie były niższe niż średnia wartość C_t dla wzorca DNA o objętości 0,0032 ng/µl (32,42 cyklu).

W przypadku zaaspirowanych próbek szpiku kostnego, pobranych do probówek z heparyną, wartości C_t mieściły się w zakresie 19,40–20,36 cyklu i wszystkie były niższe niż średnia wartość C_t dla wzorca DNA o objętości 0,0032 ng/µl (32,82 cyklu).

Zestaw próbek	Antykoagulant	Wartość wejściowa (µl)	Objętość elucji (µl)
1	Sól EDTA	50	50
2	Sól EDTA	300	200
3	Cytrynian	50	50
4	Cytrynian	300	200
5	Heparyna	50	50
6	Heparyna	300	200

8.E. Inhibicja (substancje zakłócające)

Inhibicję amplifikacji oceniono za pomocą DNA oczyszczonego przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Genomic DNA Kit na świeżych i zamrożonych próbkach krwi pełnej pobranych do probówek z solą EDTA, zamrożonych próbkach krwi pełnej pobranych do probówek z cytrynianem i heparyną, świeżych i zamrożonych próbkach kożuska krwi uzyskanych z krwi pełnej i pobranych do probówek z solą EDTA, zamrożonych próbkach kożuska krwi uzyskanych z krwi pełnej i pobranych do probówek z cytrynianem i heparyną, jednym i dwóch wymazach policzkowych z i bez wstępnego przetwarzania za pomocą kolumny czyszczącej, próbkach tkanek serca, trzustki i mózgu, próbkach komórek hodowli tkankowych, płynu owodniowego, moczu i komórek jednojądrzastych krwi obwodowej oraz zaaspirowanych próbkach szpiku kostnego pobranych do probówek z solą EDTA, cytrynianem i heparyną.

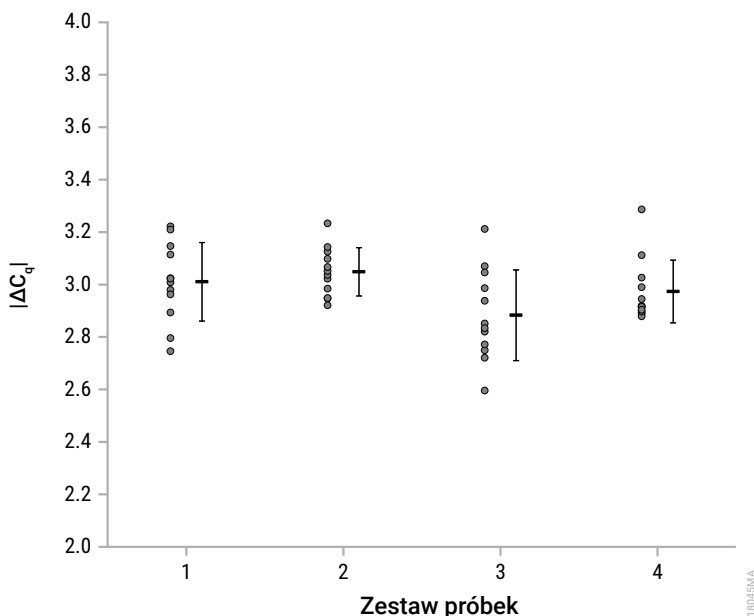
Procedury oczyszczania DNA przeprowadzono dla każdego typu próbki. Na potrzeby niniejszej analizy oceniono objętości wejściowe próbek i objętości elucji, w przypadku których wymagany byłby najmniejszy zakres rozcieńczenia dla próbek stosowanych w ramach oznaczenia qPCR.

DNA zostało określone ilościowo i rozcieńczone do stężenia mieszczącego się na standardowej krzywej qPCR, a następnie alikwota każdego DNA została dodatkowo rozcieńczona ośmiokrotnie. Początkowe rozcieńczenia DNA i ośmiokrotne rozcieńczenia zamplifikowano za pomocą oznaczenia qPCR. Raportowana jest różnica w zakresie wartości C_q ($|\Delta C_q|$) dla sekwencji docelowej 300 bp. Cykle $|\Delta C_q| 3 \pm 1$ świadczą o braku inhibicji amplifikacji DNA ze względu na endogenne i egzogenne substancje, które mogą występować w próbkach.

