

INSTRUKCJA TECHNICZNA

Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit

Instrukcja użytkowania produktu
AS1560

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

Uwaga: Zestaw Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit jest kompatybilny wyłącznie z oprogramowaniem Maxwell® CSC w wersji 4.0.0 lub nowszej albo oprogramowaniem Maxwell® CSC 48 w wersji 4.1.1 lub nowszej.



INSTRUKCJA
UŻYTKOWANIA PRODUKTU

AS1560



PROMEGA
2800 Woods Hollow Rd.
Madison, WI USA



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Niemcy

Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA 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 i warunki przechowywania	3
3. Przeznaczenie/zastosowanie produktu.....	6
4. Ograniczenia stosowania produktu	6
5. Przed rozpoczęciem.....	7
5.A. Przygotowanie próbek tkanki FFPE	7
6. Przygotowanie kartridża Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Cartridge	9
6.A. Przygotowanie kartridża Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Cartridge.....	9
6.B. Protokół ekstrakcji DNA	10
6.C. Protokół ekstrakcji RNA	11
6.D. Protokół ekstrakcji całkowitego kwasu nukleinowego	12
6.E. Protokół ekstrakcji sekwencyjnego DNA i RNA.....	13
7. Konfiguracja i uruchamianie urządzenia Maxwell® Instrument	17
8. Efektywność przepływu pracy	21
9. Instrukcje postępowania po ekstrakcji.....	21
10. Ocena wydajności analitycznej.....	21
10.A. Ilość, jakość i zdolność do amplifikacji DNA	22
10.B. Ilość, jakość i zdolność do amplifikacji RNA	23
10.C. Kwantyfikacja oparta na barwnikach fluorescencyjnych.....	25
10.D. Odtwarzalność	26
10.E. Inhibicja amplifikacji ze względu na substancje zakłócające	27
10.F. Zanieczyszczenie krzyżowe	29
11. Ocena wydajności klinicznej	30
11.A. Przepływ pracy ekstrakcji DNA	30
11.B. Przepływ pracy ekstrakcji RNA	30
11.C. Przepływ pracy ekstrakcji całkowitego kwasu nukleinowego	30
11.D. Przepływ pracy ekstrakcji sekwencyjnego DNA/RNA	31

12. Rozwiązywanie problemów	32
13. Tworzenie środowiska wolnego od rybonukleaz	34
14. Powiązane produkty	35

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

1. Opis

Zestaw Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit jest stosowany w połączeniu z urządzeniami Maxwell® Instruments określonymi w Tabeli 1 w celu zapewnienia łatwej metody wydajnej, zautomatyzowanej ekstrakcji DNA, RNA lub całkowitego kwasu nukleinowego (TNA) lub zarówno DNA, jak i RNA sekwencyjnie z utrwalonych formaliną i zatopionych w parafinie (FFPE) próbek tkanek. Urządzenia Maxwell® CSC Instruments są przeznaczone do stosowania ze wstępnie napełnionymi kartridżami z odczynnikami oraz z dodatkowymi odczynnikami dostarczonymi w zestawie. Zaprogramowane metody ekstrakcji maksymalizują prostotę i wygodę użytkowania urządzeń Maxwell® CSC Instruments. Urządzenia Maxwell® CSC Instruments mogą przetwarzać od jednej do maksymalnej dozwolonej liczby próbek w wydajny sposób, umożliwiając automatyczną ekstrakcję DNA, RNA i całkowitego kwasu nukleinowego (TNA) w ciągu około 30 minut oraz sekwencyjną ekstrakcję DNA i RNA w czasie krótszym niż 1 godzina. Wyekstrahowane DNA, RNA lub całkowity kwas nukleinowy można bezpośrednio wykorzystać w dalszych badaniach opartych na amplifikacji.

Tabela 1. Kompatybilność z urządzeniami.

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

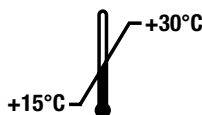
Podstawy metody: Zestaw Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit umożliwia ekstrakcję kwasów nukleinowych przy użyciu cząsteczek paramagnetycznych, które stanowią ruchomą fazę stałą, optymalizując wychwytywanie próbki, płukanie i ekstrakcję DNA, RNA lub całkowitego kwasu nukleinowego. Opcjonalnie możliwe jest sekwencyjne wyekstrahowanie DNA i RNA z tej samej próbki tkanki FFPE, bez konieczności dzielenia lizatu. Urządzenia Maxwell® CSC Instruments są urządzeniami przeprowadzającymi analizy w oparciu o cząsteczki magnetyczne. System ten umożliwia skuteczne wiązanie kwasu nukleinowego z cząsteczką paramagnetyczną w pierwszym dołku wstępnie napełnionego kartridża i przenosi cząsteczki paramagnetyczne przez dołki kartridża, mieszając ją podczas przetwarzania. Zastosowanie magnetycznego wychwytywania pozwala na uniknięcie często występujących problemów, takich jak zatkane końcówki lub częściowe przeniesienie odczynnika, co obniża jakość procesów ekstrakcji w innych powszechnie stosowanych zautomatyzowanych systemach.

Uwagi dotyczące próbek: Ekstrakcja kwasu nukleinowego z próbek tkanek FFPE może być trudne ze względu na cechy tkanki, takie jak włóknistość, skład lipidowy, zawartość nukleaz i liczba komórek dostępnych w wycinku tkanki. Ponadto zmienność w sposobie obchodzenia się z tkanką przed i podczas utrwalania, w tym czas wystawienia na działanie formaliny podczas procesu utrwalania tkanki, ma duży wpływ na stopień usieciowania i fragmentacji kwasów nukleinowych w tkance FFPE. Atrybuty te mogą mieć wpływ na jakość i ilość amplifikowalnego kwasu nukleinowego, który można wyekstrahować z wycinków tkanek FFPE. W trakcie rozwoju zestaw Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit był testowany przy użyciu różnych typów tkanek ludzkich FFPE w celu wyekstrahowania dostępnego amplifikowalnego DNA, RNA lub całkowitego kwasu nukleinowego.

2. Elementy produktu i warunki przechowywania

PRODUKT	ILOŚĆ	CAT. #
Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit	48 preparatów	AS1560

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



Zawartość zestawu:

- 35 ml oleju mineralnego
- 20 ml buforu lizującego
- 2 × 1 ml proteinazy K
- 2 × 100 µl niebieskiego barwnika
- 2 × 1 ml MnCl₂, 0,09 M
- 3 fiołki DNaza I (liofilizowana)
- 48 Maxwell® CSC Cartridges (CSCR)
- 50 CSC/RSC Plungers
- 2 × 50 Elution Tubes (0,5 ml)
- 25 ml Nuclease-Free Water

Warunki przechowywania: Przechowywać zestaw Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit w temperaturze pokojowej (od +15°C do +30°C). Przechowywać ponownie uwodnioną DNazę I w temperaturze od -30°C do -10°C. **Nie przekraczać 10 cykli zamrażania i rozmrażania.**

2. Elementy produktu i warunki przechowywania (ciąg dalszy)



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



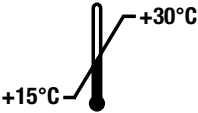
Składniki zestawu Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit są przeznaczone do stosowania w przypadku substancji potencjalnie zakaźnych. Podczas pracy z czynnikami zakaźnymi należy nosić odpowiednie środki ochrony indywidualnej (np. rękawiczki i okulary ochronne). Należy przestrzegać obowiązujących w instytucji 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 zestawu Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit zostały dopuszczone do łącznego stosowania na podstawie odpowiednich procedur kwalifikacyjnych i testów kontroli jakości. Nie wolno mieszać elementów zestawu z elementami zestawów różnych serii. Należy używać wyłącznie elementów dostarczonych w zestawie. Nie wolno używać kartridży, jeśli zamknięcie kartridża było naruszone w momencie dostawy.

Objaśnienie symboli

Symbol	Objaśnienie	Symbol	Objaśnienie
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro		Autoryzowany przedstawiciel
	Przechowywać w temperaturze od +15°C do +30°C.		Wytwórca
	Przystroga		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 XtractAll FFPE DNA/RNA Kit jest przeznaczony do stosowania w połączeniu z urządzeniami Maxwell® CSC i metodami Maxwell® CSC XtractAll jako medyczne urządzenie do diagnostyki in vitro (IVD) w celu automatycznej izolacji wyłącznie DNA, wyłącznie RNA, sekwencyjnie DNA i RNA lub całkowitego kwasu nukleinowego z utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE) próbek tkanek ludzkich. Wyekstrahowane DNA, RNA lub całkowity kwas nukleinowy nadają się do stosowania w analizach wykonywanych na potrzeby diagnostyki in vitro opartych na amplifikacji.

Zestaw Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit jest przeznaczony do stosowania w temperaturze od 15°C do 30°C. Stosowanie zestawu poza tym zakresem temperatur może prowadzić do uzyskania nieoptymalnych wyników. Próbki tkanek FFPE przygotowane z zastosowaniem 10-procentowej obojętnie buforowanej formaliny mogą być stosowane razem z zestawem Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit.

Zestaw Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit jest przeznaczony wyłącznie do użytku przez specjalistów. Wyniki diagnostyczne uzyskane na podstawie DNA, RNA lub całkowitego kwasu nukleinowego wyekstrahowanego za pomocą tego systemu należy interpretować w połączeniu z innymi danymi klinicznymi lub laboratoryjnymi.

4. Ograniczenia stosowania produktu

Zestaw Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit jest przeznaczony do użytku wyłącznie z próbkami tkanek FFPE. Nie jest przeznaczony do użytku z próbkami tkanek innymi niż FFPE, takimi jak świeże lub zamrożone próbki tkanek. Nie ustalono charakterystyk wydajnościowych przy użyciu próbek tkanek FFPE przygotowanych z użyciem utrwalczy innych niż 10% obojętnie buforowanej formaliny.

Przydatność kwasu nukleinowego wyekstrahowanego przy użyciu zestawu Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit do stosowania w sekwencjonowaniu następnej generacji (NGS) została wykazana podczas opracowywania produktu, ale nie została zweryfikowana.

Użytkownik odpowiada za ustalenie charakterystyki roboczej wymaganej w dalszych zastosowaniach diagnostycznych. W przypadku dalszych zastosowań diagnostycznych wykorzystujących DNA, RNA lub łączny kwas nukleinowy wyekstrahowany za pomocą systemu Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit należy zastosować odpowiednie środki kontrolne.

5. Przed rozpoczęciem

Materiały zapewniane przez użytkownika

- mikrowirówka
- wytrząsarka typu vortex
- 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 90°C
- próbki tkanki FFPE (**Uwaga:** próbki należy przechowywać w temperaturze pokojowej [15–30°C]).
- izopropanol, ≥99,5% klasy biologii molekularnej (do sekwencyjnych przepływów pracy RNA, TNA i DNA/RNA)
- żyłki (**Uwaga:** podczas korzystania z żyłek w celu usunięcia próbek tkanki FFPE ze szkiełka podstawowego należy zachować ostrożność).

W razie konieczności przygotować fiolkę liofilizowanej DNazy I z zastosowaniem 275 µl Nuclease-Free Water i 15 µl niebieskiego barwnika. Odwrócić fiolkę w celu odzyskania DNazy I ze spodu zatyczki i obracać delikatnie ruchem wirowym, aby ją wymieszać; nie wytrząsać w wytrząsarce typu vortex. Przechowywać zrekonstruowaną DNazę I w temperaturze od –30°C do –10°C. Nie przekraczać 10 cykli zamrażania i rozmrażania.

5.A. Przygotowanie próbek tkanki 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 13 – Tworzenie środowiska wolnego od rybonukleaz.

W trakcie rozwoju optymalną wydajność zestawu uzyskano przy całkowitej grubości wycinków tkanki FFPE wynoszącej 20 µm. W jednej probówce można połączyć kilka odcinków w celu ekstrakcji, przy czym maksymalna grubość łączonych odcinków nie może przekraczać 80 µm. Wycinki grubsze niż 20 µm będą zakłócać trawienie proteinazą K i skutkować niskim uzyskiem (patrz sekcja 12). Użytkownik powinien zoptymalizować liczbę i grubość przekroju na podstawie wymagań dalszej analizy.

Podczas opracowywania próbek tkanki FFPE z piersi, wątroby i macicy oceniano jako wzorce i stwierdzono, że zapewniają one akceptowalną wydajność. Więcej rodzajów tkanek może być zgodnych z substancjami chemicznymi do ekstrakcji, lecz powinny one zostać poddane ocenie przez laboratorium w zakresie wydajności ekstrakcji i zgodności z zestawem Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit.

Wstępna obróbka wycinków tkanki FFPE

1. Umieścić wycinek(-ki) tkanki FFPE w probówce mikrowirówkowej o pojemności 1,5 ml. W przypadku pracy z wycinkami tkanki FFPE umieszczonymi na szkiełku podstawowym należy je usunąć przy użyciu czystej żyletki.
Uwaga: Do różnych próbek tkanek FFPE należy używać nowego, czystego ostrza, aby uniknąć krzyżowego zanieczyszczenia próbek.
2. Do probówek z próbką należy dodać 500 μ l oleju mineralnego. Mieszać przez 10 sekund na mieszadle typu vortex.
3. Próbkę podgrzewać przez 5 minut do temperatury 90°C. Podczas przygotowywania mieszaniny wzorcowej umieścić próbki w temperaturze pokojowej, jak opisano w kroku 4.
4. Natychmiast przed użyciem, zgodnie z poniższą tabelą należy przygotować mieszaninę wzorcową przy użyciu bufora lizującego, proteinazy K oraz niebieskiego barwnika.

Odczynnik	Ilość/reakcja	Reakcje (Liczba próbek + 2)	Łącznie
Bufor lizujący	224 μ l	n + 2	224 μ l $\times$ (n + 2)
Proteinaza K	25 μ l	n + 2	25 μ l $\times$ (n + 2)
Niebieski barwnik	1 μ l	n + 2	1 μ l $\times$ (n + 2)

5. Do każdej z probówek z próbką dodać 250 μ l mieszaniny wzorcowej i mieszać przez 5 sekund na mieszadle typu vortex.
Uwaga: nie przechowywać pozostałej, niewykorzystanej mieszanki głównej.
6. Odwirować probówki 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 końcówką pipety fazę wodną, aby rozpuścić grudkę. Pozostawić w probówce warstwę oleju mineralnego i warstwę wodną.
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 90°C i inkubować przez 1 godzinę.
9. Przejść do Rozdziału 6, aby zapoznać się z przygotowaniem kartridża.

6. Przygotowanie kartridża Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Cartridge

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

1. Przed rozpoczęciem pracy z kartridżami Maxwell® CSC Cartridges, tłoczkami CSC/RSC Plungers i probówkami Elution Tubes należy zmienić rękawiczki. Kartridże są ustawiane na stojakach na kartridże na zewnątrz urządzenia Maxwell®, po czym stojaki na kartridże zawierające kartridże i próbki są następnie przenoszone do urządzenia w celu rozpoczęcia ekstrakcji. Umieścić każdy kartridż na stojaku na kartridże tak, aby dołek nr 1 (największy dołek w kartridżu) znajdował się jak najdalej od probówek Elution Tubes (Rysunek 1). 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 została usunięta z kartridża.



Przestroga: z kartridżami należy się obchodzić ostrożnie. Krawędzie zamknięcia kartridża mogą być ostre.

2. Umieścić jeden tłoczek w studzience nr 8 każdego kartridża.
3. Umieścić pustą probówkę Elution Tube w położeniu Elution Tube dla każdego kartridża na stojaku(-ach) na kartridże.

Uwaga: używać wyłącznie probówek do elucji dostarczonych w zestawie Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit. Inne probówki do elucji mogą nie być zgodne z urządzeniami Maxwell® CSC Instruments, co może wpłynąć na wynik ekstrakcji.

4. Na dnie każdej probówki Elution Tube umieścić 50 µl Nuclease-Free Water. Podczas ekstrakcji należy trzymać probówki elucyjne otwarte (Rysunek 1).

Uwaga: używać wyłącznie Nuclease-Free Water dostarczonej w zestawie Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit. Stosowanie innych buforów elucyjnych może mieć wpływ na wydajność ekstrakcji lub dalsze użytkowanie.

5. Aby uzyskać instrukcje dotyczące każdego procesu ekstrakcji, przejść do odpowiedniego rozdziału wymienionego poniżej.

Rodzaj ekstrakcji	Rozdział
DNA	6.B.
RNA	6.C.
Całkowity kwas nukleinowy (TNA)	6.D
Sekwencyjne DNA/RNA	6.E.

Uwagi do przygotowania stojaka na kartridże



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

6.A. Przygotowanie kartridża DNA/RNA Maxwell® CSC XtractAll FFPE Cartridge (ciąg dalszy)



Rysunek 1. Ustawianie i konfiguracja stojaka na kartridże. Nuclease-Free Water jest dodawana do probówek Elution Tubes w sposób przedstawiony na rysunku. Przed rozpoczęciem metody ekstrakcji należy otworzyć probówki Elution Tubes.

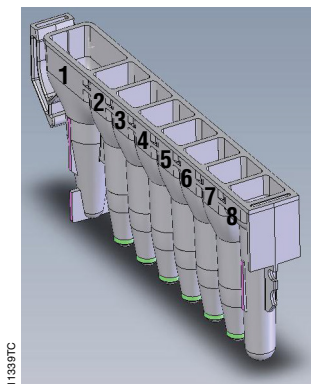
6.B. Protokół ekstrakcji DNA

1. Po zakończeniu 1-godzinnej inkubacji (Rozdział 5.A) przenieść niebieską fazę wodną do dołka nr 1 kartridża Maxwell® CSC Cartridge (CSCR). Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, do każdej próbki używać nowej końcówki pipety.