Wykresy w tym rozdziale przedstawiają wartości $|\Delta C_q|$ każdej repliki, która została oczyszczona dla danego typu próbki. Po lewej stronie każda kropka na wykresach odzwierciedla pojedynczy pomiar, a średnia z odchyleniem standardowym jest przedstawiona po prawej stronie. Każdy zestaw danych zawiera łącznie 12 replik, cztery repliki oczyszczone za pomocą urządzenia Maxwell® CSC Instrument i osiem replik oczyszczonych przy użyciu urządzenia Maxwell® CSC 48 Instrument.

Tabele poniżej podpisów do rysunków zawierają opis informacji o próbkach dla każdego zestawu próbek przedstawionego na powiązanych wykresach.

Krew pełna

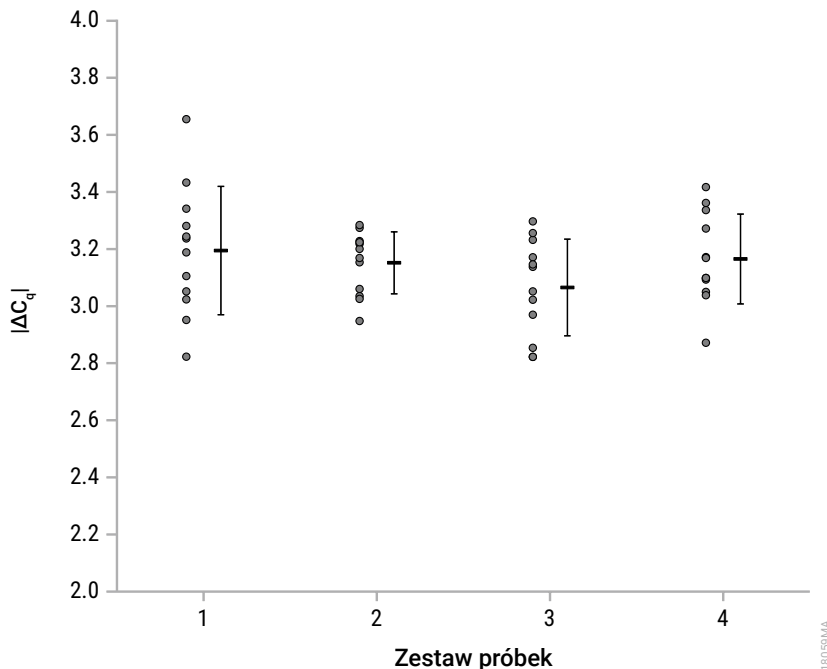


Rysunek 22. Test na inhibicję w zakresie amplifikacji DNA z próbek krwi pełnej. W przypadku świeżych i zamrożonych próbek krwi pełnej, pobranych do probówek z solą EDTA, wartości $|\Delta C_q|$ wynosiły najmniej 2,75 cyklu i najwięcej 3,23 cyklu. W przypadku zamrożonych próbek krwi pełnej, pobranych do probówek z cytrynianem i heparyną, wartości $|\Delta C_q|$ wynosiły najmniej 2,60 cyklu i najwięcej 3,29 cyklu.

Zestaw próbek	Antykoagulant	Przechowywanie	Wartość wejściowa (μ l)	Objętość elucji (μ l)
1	Sól EDTA	Zamrożone	50	50
2	Sól EDTA	Świeże	50	50
3	Cytrynian	Zamrożone	50	50
4	Heparyna	Zamrożone	50	50

8.E. Inhibicja (substancje zakłócające; ciąg dalszy)