Uwagi:

 - a. Jeżeli po inkubacji pozostanie jakiś niestrawiony materiał, należy odwirować probówki z próbką przy 10 000 × g przez 20 sekund w celu oddzielenia niestrawionego materiału. Nie wolno przenosić do kartridża materiału granulowanego lub niestrawionego.
 - b. Przenieść całą objętość niebieskiej fazy wodnej do kartridża, unikając przy tym niestrawionego materiału, i wyekstrahować go w ciągu 30 minut od zakończenia inkubacji.
 - c. Objętość niebieskiej fazy wodnej w próbówce będzie się różnić w zależności od rodzaju i składu próbki tkanki FFPE.
2. Zeskanować kod kreskowy na pudełku zestawu i wybrać metodę Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA. Nacisnąć przycisk **Kontynuuj**, aby kontynuować.
3. Umieścić taśkę na próbki w urządzeniu Maxwell®, wprowadzić informacje dotyczące kartridża i śledzenia próbki na ekranie „Konfiguracja kartridża”, potwierdzić, że wykonano wszystkie czynności z listy kontrolnej ekstrakcji, a następnie dotknąć przycisku **Rozpocznij**, aby rozpocząć ekstrakcję.

Uwaga: Szczegółowe instrukcje dotyczące konfiguracji urządzenia można znaleźć w rozdziale 7.



Użytkownik dodaje do dołków:

1. Wstępnie przetworzone próbki
8. CSC/RSC Plunger

Rysunek 2. Kartrydż Maxwell® CSC Cartridge. Wstępnie przetworzona próbka tkanki FFPE zostaje dodana do dołka nr 1, a tłoczek do dołka nr 8.

6.C. Protokół ekstrakcji RNA

1. Po zakończeniu 1-godzinnej inkubacji (Rozdział 5.A) przenieść niebieską fazę wodną do dołka nr 1 kartrydża Maxwell® CSC Cartridge (CSCR). Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, do każdej próbki używać nowej końcówki pipety.

Uwagi:

- a. Jeżeli po inkubacji pozostanie jakiś niestrawiony materiał, należy odwirować próbki z próbką przy $10\,000 \times g$ przez 20 sekund w celu oddzielenia niestrawionego materiału. Nie wolno przenosić do kartrydża materiału granulowanego lub niestrawionego.
- b. Przenieść całą objętość niebieskiej fazy wodnej do kartrydża, unikając przy tym niestrawionego materiału, i wyekstrahować go w ciągu 30 minut od zakończenia inkubacji.
- c. Objętość niebieskiej fazy wodnej w próbce będzie się różnić w zależności od rodzaju i składu próbki tkanki FFPE.
2. Bezpośrednio przed użyciem należy przygotować koktajl $MnCl_2$ i DNazy I, jak pokazano poniżej:

Odczynnik	Ilość/reakcja	Reakcje (Liczba próbek [n] + 2)	Łączenie
$MnCl_2$, 0,09 M	17 μ l	n + 2	17 μ l $\times$ (n + 2)
DNaza I (z niebieskim barwnikiem) ¹	10 μ l	n + 2	10 μ l $\times$ (n + 2)

¹Przechowywać pozostałą zrekonstruowaną DNazę I z niebieskim barwnikiem w temperaturze od -30°C do -10°C .

3. Dodać 27 μ l koktajlu DNazy I do dołka nr 7 każdego kartrydża.

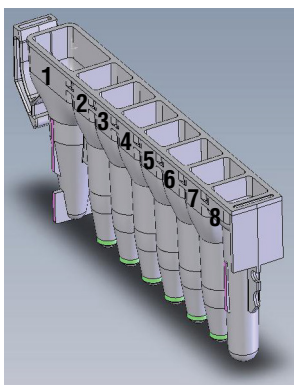
Uwaga: Nie przechowywać pozostałego, niewykorzystanego koktajlu DNazy I.

4. Dodać 500 μ l 100% izopropanolu do dołka nr 1.

6.C. Protokół ekstrakcji RNA (ciąg dalszy)

5. Zeskanować kod kreskowy na pudełku zestawu i wybrać metodę Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA. Nacisnąć przycisk **Kontynuuj**, aby kontynuować.
6. Umieścić tacę na próbki w urządzeniu Maxwell®, wprowadzić informacje dotyczące kartridża i śledzenia próbki na ekranie „Konfiguracja kartridża”, potwierdzić, że wykonano wszystkie czynności z listy kontrolnej ekstrakcji, a następnie dotknąć przycisku **Rozpocznij**, aby rozpocząć ekstrakcję.

Uwaga: Szczegółowe instrukcje dotyczące konfiguracji urządzenia można znaleźć w rozdziale 7.



Użytkownik dodaje do dołków:

1. Wstępnie przetworzone próbki i 500 µl 100% izopropanolu
7. 27 µl koktajlu DNazy I
8. CSC/RSC Plunger

Rysunek 3. Kartridż Maxwell® CSC Cartridge. Wstępnie przetworzona próbka tkanki FFPE i izopropanol zostają dodane do dołka nr 1, koktajl DNazy I do dołka nr 7, a tłoczek do dołka nr 8.

6.D. Protokół ekstrakcji całkowitego kwasu nukleinowego

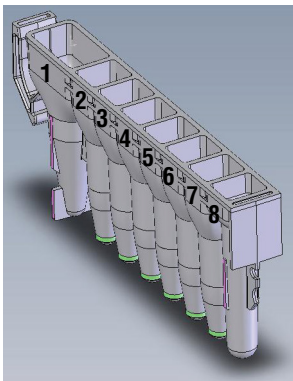
1. Po zakończeniu 1-godzinnej inkubacji (Rozdział 5.A) przenieść niebieską fazę wodną do dołka nr 1 kartridża Maxwell® CSC Cartridge (CSCR). Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, do każdej próbki używać nowej końcówki pipety.

Uwagi:

- a. Jeżeli po inkubacji pozostanie jakiś niestrawiony materiał, należy odwirować próbówki z próbką przy $10\,000 \times g$ przez 20 sekund w celu oddzielenia niestrawionego materiału. Nie wolno przenosić do kartridża materiału granulowanego lub niestrawionego.
 - b. Przenieść całą objętość niebieskiej fazy wodnej do kartridża, unikając przy tym niestrawionego materiału, i wyekstrahować go w ciągu 30 minut od zakończenia inkubacji.
 - c. Objętość niebieskiej fazy wodnej w próbówce będzie się różnić w zależności od rodzaju i składu próbki tkanki FFPE.
2. Dodać 500 µl 100% izopropanolu do dołka nr 1.
 3. Zeskanować kod kreskowy na pudełku zestawu i wybrać metodę Maxwell® CSC XtractAll FFPE Total Nucleic Acid. Nacisnąć przycisk **Kontynuuj**, aby kontynuować.

4. Umieścić tackę na próbki w urządzeniu Maxwell®, wprowadzić informacje dotyczące kartridża i śledzenia próbek na ekranie „Konfiguracja kartridża”, potwierdzić, że wykonano wszystkie czynności z listy kontrolnej ekstrakcji, a następnie dotknąć przycisku **Rozpocznij**, aby rozpocząć ekstrakcję.

Uwaga: Szczegółowe instrukcje dotyczące konfiguracji urządzenia można znaleźć w rozdziale 7.



Użytkownik dodaje do dołków:

1. Wstępnie przetworzone próbki i 500 µl 100% izopropanolu
8. CSC/RSC Plunger

Rysunek 4. Kartridż Maxwell® CSC Cartridge. Wstępnie przetworzona próbka tkanki FFPE i izopropanol zostają dodane do dołka nr 1, a tłoczek do dołka nr 8.

6.E. Protokół ekstrakcji sekwencyjnego DNA i RNA

Wybierając metodę sekwencyjnej ekstrakcji DNA/RNA, oprogramowanie Maxwell® przeprowadzi dwa oddzielne cykle ekstrakcji jeden po drugim, a użytkownik doda do kartridży kilka odczynników pomiędzy tymi cyklami. W przypadku metody sekwencyjnej DNA/RNA Maxwell® CSC XtractAll FFPE Sequential pierwsza metoda polega na ekstrakcji DNA z lizowanej próbki tkanki FFPE do pierwszej próbki elucyjnej, natomiast druga metoda polega na ekstrakcji RNA z tej samej próbki do drugiej próbki elucyjnej przy użyciu tego samego kartridża i tłoczka. Poniżej znajdują się instrukcje dotyczące przygotowania kartridży do każdego z tych cykli ekstrakcji.

Przebieg 1: Ekstrakcja DNA

1. Po zakończeniu 1-godzinnej inkubacji (Rozdział 5.A) przenieść niebieską fazę wodną do dołka nr 1 kartridża Maxwell® CSC Cartridge (CSCR). Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, do każdej próbki używać nowej końcówki pipety.