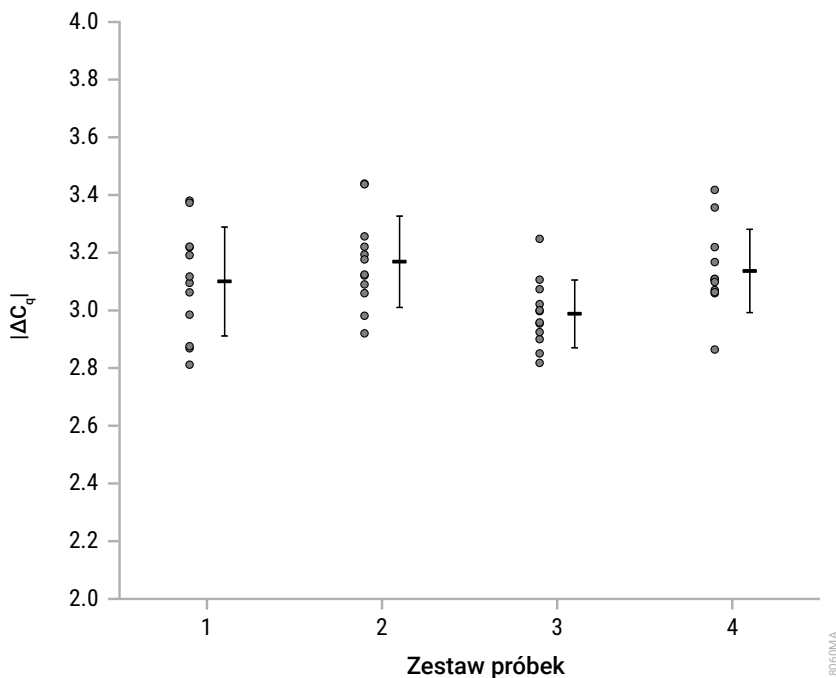
Kożuszek krwi



Rysunek 23. Test na inhibicję w zakresie amplifikacji DNA z próbek kożuszka krwi. W przypadku świeżych i zamrożonych próbek kożuszka krwi, wytworzonych z krwi pełnej i pobranych do probówek z solą EDTA, wartości $|\Delta C_q|$ wynosiły najmniej 2,82 cyklu i najwięcej 3,65 cyklu. W przypadku zamrożonych próbek kożuszka krwi, wytworzonych z krwi pełnej i pobranych do probówek z cytrynianem i heparyną, wartości $|\Delta C_q|$ wynosiły najmniej 2,82 cyklu i najwięcej 3,42 cyklu.

Zestaw próbek	Antykoagulant	Przechowywanie	Wartość wejściowa (µl)	Objętość elucji (µl)
1	Sól EDTA	Zamrożone	50	50
2	Sól EDTA	Świeże	50	50
3	Cytrynian	Zamrożone	50	50
4	Heparyna	Zamrożone	50	50

Wymaz policzkowy

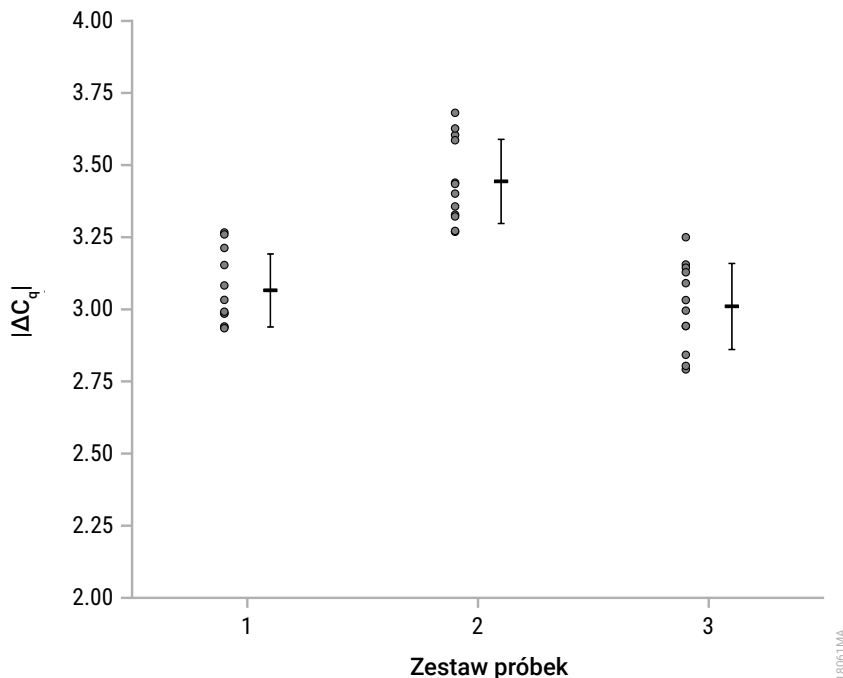


Rysunek 24. Test na inhibicję w zakresie amplifikacji DNA z wymazów policzkowych. W przypadku jednego lub dwóch wymazów policzkowych, wstępnie przetworzonych za pomocą kolumny czyszczącej, wartości $|\Delta C_q|$ wynosiły najmniej 2,81 cyklu i najwięcej 3,44 cyklu. W przypadku jednego lub dwóch wymazów policzkowych, wstępnie przetworzonych bez kolumny czyszczącej, wartości $|\Delta C_q|$ wynosiły najmniej 2,82 cyklu i najwięcej 3,42 cyklu.