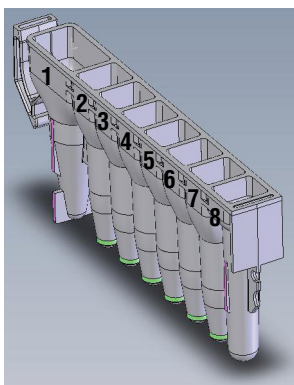
Uwagi:

- a. Jeżeli po inkubacji pozostanie jakiś niestrawiony materiał, należy odwirować próbki z próbką przy 10 000 × g przez 20 sekund w celu oddzielenia niestrawionego materiału. Nie wolno przenosić do kartridża materiału granulowanego lub niestrawionego.
- b. Przenieść całą objętość niebieskiej fazy wodnej do kartridża, unikając przy tym niestrawionego materiału, i wyekstrahować go w ciągu 30 minut od zakończenia inkubacji.
- c. Objętość niebieskiej fazy wodnej w próbce będzie się różnić w zależności od rodzaju i składu próbki tkanki FFPE.

6.E. Protokół ekstrakcji sekwencyjnego DNA i RNA (ciąg dalszy)

2. Zeskanować kod kreskowy na pudełku zestawu, a następnie wybrać metodę Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential i dotknąć przycisku **Kontynuuj**, aby kontynuować.
3. Umieścić tackę na próbki w urządzeniu Maxwell®, wprowadzić informacje dotyczące kartridża i śledzenia próbki na ekranie „Konfiguracja kartridża”, potwierdzić, że wykonano wszystkie czynności z listy kontrolnej ekstrakcji, a następnie dotknąć przycisku **Rozpocznij**, aby rozpocząć ekstrakcję.

Uwaga: Szczegółowe instrukcje dotyczące konfiguracji urządzenia można znaleźć w rozdziale 7.



Użytkownik dodaje do dołków:

1. Wstępnie przetworzone próbki
8. CSC/RSC Plunger

Rysunek 5. Kartridż Maxwell® CSC Cartridge. Wstępnie przetworzona próbka tkanki FFPE zostaje dodana do dołka nr 1, a tłoczek do dołka nr 8.

Instrukcja postępowania między przebiegami

Pomiędzy pierwszym cyklem ekstrakcji DNA FFPE i drugim cyklem ekstrakcji RNA FFPE w ramach sekwencyjnej metody DNA/RNA należy wykonać następujące czynności:

4. Po zakończeniu metody ekstrakcji sekwencyjnej FFPE DNA postępować zgodnie z instrukcjami wyświetlanymi na ekranie, aby otworzyć drzwi. Sprawdzić, czy po zakończeniu przebiegu tłoczki znajdują się w dołku nr 8 kartridży. 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 w celu rozładowania tłoczków. Aby przygotować się do sekwencyjnej ekstrakcji RNA FFPE, wyświetli się nowy ekran konfiguracji kartridża.
5. Probówki Elution Tubes zawierające DNA należy zamknąć zatyczką i wyjąć natychmiast po zakończeniu cyklu, aby zapobiec odparowaniu eluatów.

6. Pod koniec procesu sekwencyjnej ekstrakcji DNA metodą FFPE żywica jest umieszczana w dołku nr 2 w celu przygotowania do procesu sekwencyjnej ekstrakcji RNA metodą FFPE.

Uwagi:

- a. Nie wyjmować ani nie wyrzucać kartridży ani tłoków ze stojaka na kartridże. Zostaną one ponownie wykorzystane do sekwencyjnej ekstrakcji RNA FFPE.
 - b. Przystąpić do sekwencyjnej ekstrakcji FFPE RNA w ciągu 2 godzin od zakończenia sekwencyjnej ekstrakcji FFPE DNA.
7. Wyświetli się ekran konfiguracji kartridża, wskazujący pozycje próbek i informacje o śledzeniu wprowadzone przed pierwszym cyklem ekstrakcji DNA. W razie potrzeby informacje te można edytować, tak aby odzwierciedlały wszelkie zmiany w przetwarzanych kartridżach, poprzez dotknięcie przycisku **Włącz edycję**. Więcej informacji zawiera rozdział 8.
 8. Dotknąć przycisku **Kontynuuj**, aby wyświetlić ekran „Lista kontrolna ekstrakcji”.

Przebieg 2: Ekstrakcja RNA

9. Umieścić pustą probówkę Elution Tube w położeniu Elution Tube dla każdego kartridża na stojaku(-ach) na kartridże.

Uwaga: Używać wyłącznie probówek Elution Tubes dostarczonych w zestawie Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit. Inne próbki do elucji mogą nie być zgodne z urządzeniem Maxwell® CSC Instrument, co może wpłynąć na wynik ekstrakcji RNA.

10. Na dnie każdej probówki Elution Tube umieścić 50 µl Nuclease-Free Water. Probówki Elution Tubes muszą być otwarte podczas ekstrakcji RNA (Rysunek 7).

Uwaga: używać wyłącznie Nuclease-Free Water dostarczonej w zestawie Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit. Stosowanie innych buforów elucyjnych może mieć wpływ na wydajność ekstrakcji RNA lub dalsze użytkowanie.

11. Bezpośrednio przed użyciem należy przygotować koktajl $MnCl_2$ i DNazy I, jak pokazano poniżej:

Odczynnik	Ilość/reakcja	Reakcje (Liczba próbek + 2)	Łącznie
$MnCl_2$, 0,09 M	17 µl	n + 2	17 µl × (n + 2)
DNaza I ¹ (z niebieskim barwnikiem)	10 µl	n + 2	10 µl × (n + 2)

¹Przechowywać pozostałą zrekonstruowaną DNazę I z niebieskim barwnikiem w temperaturze od -30°C do -10°C.

12. Dodać 27 µl koktajlu DNazy I do dołka nr 7 każdego kartridża.

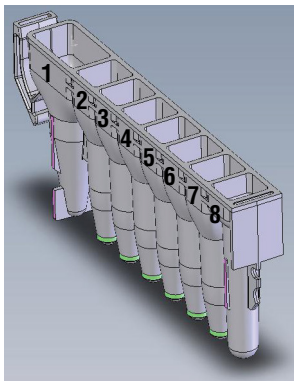
Uwaga: Nie przechowywać żadnego pozostałego, niewykorzystanego koktajlu DNazy I.

13. Dodać 500 µl 100% izopropanolu do dołka nr 1.

6.E. Protokół ekstrakcji sekwencyjnego DNA i RNA (ciąg dalszy)

14. Umieścić tacę w aparacie Maxwell®, sprawdzić, czy wykonano wszystkie czynności z listy kontrolnej ekstrakcji i nacisnąć przycisk **Rozpocznij**, aby rozpocząć drugi cykl sekwencyjnej ekstrakcji RNA FFPE.

Uwaga: Szczegółowe instrukcje dotyczące konfiguracji urządzenia można znaleźć w rozdziale 7.



Użytkownik dodaje do dołków:

1. 500 µl 100% izopropanolu (dodać do istniejącej próbki w dołku nr 1)
7. 27 µl koktajlu DNazy I
8. CSC/RSC Plunger (ten sam tłoczek, który był używany podczas sekwencyjnej ekstrakcji DNA FFPE i który powinien znajdować się już w dołku nr 8)

Rysunek 6. Kartridż Maxwell® CSC Cartridge. Do istniejącej próbki dodano izopropanol w dołku nr 1, koktajl DNazy do dołka nr 7, a ten sam tłoczek, który był używany w procesie sekwencyjnej ekstrakcji DNA FFPE, powinien znaleźć się w dołku nr 8.



Rysunek 7. Ustawianie i konfiguracja stojaka na kartridże. Nuclease-Free Water jest dodawana do probówek Elution Tubes w sposób przedstawiony na rysunku. Przed rozpoczęciem metody ekstrakcji należy otworzyć probówki Elution Tubes.

7. Konfiguracja i uruchamianie urządzenia Maxwell® Instrument

Metody Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA, RNA, TNA i DNA/RNA Sequential Methods dla urządzenia Maxwell® CSC Instrument można pobrać ze strony:

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

Metody Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA, RNA, TNA i DNA/RNA Sequential Methods dla urządzenia Maxwell® CSC 48 Instrument można pobrać ze strony:

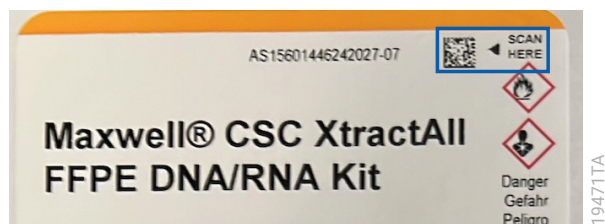
www.promega.com/resources/software-firmware/maxwell-maxprep/maxwell-csc-48-methods/

Uwaga: Zestaw Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit jest kompatybilny wyłącznie z oprogramowaniem Maxwell® CSC w wersji 4.0.0 lub nowszej albo oprogramowaniem Maxwell® CSC 48 w wersji 4.1.1 lub nowszej.

W przypadku podejrzenia, że aparat został zanieczyszczony RNazą, wyczyścić go przed użyciem. Należy przestrzegać wytycznych w rozdziale dotyczącym czyszczenia i konserwacji w *instrukcji obsługi urządzenia Maxwell® CSC Instrument IVD Mode* nr TM457 lub *instrukcji obsługi urządzenia Maxwell® CSC 48 Instrument IVD Mode* nr TM623.

1. Włączyć urządzenie Maxwell® Instrument i Tablet PC. Zalogować się na komputerze typu Tablet PC i uruchomić oprogramowanie Maxwell® CSC IVD-mode, dotykając dwukrotnie ikony na pulpicie. Urządzenie przeprowadzi autotest i ustawi w położeniu wyjściowym wszystkie ruchome części.
2. Wybrać opcję **Rozpocznij** na ekranie „Ekran główny”.
3. Zeskanować lub wprowadzić kod kreskowy znajdujący się w prawym górnym rogu etykiety zestawu Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit (Rysunek 8).

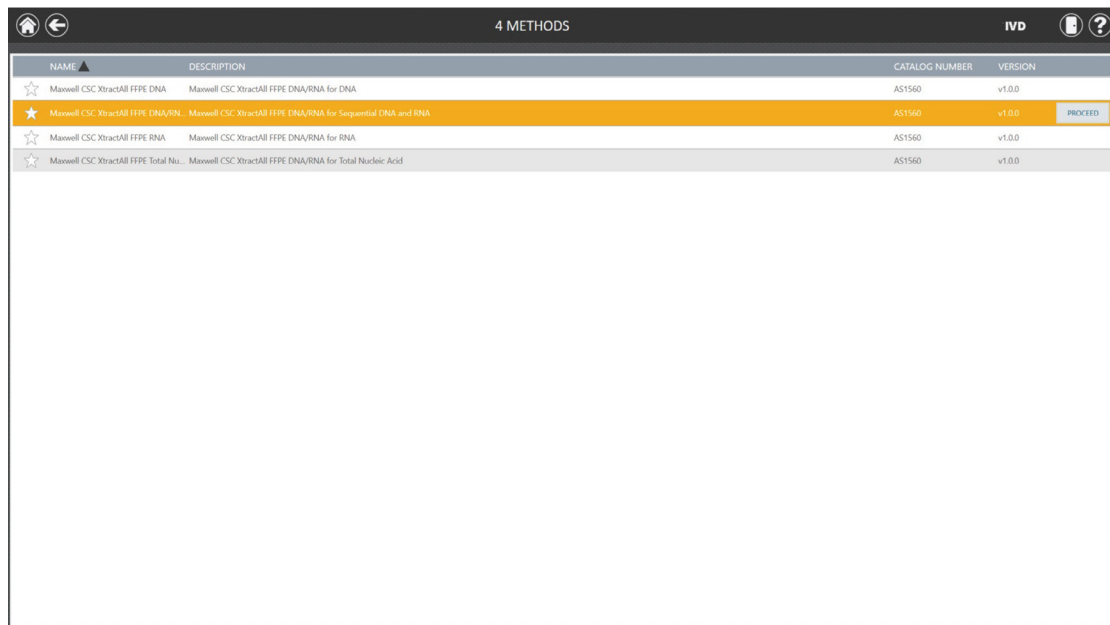
Uwaga: Kod kreskowy metody zestawu Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit jest wymagany do przeprowadzenia ekstrakcji DNA przy użyciu urządzeń Maxwell® CSC Instruments. Etykieta zestawu zawiera dwa kody kreskowe. Kod kreskowy metody przedstawiono na Rysunku 8. Jeżeli nie można zeskanować kodu kreskowego, należy skontaktować się z działem Promega Technical Services (**techserv@promega.com**).



Rysunek 8. Etykieta zestawu z kodem kreskowym do zeskanowania. Kod kreskowy do zeskanowania, służący do uruchomienia metody ekstrakcji, znajduje się w niebieskiej ramce, w prawym górnym rogu etykiety zestawu.

7. **Konfiguracja i uruchamianie urządzenia Maxwell® Instrument (ciąg dalszy)**

4. Na ekranie wyboru metody wybrać metodę odpowiadającą przetwarzanemu przepływowi pracy: Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA, Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, Maxwell® CSC XtractAll FFPE Total Nucleic Acid lub Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential.



Rysunek 9. Ekran wyboru metody. Wybrać metodę odpowiadającą żadanemu przepływowi pracy.

5. Sprawdzić, czy wybrano prawidłową metodę ekstrakcji i dotknąć przycisku **Kontynuuj**.
6. Na ekranie Konfiguracja kartridża 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 **Kontynuuj**, 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.

7. Po otwarciu drzwi urządzenia potwierdzić, czy wykonano wszystkie czynności z listy kontrolnej ekstrakcji. Sprawdzić, czy wstępnie przetworzone próbki zostały dodane do dołka nr 1 kartridża, czy izopropanol został dodany do dołka nr 1 kartridża (tylko w przypadku sekwencyjnych przepływów pracy RNA, TNA i FFPE RNA), czy koktajl DNazy I został dodany do dołka nr 7 kartridża (tylko w przypadku sekwencyjnych przepływów pracy RNA i FFPE RNA), czy kartridże są załadowane do urządzenia, czy obecne są otwarte próbówki elucyjne z Nuclease-Free Water, a tłoczki znajdują się w dołku 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 stojaku na kartridże został umieszczony w urządzeniu Maxwell® w taki sposób, że próbówki do elucji znajdują się możliwie jak najbliżej drzwi. Przetawić tył stojaka na kartridże w dół i ustawić go na urządzeniu tak, aby jego 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® CSC 48 z 24 pozycjami, aby określić, czy powinny zostać umieszczone z przodu, czy z tyłu urządzenia.

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

Uwaga: W przypadku korzystania z urządzenia Maxwell® CSC 48 Instrument i włączenia systemu Vision System 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 próbek do elucji) spowoduje, że oprogramowanie powróci do ekranu Konfiguracja kartridża, a problematyczne pozycje zostaną oznaczone wykrzyknikiem w czerwonym okręgu. Dotknąć wykrzyknika, aby uzyskać opis błędu i rozwiązać problemy związane z błędami. Ponownie dotknąć przycisku **Rozpocznij**, aby powtórzyć skanowanie stojaków na kartridże i rozpocząć przebieg ekstrakcji.



Ostrzeżenie: Niebezpieczeństwo zmiżdżenia.

9. Urządzenie Maxwell® Instrument natychmiast rozpocznie cykl ekstrakcji. Na ekranie będą wyświetlane wykonywane kroki oraz przybliżony czas do zakończenia cyklu.

Uwagi:

- a. Dotknięcie przycisku **Przerwij** spowoduje przerwanie przebiegu. Wszystkie próbki z przerwanej przebiegu zostaną utracone.
- b. Jeśli cykl zostanie przerwany przed jego ukończeniem, może zostać wyświetlony monit o sprawdzenie, czy tłoczki są nadal załadowane na listwę tłoczków. Jeśli tłoczki znajdują się na słupku tłoczków, należy przeprowadzić procedurę Czyszczenie, gdy będzie to wymagane, postępując zgodnie z instrukcjami podanymi w instrukcji obsługi urządzenia Maxwell® Instrument (patrz Tabela 1). Jeśli tłoczki nie znajdują się na słupku tłoczków, można pominąć procedurę Czyszczenie po wyświetleniu monitu. Próbkę zostanie utracona.

10. Po zakończeniu cyklu ekstrakcji (przepływy pracy DNA, RNA, TNA) lub obu sekwencyjnych cykli ekstrakcji DNA/RNA interfejs użytkownika wyświetli komunikat informujący o zakończeniu metody.

7. Konfiguracja i uruchamianie urządzenia Maxwell® Instrument (ciąg dalszy)

Koniec przebiegu

11. 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 urządzenia Maxwell® Instrument (patrz Tabela 1), aby przeprowadzić procedurę Czyszczenie i podjąć próbę rozładunku tłoczków.
12. Natychmiast po zakończeniu przebiegu należy zatkać i wyjąć probówki Elution Tubes zawierające kwas nukleinowy, 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 wyekstrahowanego kwasu nukleinowego. Próbkę DNA można przechowywać maksymalnie przez jeden tydzień w temperaturze 4°C oraz maksymalnie przez jeden miesiąc w temperaturze -20°C. Próbkę RNA i TNA można przechowywać przez noc w temperaturze od -30°C do -10°C lub w temperaturze niższej niż -60°C w przypadku dłuższego przechowywania.
13. Kartridże i tłoczki należy usunąć ze stojaków na kartridże Maxwell® i wyrzucić jako odpady niebezpieczne zgodnie z procedurami obowiązującymi w instytucji. Kartridże i tłoczki są przeznaczone do stosowania z pojedynczą próbką tkanki FFPE w ramach jednego cyklu pracy, natomiast probówki elucyjne są przeznaczone do jednorazowego użytku. Nie wolno ponownie używać kartridży Maxwell® CSC Cartridges, tłoczków CSC/RSC Plungers ani probówek Elution Tubes do więcej niż jednej próbki.