Zestaw próbek	Liczba wymazów	Wstępne przetwarzanie	Objętość elucji (μl)
1	1 wymaz	Z kolumną czyszczącą	50
2	2 wymazy	Z kolumną czyszczącą	50
3	1 wymaz	Bez kolumny czyszczącej	50
4	2 wymazy	Bez kolumny czyszczącej	50

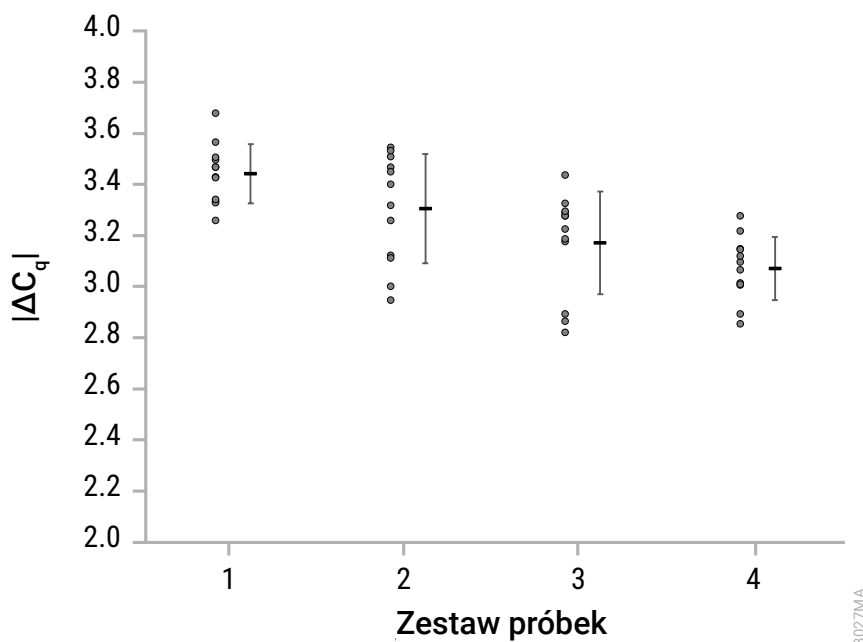
8.E. Inhibicja (substancje zakłócające; ciąg dalszy)

Tkanki



Rysunek 25. Test na inhibicję w zakresie amplifikacji DNA z próbek tkanek. W przypadku 5 mg próbek tkanek serca i trzustki wartości $|\Delta C_q|$ wynosiły najmniej 2,93 cyklu i najwięcej 3,68 cyklu. W przypadku 5 mg próbek tkanek mózgu wartości $|\Delta C_q|$ wynosiły najmniej 2,79 cyklu i najwięcej 3,25 cyklu. W przypadku wszystkich próbek zastosowano objętość elucji wynoszącą 50 μ l. Na wykresie zestaw próbek 1 odnosi się do tkanek serca, zestaw próbek 2 odnosi się do tkanek trzustki, a zestaw próbek 3 odnosi się do tkanek mózgu.

Komórki



Rysunek 26. Test na inhibicję w zakresie amplifikacji DNA z próbek komórek. W przypadku 5×10^4 komórek hodowli tkankowej HEK293 i objętości elucji 50 μ l wartości $|\Delta C_q|$ wynosiły najmniej 3,26 cyklu i najwięcej 3,68 cyklu. W przypadku 5×10^5 komórek jednojądrzastych krwi obwodowej i objętości elucji 100 μ l wartości $|\Delta C_q|$ wynosiły najmniej 2,95 cyklu i najwięcej 3,55 cyklu. W przypadku komórek pozyskanych z próbek moczu o objętości 50 ml i płynu owodniowego o objętości 5 ml oraz elucji o objętości 50 μ l wartości $|\Delta C_q|$ wynosiły najmniej 2,82 cyklu i najwięcej 3,44 cyklu.