8. Efektywność przepływu pracy

Przebieg pracy DNA/RNA sequential zestawu Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit łączy w jednym protokole metodę ekstrakcji wyłącznie DNA i metodę ekstrakcji wyłącznie RNA. Dlatego też podczas stosowania przepływu pracy DNA/RNA Sequential najpierw przeprowadza się ekstrakcję DNA, a następnie ekstrakcję RNA z tej samej próbki tkanki FFPE. Przepływ pracy DNA/RNA sequential został zaprojektowany w wyjątkowy sposób, aby wyodrębnić DNA i RNA do oddzielnych próbek elucyjnych, jednocześnie oszczędzając informacje o śledzeniu próbki. Jednocześnie śledzenie próbki jest na tyle elastyczne, że można wprowadzać modyfikacje między dwoma cyklami.

Krok	Dostępne przepływy pracy w metodzie sekwencyjnej DNA/RNA		
	Sekwencyjne DNA/RNA	Tylko DNA	Tylko RNA
Dodać próbki, kartridże i informacje o śledzeniu próbek	Dodać	Dodać	
Pierwsza ekstrakcja (DNA) metodą sekwencyjną	X	X	
Usuwanie eluatu DNA z urządzenia	X	X	
Poprawić próbki, kartridże i informacje o śledzeniu próbek	X	Usunąć	Dodać
Druga ekstrakcja (RNA) metodą sekwencyjną	X		X
Usuwanie eluatu RNA z urządzenia	X		X

9. Instrukcje postępowania po ekstrakcji

Ustalić, czy uzysk i czystość próbki wyekstrahowanego kwasu nukleinowego spełniają wymogi wejściowe dla dalszego oznaczenia przed ich wykorzystaniem w tym oznaczeniu. Wydajność zestawu oceniano na podstawie amplifikacji i ilościowego oznaczania wyekstrahowanych kwasów nukleinowych przy użyciu barwnika fluorescencyjnego. Inne metody ilościowego określania, w tym absorbancja, mogą nie korelować z amplifikacją kwasów nukleinowych lub ilościowym określaniem opartym na fluorescencji. Odczyty absorbancji kwasów nukleinowych wyekstrahowanych z próbek tkanek FFPE mogą zawyżać uzysk; zaleca się stosowanie bardziej szczegółowych metod określania uzysku dla kwasów nukleinowych.

10. Ocena wydajności analitycznej

Wydajność analityczną zestawu Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit oceniono przy użyciu próbek tkanek ludzkich FFPE przetworzonych na instrumentach Maxwell® CSC i Maxwell® CSC 48 Instruments. Wydajność ekstrakcji DNA oceniono przy użyciu przepływu pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential, ponieważ przepływ pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA jest identyczny z początkową częścią ekstrakcji DNA w sekwencyjnym przepływie pracy w procesie ekstrakcji Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential.

10.A. Ilość, jakość i zdolność do amplifikacji DNA

Tabela 2. Amplifikacja DNA wyekstrahowanego przy użyciu przepływów pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential i TNA. DNA i całkowity kwas nukleinowy wyekstrahowano oddzielnie z sześciu pojedynczych replik próbek pojedynczych, typowych rozmiarów przekrojów tkanek FFPE piersi, wątroby i macicy, stosując odpowiednio przepływy pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential i TNA. Wyekstrahowane DNA i całkowity kwas nukleinowy wykorzystano w teście qPCR do amplifikacji rybonukleazy P H1 (102 pb) w celu oceny ilości DNA, a także genu odwrotnej transkryptazy telomerazy (TERT) (164 pb) jako dłuższego celu DNA w celu oceny jakości DNA. Przedstawiono średnie stężenie DNA dla każdego zestawu powtórzeń. Średni uzysk DNA ze wszystkich próbek tkankowych FFPE wynosiła co najmniej 100 kopii/μl rybonukleazy P H1 i co najmniej 25 kopii/μl TERT.

Przepływ pracy Maxwell® CSC XtractAll	Typ tkanki FFPE	Średnie stężenie DNA (kopie/μl)	
		RNaza P H1	TERT
DNA/RNA Sequential	Pierś	5333	7162
	Wątroba	10 363	19 609
	Macica	2762	936
TNA	Pierś	1234	3815
	Wątroba	3718	11 894
	Macica	1173	894

Tabela 3. Skalowalność wydajności DNA przy użyciu przepływów pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential i TNA. DNA i całkowity kwas nukleinowy wyekstrahowano oddzielnie z sześciu pojedynczych replik próbek jednego i dwóch typowych rozmiarów przekrojów tkanek FFPE piersi, wątroby i macicy, stosując odpowiednio przepływy pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential i TNA. Wyekstrahowane DNA i całkowity kwas nukleinowy wykorzystano w teście qPCR do amplifikacji rybonukleazy P H1 (102 pb) w celu oceny ilości DNA, a także TERT (164 pb) jako dłuższego celu genu w celu oceny jakości DNA. Przedstawiono średni stosunek stężenia DNA pomiędzy jednym a dwoma przekrojami tkanki FFPE dla każdego zestawu replikatów. Średni stosunek stężenia DNA wyekstrahowanego z dwóch wycinków do jednego wycinka próbek tkanki FFPE wynosił co najmniej 1,4 zarówno dla rybonukleazy P H1, jak i TERT.

Przepływ pracy Maxwell® CSC XtractAll	Typ tkanki FFPE	Średni stosunek stężenia DNA z dwóch i jednego wycinka tkanki FFPE	
		RNaza P H1	TERT
DNA/RNA Sequential	Pierś	2,1	2,2
	Wątroba	1,7	1,7
	Macica	2,1	2,3
TNA	Pierś	1,9	2,0
	Wątroba	2,1	2,2
	Macica	1,9	1,9

10.B. Ilość, jakość i zdolność do amplifikacji RNA

Tabela 4. Amplifikacja RNA wyekstrahowanego przy użyciu przepływów pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, DNA/RNA Sequential i TNA. RNA i całkowity kwas nukleinowy wyekstrahowano z sześciu indywidualnych replik pojedynczych, typowych pod względem wielkości wycinków tkanek FFPE piersi, wątroby i macicy. Do ekstrakcji RNA wykorzystano przepływy pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA lub DNA/RNA Sequential; do ekstrakcji całkowitego kwasu nukleinowego wykorzystano przepływ pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE TNA. Wyekstrahowane RNA i całkowity kwas nukleinowy wykorzystano w teście RT-qPCR do amplifikacji RNA fosforybozylotransferazy hipoksantynowej 1 (HPRT1) (100 pb) w celu oceny ilości RNA, a także RNA β-aktyny (ACTB) (171 pb) jako dłuższego celu RNA w celu oceny jakości RNA. Przedstawiono średnie stężenie RNA dla każdego zestawu powtórzeń. Średni uzysk RNA ze wszystkich próbek tkanek FFPE wyniosła co najmniej 0,032 ng/μl dla docelowych RNA HPRT1 i ACTB.

Przepływ pracy Maxwell® CSC XtractAll	Typ tkanki FFPE	Średnie stężenie RNA (ng/μl)	
		HPRT1	ACTB
RNA	Pierś	0,27	0,17
	Wątroba	0,71	0,30
	Macica	0,91	0,30
DNA/RNA Sequential	Pierś	0,52	0,21
	Wątroba	0,76	0,21
	Macica	0,64	0,13
TNA	Pierś	0,91	0,21
	Wątroba	1,11	0,09
	Macica	1,45	0,28

10.B. Ilość, jakość i zdolność do amplifikacji RNA (ciąg dalszy)

Tabela 5. Skalowalność wydajności RNA przy użyciu przepływów pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, DNA/RNA Sequential i TNA. RNA i całkowity kwas nukleinowy wyekstrahowano z sześciu indywidualnych replik jednego lub dwóch, typowych pod względem wielkości wycinków tkanek FFPE piersi, wątroby i macicy. RNA wyekstrahowano przy użyciu przepływów pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA lub DNA/RNA Sequential; do całkowity kwas nukleinowy został wyekstrahowany przy użyciu przepływu pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE TNA. Wyekstrahowane RNA i całkowity kwas nukleinowy wykorzystano w teście RT-qPCR do amplifikacji RNA HPRT1 (100 pb) w celu oceny ilości RNA, a także RNA ACTB (171 pb) jako dłuższego celu RNA w celu oceny jakości RNA. Przedstawiono średni stosunek stężenia RNA pomiędzy jednym a dwoma przekrojami dla każdego zestawu replikatów. Średni stosunek stężenia RNA wyekstrahowanego z dwóch wycinków wobec jednego wycinka próbek tkanki FFPE wynosił co najmniej 1,4 zarówno dla HPRT1, jak i ACTB.