Zestaw próbek	Typ komórek	Ilość wejściowa	Objętość elucji (μ l)
1	Komórki hodowli tkankowej HEK293	5×10^4 komórek	50
2	Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC)	5×10^5 komórek	100
3	Mocz	50 ml	50
4	Płyn owodniowy	5 ml	50

8.E. Inhibicja (substancje zakłócające; ciąg dalszy)

Szpik kostny



Rysunek 27. Test na inhibicję w zakresie amplifikacji DNA z próbek szpiku kostnego. W przypadku 50 μ l zaaspirowanych próbek szpiku kostnego, pobranych do probówek z solą EDTA i cytrynianem, wartości $|\Delta C_q|$ wynosiły najmniej 2,72 cyklu i najwięcej 3,22 cyklu. W przypadku 50 μ l zaaspirowanych próbek szpiku kostnego, pobranych do probówek z heparyną, wartości $|\Delta C_q|$ wynosiły najmniej 2,64 cyklu i najwięcej 3,22 cyklu. W przypadku wszystkich próbek zastosowano objętość elucji wynoszącą 50 μ l. Na wykresie zestaw próbek 1 odnosi się do zaaspirowanych próbek pobranych do probówek z solą EDTA, zestaw próbek 2 odnosi się do zaaspirowanych próbek pobranych do probówek z cytrynianem, a zestaw próbek 3 odnosi się do zaaspirowanych próbek pobranych do probówek z heparyną.

8.F. Zanieczyszczenie krzyżowe

Męskie (300 μ l) i żeńskie (50 μ l) próbki kożuszka krwi zostały przetworzone w naprzemiennych pozycjach blatowych urządzeń Maxwell[®], a uzyskane oczyszczone żeńskie DNA zostało zamplifikowane za pomocą wartości docelowej DNA z chromosomem Y w ramach oznaczenia qPCR. Występowanie tej wartości docelowej chromosomu Y w żeńskich próbkach zostało wykorzystane do zidentyfikowania potencjalnego zanieczyszczenia krzyżowego z sąsiednich próbek. Gdy żeńskie próbki kożuszka krwi były przetwarzane w pozycjach blatowych sąsiadujących z męskimi próbkami kożuszka krwi, żadna próbka żeńskiego DNA nie wykazała wartości C_q w zakresie wartości docelowej DNA z chromosomem Y.

9. Ocena wydajności klinicznej

Ocena wydajności klinicznej została przeprowadzona z wykorzystaniem próbek ludzkich, zestawu Maxwell® CSC Genomic DNA Kit i urządzeń Maxwell® CSC 48 Instrument.

Krew pełna

Dwójka badaczy z zewnętrznego laboratorium oczyściła DNA z 200 µl próbek ludzkiej krwi pełnej przy objętości elucji 100 µl, które pochodziły od 12 różnych dawców, za pomocą systemu oczyszczania Maxwell® CSC Purification System oraz laboratoryjnego referencyjnego przebiegu ekstrakcji. Uzyskane eluaty przeanalizowano z wykorzystaniem amplifikacji genu metabolizmu podstawowego HCP5 z kontroli dodatniej w ramach oznaczenia HLA-B27. Wszystkie 12 próbek DNA oczyszczonych za pomocą zestawu Maxwell® CSC Genomic DNA Kit wykazało zgodność u dwójki badaczy oraz zgodność z laboratoryjnym referencyjnym przebiegiem ekstrakcji.

Wymaz policzkowy

Korzystając z systemu oczyszczania Maxwell® CSC Purification System oraz laboratoryjnego referencyjnego przebiegu ekstrakcji, jeden badacz z zewnętrznego laboratorium oczyścił DNA z jednej próbki ludzkiego wymazu policzkowego, wstępnie przetworzonego za pomocą kolumny czyszczącej przy elucji o objętości 100 µl, która pochodziła od 12 różnych dawców. Uzyskane eluaty przeanalizowano z wykorzystaniem amplifikacji genu metabolizmu podstawowego HCP5 z kontroli dodatniej w ramach oznaczenia HLA-B27. Wszystkie 12 próbek DNA oczyszczonych za pomocą zestawu Maxwell® CSC Genomic DNA Kit wykazało zgodność z laboratoryjnym referencyjnym przebiegiem ekstrakcji.

Tkanki

Jeden badacz z zewnętrznego laboratorium oczyścił DNA z próbek ludzkich tkanek o objętości 10–25 mg przy elucji o objętości 200 µl, które pochodziły od 12 różnych dawców, za pomocą systemu oczyszczania Maxwell® CSC Purification System oraz laboratoryjnego referencyjnego przebiegu ekstrakcji. Uzyskane eluaty przeanalizowano z wykorzystaniem amplifikacji genu metabolizmu podstawowego HCP5 z kontroli dodatniej w ramach oznaczenia HLA-B27. Wszystkie 12 próbek DNA oczyszczonych za pomocą zestawu Maxwell® CSC Genomic DNA Kit wykazało zgodność z laboratoryjnym referencyjnym przebiegiem ekstrakcji.

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

Stężenie DNA niższe niż oczekiwane

Przyczyny i komentarze

W próbkach poddanych wielokrotnym cyklem zamrażania i rozmrażania może dojść do degradacji DNA. Dla każdego określonego typu próbki podano wytyczne dotyczące pobierania i przechowywania próbek.

Próbka zawierała niewielką ilość genomowego DNA. Uzysk genomowego DNA zależy od objętości przetwarzanej próbki i zawartości DNA w tej próbce.

Nie dodano roztworu proteiny K, dodano niepełną objętość roztworu proteiny K lub proteina K nie została dobrze zmieszana z próbką krwi. Liza i uzysk zależą od kompletnej ekstrakcji przy użyciu proteiny K.

Nie zmieszano próbki wejściowej przed przetworzeniem. Przed rozpoczęciem przetwarzania należy upewnić się, że próbki zostały zmieszane.

Objętość elucji zastosowana do ekstrakcji była zbyt duża dla przetwarzanej próbki. Aby zwiększyć elutowane stężenie DNA, należy zmniejszyć początkową objętość bufora do elucji.

Przetworzono próbkę o zbyt dużej objętości lub próbkę zawierającą nadmierną ilość genomowego DNA. Próbka o zbyt dużej objętości lub próbka zawierająca nadmierną ilość genomowego DNA może spowodować brak zgodności z substancjami chemicznymi do ekstrakcji, co może skutkować stężeniem eluatu niedopasowanym do ilości przetwarzanej próbki.

Lizat nie został zmieszany z roztworem wiążącym w dołku nr 1 poprzez aspirację i 5–10 dozowań po przeniesieniu w celu uzyskania jednorodnej mieszaniny. Nieuzyskanie jednorodnej mieszaniny lizatu próbki i roztworu wiążącego w dołku nr 1 kartridża może skutkować zmniejszonym uzyskiem i czystością w końcowym eluacie.

Próbki nie zostały odpowiednio zmieszane lub nie zostały zmieszane we właściwych krokach podczas przetwarzania. Nieprawidłowe zmieszanie odczynników i próbek w próbówce do inkubacji może wywrzeć wpływ na wydajność.

Bufor lizujący i wzmacniacz lityczny (LE2) były stosowane naprzemiennie, zostały użyte w niewłaściwym kroku lub miały nieprawidłową objętość. Należy ponownie przetworzyć próbki, prawidłowo stosując bufor lizujący i wzmacniacz lityczny (LE2) i postępując zgodnie z instrukcjami.

Objawy

Przyczyny i komentarze

Czystość niższa niż oczekiwana

Nie dodano roztworu proteiny K, dodano niepełną objętość roztworu proteiny K lub proteina K nie została dobrze zmieszana z próbką krwi. Liza i uzysk zależą od kompletnej ekstrakcji przy użyciu proteiny K.

Lizat nie został zmieszany z roztworem wiążącym w dołku nr 1 poprzez aspirację i 5–10 dozowań po przeniesieniu w celu uzyskania jednorodnej mieszaniny. Nieuzyskanie jednorodnej mieszaniny lisatu próbki i roztworu wiążącego w dołku nr 1 kartridża może skutkować zmniejszonym uzyskiem i czystością w końcowym eluacie.