Przepływ pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE	Typ tkanki FFPE	Średni stosunek stężenia RNA z dwóch i jednego wycinka tkanki FFPE	
		HPRT1	ACTB
RNA	Pierś	1,6	1,4
	Wątroba	1,7	1,5
	Macica	1,8	1,6
DNA/RNA Sequential	Pierś	1,8	1,6
	Wątroba	1,7	1,5
	Macica	2,1	2,0
TNA	Pierś	1,4	1,6
	Wątroba	2,6	2,2
	Macica	1,9	1,7

10.C. Kwantyfikacja oparta na barwnikach fluorescencyjnych

Tabela 6. Kwantyfikacja DNA i RNA na bazie barwników fluorescencyjnych przy użyciu przepływów pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential and RNA. DNA i RNA wyekstrahowano z sześciu indywidualnych replik pojedynczych, typowych pod względem wielkości wycinków tkanek FFPE piersi, wątroby i macicy. Ekstrakcję DNA przeprowadzono przy użyciu metody Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential; ekstrakcję RNA przeprowadzono przy użyciu przepływów pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA lub DNA/RNA Sequential. Ilość wyekstrahowanego DNA oceniano za pomocą barwnika fluorescencyjnego specyficznego dla dwuniciowego DNA, natomiast ilość wyekstrahowanego RNA oceniano za pomocą barwnika fluorescencyjnego specyficznego dla RNA. Średnie uzyski DNA i RNA dla każdego zestawu replikatów obliczono przy użyciu odzyskanych objętości elucji i przedstawiono poniżej. Średni uzysk DNA i RNA wyekstrahowanych ze wszystkich próbek tkanek FFPE, określona ilościowo metodą opartą na barwniku fluorescencyjnym, wyniosła co najmniej 100 ng.

Analit	Przepływ pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE	Typ tkanki FFPE	Wydajność (ng)
DNA	DNA/RNA Sequential	Pierś	279
		Wątroba	367
		Macica	154
RNA	RNA	Pierś	445
		Wątroba	2199
		Macica	1153
	DNA/RNA Sequential	Pierś	616
		Wątroba	1330
		Macica	736

10.D. Odtwarzalność

Tabela 7. Odtwarzalność ekstrakcji kwasów nukleinowych przy użyciu przepływów pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, DNA/RNA Sequential i TNA. Aby ocenić odtwarzalność ekstrakcji kwasów nukleinowych, jeden użytkownik wykonał trzy indywidualne przebiegi ekstrakcji dla każdego z przepływów pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, DNA/RNA Sequential i TNA przy użyciu połączonych, wstępnie przetworzonych próbek tkanek FFPE. Eluaty wykorzystano w teście qPCR w celu określenia ilości DNA skierowanego do rybonukleazy P H1 (102 pb) lub w teście RT-qPCR w celu określenia ilości RNA skierowanego do RNA HPRT1 (100 pb). Procentowy współczynnik zmienności międzyseryjnej i wewnątrzseryjnej obliczono dla ekstrakcji DNA i RNA dla różnych przepływów pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE przy użyciu odzyskanych objętości elucji i przedstawiono poniżej. Wszystkie uzyskane współczynniki zmienności wyniosły mniej niż 15%.

Analit	Przepływ pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE	Numer przebiegu	Procentowy współczynnik zmienności wewnątrz serii	Procentowy współczynnik zmienności między seriami
DNA	DNA/RNA Sequential	1	13%	10%
		2	8%	
		3	7%	
	TNA	1	12%	11%
		2	9%	
		3	8%	
RNA	RNA	1	14%	12%
		2	9%	
		3	13%	
	DNA/RNA Sequential	1	5%	6%
		2	6%	
		3	8%	
	TNA	1	14%	11%
		2	5%	
		3	12%	

10.E. Inhibicja amplifikacji ze względu na substancje zakłócające

Tabela 8. Ocena inhibicji amplifikacji DNA wyekstrahowanego przy użyciu przepływów pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential i TNA. DNA lub całkowity kwas nukleinowy wyekstrahowano z czterech indywidualnych replik jednego lub dwóch, typowych pod względem wielkości wycinków tkanek FFPE piersi, wątroby i macicy. Do ekstrakcji DNA wykorzystano przepływ pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential; do ekstrakcji całkowitego kwasu nukleinowego wykorzystano przepływ pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE TNA. Do oceny wpływu substancji zakłócających w badaniu qPCR ukierunkowanym na rybonukleazę P H1 (102 pb) wykorzystano dwa mikrolitry nierozcieńczonego i czterokrotnie rozcieńczonego roztworu każdego z tych samych eluatów DNA lub całkowitego kwasu nukleinowego. Dokonano porównania wartości C_q z nierozcieńczonych i czterokrotnie rozcieńczonych eluatów w celu oceny inhibicji w ramach poszczególnych eluatów z wykorzystaniem wartości ΔC_q wynoszącej 2 ± 1 cykl, co wskazuje na brak inhibicji. Wartości ΔC_q dla wszystkich eluatów dla poszczególnych próbek wahały się od 1,9 do 2,5, wskazując na niewykrywalne zahamowanie amplifikacji DNA przy użyciu DNA lub całkowitego kwasu nukleinowego wyekstrahowanego przy użyciu zestawu Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit.

Typ tkanki FFPE	Numer próbki	Liczba sekcji	Przepływ pracy TNA	Przepływ pracy DNA/RNA Sequential
Pierś	1	1	2,1	2,0
	2		2,0	2,1
	3		2,1	2,1
	4		2,1	2,2
	1	2	2,1	2,3
	2		2,2	2,2
	3		2,2	2,4
	4		2,1	2,3
Wątroba	1	1	2,0	2,1
	2		2,0	2,0
	3		2,0	2,2
	4		2,2	2,3
	1	2	1,9	2,1
	2		2,1	2,0
	3		2,1	2,3
	4		2,2	2,2

10.E. Inhibicja amplifikacji ze względu na substancje zakłócające(ciąg dalszy)

Typ tkanki FFPE	Numer próbki	Liczba sekcji	Przepływ pracy TNA	Przepływ pracy DNA/RNA Sequential
Macica	1	1	2,3	2,5
	2		2,3	2,2
	3		2,2	2,3
	4		2,2	2,4
	1	2	2,1	2,2
	2		2,0	2,1
	3		2,0	2,0
	4		2,1	2,2

Tabela 9. Ocena inhibicji amplifikacji RNA wyekstrahowanego przy użyciu przepływów pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, DNA/RNA Sequential i TNA. RNA lub całkowity kwas nukleinowy wyekstrahowano z czterech indywidualnych replik jednego lub dwóch, typowych pod względem wielkości wycinków tkanek FFPE piersi, wątroby i macicy. Do ekstrakcji RNA wykorzystano przepływy pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA lub DNA/RNA Sequential; do ekstrakcji całkowitego kwasu nukleinowego wykorzystano przepływ pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE TNA. Do oceny wpływu substancji zakłócających w badaniu RT-qPCR ukierunkowanym na rybonukleazę HPRT1 RNA (100 pb) wykorzystano dwa mikrolitry nierozcieńczonego i czterokrotnie rozcieńczonego roztworu każdego z tych samych eluatów RNA lub całkowitego kwasu nukleinowego. Dokonano porównania wartości C_q z nierozcieńczonych eluatów i czterokrotnie rozcieńczonych eluatów w celu oceny inhibicji w ramach poszczególnych eluatów z wykorzystaniem ΔC_q wynoszącej 2 ± 1 cykl, co wskazuje na brak inhibicji. Wartości ΔC_q dla wszystkich eluatów dla poszczególnych próbek wahały się od 1,2 do 2,7, wskazując na niewykrywalne zahamowanie amplifikacji RNA przy użyciu RNA lub całkowitego kwasu nukleinowego wyekstrahowanego za pomocą zestawu Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit.

Typ tkanki FFPE	Numer próbki	Liczba sekcji	Przepływ pracy RNA	Przepływ pracy TNA	Przepływ pracy DNA/RNA Sequential
Pierś	1	1	2,7	1,7	2,4
	2		1,6	1,5	1,4
	3		2,0	1,4	1,5
	4		1,5	1,7	1,7
	1	2	1,4	1,5	1,6
	2		1,7	1,4	1,5
	3		1,8	2,3	2,1
	4		2,4	1,7	1,6

Typ tkanki FFPE	Numer próbki	Liczba sekcji	Przepływ pracy RNA	Przepływ pracy TNA	Przepływ pracy DNA/RNA Sequential
Wątroba	1	1	1,7	1,3	1,5
	2		1,6	2,2	1,6
	3		1,9	1,5	1,6
	4		1,9	1,5	2,1
	1	2	1,8	1,8	1,4
	2		1,3	1,5	1,9
	3		1,7	1,8	2,0
	4		1,9	2,1	1,2
Macica	1	1	1,8	1,7	2,1
	2		1,7	2,3	1,4
	3		2,0	2,0	1,9
	4		1,8	2,1	1,6
	1	2	2,0	2,2	1,8
	2		1,7	1,4	1,2
	3		1,9	1,5	1,6
	4		1,7	1,8	2,1

10.F. Zanieczyszczenie krzyżowe

Ocena zanieczyszczenia krzyżowego została przeprowadzona przy użyciu zestawu Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit z urządzeniami Maxwell® CSC Instruments poprzez naprzemienne umieszczanie kartridży Maxwell® CSC zawierających próbki tkanek ludzkich FFPE i próbek tkanek mysich FFPE na stojaku na kartridże Maxwell® CSC/RSC w ramach jednego cyklu ekstrakcji. Zbadano przepływy pracy Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, DNA/RNA Sequential i TNA. Do identyfikacji potencjalnego zanieczyszczenia krzyżowego pochodzącego z sąsiednich kartridży Maxwell® CSC cartridges wykorzystano obecność ludzkiego DNA lub RNA w próbkach myszy, ocenionych odpowiednio za pomocą qPCR lub RT-qPCR. Wszystkie próbki tkanki mysiej FFPE, które poddano obróbce w pozycjach laboratoryjnych sąsiadujących z próbkami tkanki ludzkiej FFPE, miały wartości C_q wyższe od wartości C_q uzyskanych dla najniższych stężeń DNA lub RNA na odpowiedniej krzywej standardowej.