W próbkach poddanych wielokrotnym cykлом zamrażania i rozmrażania może dojść do degradacji DNA. Należy używać próbek, które zostały pobrane i były przechowywane zgodnie z wytycznymi podanymi pod każdym typem próbki.

W przypadku próbek krwi pełnej, kożuska krwi i szpiku kostnego przenoszenie skrzepłego lub tłustego materiału do próbki do inkubacji może skutkować niewystarczającą lizą próbki. Na potrzeby oczyszczania należy przynosić wyłącznie płynne próbki.

Bufor lizujący i wzmacniacz lityczny (LE2) były stosowane naprzemiennie, zostały użyte w niewłaściwym kroku lub miały nieprawidłową objętość. Należy ponownie przetworzyć próbki, prawidłowo stosując bufor lizujący i wzmacniacz lityczny (LE2) i postępując zgodnie z instrukcjami.

Niektóre typy tkanek mogą cechować się czystością niższą niż oczekiwana. Jeśli wymagane są wyższe wartości czystości, należy zmniejszyć ilość wejściową przetwarzanych tkanek.

Próbki nie zostały odpowiednio zmieszane lub nie zostały zmieszane we właściwych krokach podczas przetwarzania. Nieprawidłowe zmieszanie odczynników i próbek w próbce do inkubacji może wywrzeć wpływ na wydajność.

Przeniesienie ciała stałego do dołka nr 1 kartridża może skutkować współczyszczeniem ciała stałego i substancji skażających. Usunąć ciało stałe przed przeniesieniem próbki poddanej lizie do kartridża.

Zanieczyszczenie RNA

Nie dodano roztworu RNazy A do dołka nr 3 kartridża lub dodano niepełną objętość roztworu RNazy A. Ponownie przetworzyć roztwór RNazy A lub dodać roztwór RNazy A do wyekstraktowanej próbki gDNA.

10. Rozwiązywanie problemów (ciąg dalszy)

Objawy

Przenoszenie żywicy

Przyczyny i komentarze

Próbki nie zostały odpowiednio zmieszane lub nie zostały zmieszane we właściwych krokach podczas przetwarzania. Nieprawidłowe mieszanie odczynników i próbek w probówce do inkubacji lub w dołku nr 1 może wywrzeć wpływ na przenoszenie żywicy w kartridżu i probówce do elucji.

Przetworzono próbkę o zbyt dużej objętości lub próbkę zawierającą nadmierną ilość genomowego DNA. Nadmierna objętość próbki może spowodować nadmierne przenoszenie żywicy w kartridżu i probówce do elucji.

Przenoszenie żywicy w pewnym zakresie jest zjawiskiem normalnym i nie ma wpływu na wydajność dalszych etapów badania. Jeśli to konieczne, użyć magnesu elucyjnego ([Cat.# AS4017, Cat.# AS4018 lub oba]; dostępne oddzielnie), aby przenieść eluat do nowej probówki. Patrz rozdział 11, Powiązane produkty.

11. Powiązane produkty

Urządzenia i akcesoria

Produkt	Ilość	Cat.#
Analizator Maxwell® CSC 48 Instrument*	1 szt.	AS8000
Analizator Maxwell® CSC Instrument*	1 szt.	AS6000
Stojak na kartridże Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 szt.	SP6019
Przedni stojak na kartridże Maxwell® RSC/CSC 48	1 szt.	AS8401
Tylny stojak na kartridże Maxwell® RSC/CSC 48	1 szt.	AS8402
Tłoczki RSC/CSC	50 szt./zestaw	AS1331
Probówki do elucji (0,5 ml)	50 szt./zestaw	AS6201
Magnes elucyjny, 16 pozycji	1 szt.	AS4017
Magnes elucyjny, 24 pozycje	1 szt.	AS4018
Kolumny czyszczące	po 50 szt. każdego typu	Z3871
Roztwór RNazy A	1 ml	A7973
	5 ml	A7974
Roztwór proteiny K (PK)	4 ml	MC5005
Woda wolna od nukleaz	25 ml	MC1191

* 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.

^(a)Amerykańska publikacja patentowa nr 7,329,488 oraz południowokoreańska publikacja patentowa nr 100483684.

© 2022 Promega Corporation. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Maxwell jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Promega 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.