11. Ocena wydajności klinicznej

Ocena wydajności klinicznej zestawu Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit została przeprowadzona przez zewnętrzne laboratorium kliniczne z wykorzystaniem urządzenia Maxwell® CSC 48 Instrument. DNA, RNA i całkowity kwas nukleinowy (TNA) ekstrahowano z ludzkich próbek tkanek FFPE przy użyciu różnych metod ekstrakcji Maxwell® CSC XtractAll FFPE, a kwasy nukleinowe amplifikowano w teście istotnym klinicznie.

11.A. Przebieg pracy ekstrakcji DNA

DNA zostało wyekstrahowane z ludzkich próbek tkanek FFPE od dwunastu indywidualnych dawców przez jednego badacza przy użyciu zarówno metody Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA, jak i standardowej metody oczyszczania DNA w zewnętrznym laboratorium klinicznym dla odniesienia. Uzyskane eluaty DNA analizowano za pomocą testu qPCR przy użyciu cobas® EGFR Mutation Test. Wyniki testu opartego na amplifikacji były zgodne między wszystkimi dwunastoma próbkami DNA wyekstrahowanymi za pomocą zestawu Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit a laboratoryjną referencyjną metodą ekstrakcji DNA.

11.B. Przebieg pracy ekstrakcji RNA

RNA zostało wyekstrahowane z ludzkich próbek tkanek FFPE od dwunastu indywidualnych dawców przez jednego badacza przy użyciu zarówno metody Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, jak i standardowej metody oczyszczania RNA w zewnętrznym laboratorium klinicznym dla odniesienia. Otrzymane eluaty RNA analizowano metodą RT-qPCR z użyciem starterów fosforybozylotransferazy hipoksantynowej 1 (HPRT1). Wyniki testu amplifikacji były zgodne między wszystkimi dwunastoma próbkami RNA wyekstrahowanymi za pomocą zestawu Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit a laboratoryjną referencyjną metodą ekstrakcji DNA.

11.C. Przebieg pracy ekstrakcji całkowitego kwasu nukleinowego

Całkowity kwas nukleinowy (TNA) został wyekstrahowany z ludzkich próbek tkanek FFPE od dwunastu indywidualnych dawców przez jednego badacza przy użyciu metody Maxwell® CSC XtractAll FFPE TNA. Do oddzielnej ekstrakcji DNA i RNA, przy użyciu referencyjnych metod ekstrakcji DNA i RNA stosowanych przez zewnętrzne laboratorium kliniczne, wykorzystano sekcje pochodzące z tych samych dwunastu próbek tkanek FFPE.

Uzyskane eluaty TNA z zestawu Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit i eluaty DNA z laboratoryjnej referencyjnej metody ekstrakcji DNA analizowano za pomocą testu qPCR przy użyciu cobas® EGFR Mutation Test. Dodatkowo eluaty TNA z zestawu Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit i eluaty RNA z laboratoryjnej referencyjnej metody ekstrakcji RNA analizowano za pomocą testu RT-qPCR ze starterami HPRT1. Wyniki amplifikacji w testach EGFR Mutation i HPRT1 wykazały zgodność między wszystkimi próbkami TNA wyekstrahowanymi przy użyciu zestawu Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit a DNA lub RNA wyekstrahowanymi przy użyciu odpowiednich laboratoryjnych metod referencyjnych.

11.D. Przepływ pracy ekstrakcji sekwencyjnego DNA/RNA

DNA i RNA zostały wyekstrahowane do oddzielnych eluatów z ludzkich próbek tkanek FFPE od dwunastu indywidualnych dawców przez dwóch badaczy przy użyciu metody Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential. Do oddzielnej ekstrakcji DNA i RNA, przy użyciu referencyjnych metod oczyszczania DNA i RNA stosowanych przez zewnętrzne laboratorium kliniczne, wykorzystano sekcje pochodzące z tych samych dwunastu próbek tkanek FFPE.

Uzyskane eluaty DNA z systemu Maxwell® CSC i z laboratoryjnej referencyjnej metody ekstrakcji DNA analizowano za pomocą testu qPCR przy użyciu cobas® EGFR Mutation Test. Wyniki amplifikacji wykazały zgodność wszystkich próbek DNA wyekstrahowanych za pomocą zestawu Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit przy użyciu przepływu pracy DNA/RNA Sequential i laboratoryjnej referencyjnej metody ekstrakcji DNA, a także między dwoma badaczami.

Podobnie wyniki eluatów RNA z zestawu Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit i z laboratoryjnej referencyjnej metody ekstrakcji RNA analizowano za pomocą testu RT-qPCR ze starterami HPRT1. Wyniki amplifikacji wykazały zgodność wszystkich próbek RNA wyekstrahowanych za pomocą zestawu Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit przy użyciu przepływu pracy DNA/RNA Sequential i laboratoryjnej referencyjnej metody ekstrakcji DNA, a także między dwoma badaczami.

12. 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. E-mail: **techserv@promega.com**

Objawy	Przyczyny i komentarze
Niższe niż oczekiwane stężenie kwasu nukleinowego w eluacie (typowy wycinek tkanki FFPE powinien pozwolić na uzyskanie amplifikowalnego kwasu nukleinowego w oparciu o wielkość tkanki, skład komórkowy, stan utrwalenia formaliną i postępowanie proceduralne)	Wydajność zestawu została oceniona poprzez wyizolowanie kwasów nukleinowych z maksymalnie czterech wycinków tkanki FFPE o maksymalnej grubości 20 µm. Używać tylko wycinków zgodnych ze specyfikacją rozmiaru. Zestaw jest zaprojektowany do użytku z próbkami tkanek FFPE. Nie jest zaprojektowany do użytku z próbkami tkanek innymi niż FFPE, takimi jak świeże lub zamrożone próbki tkanek. Czasy inkubacji i temperatury były badane w celu zapewnienia optymalnego uzysku kwasu nukleinowego. Zestaw nie jest przeznaczony do użytku z próbkami tkanek FFPE przygotowanymi przy użyciu utrwalaczy innych niż 10% obojętnie buforowana formalina. Należy skontaktować się z laboratorium patologii lub dostawcą w celu potwierdzenia, czy nie użyto innego utrwalacza. Zestaw Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit nie był testowany z wybarwionymi szkiełkami lub wycinkami tkanek FFPE. Proces ekstrakcji należy powtórzyć z użyciem bezbarwnego szkiełka podstawowego lub wycinka. Wydajność zestawu oceniano na podstawie amplifikacji i ilościowego oznaczania wyekstrahowanych kwasów nukleinowych przy użyciu barwnika fluorescencyjnego. Inne metody ilościowego określania, w tym absorbancja, mogą nie korelować ze stężeniami opartymi na amplifikacji i fluorescencji. Mogło dojść do wprowadzenia RNaz lub DNaz podczas przetwarzania lub ilościowego oznaczania próbek. Aby dowiedzieć się, jak stworzyć środowisko wolne od rybonukleaz, należy zapoznać się z rozdziale 13. Koktajl DNazy I został dodany do kartridża zgodnie z niewłaściwym przebiegiem pracy. Koktajl DNazy I należy dodawać wyłącznie do dołka nr 7 kartridża w przypadku przepływów pracy RNA i RNA Sequential. Izopropanol nie został dodany do kartridża zgodnie z właściwym przebiegiem pracy (RNA, TNA lub RNA Sequential) lub został dodany do niewłaściwego dołka kartridża. W aparacie zastosowano nieprawidłową metodę ekstrakcji Maxwell®. Potwierdzić, że zastosowana metoda ekstrakcji Maxwell® jest zgodna z przygotowaniem kartridża dla danego przepływu pracy. Do próbek do elucji nie dodano Nuclease-Free Water lub dodano nieprawidłową objętość. Zestaw przetestowano przy objętości elucji 50 µl.

Objawy

Przyczyny i komentarze

Jakość poniżej oczekiwań (eluat zawiera znacznie pofragmentowane kwasy nukleinowe lub inhibitory dla dalszego oznaczania analitycznego)

Wycinek(-ki) tkanki FFPE użyty(-e) do ekstrakcji może(-gą) zawierać pofragmentowane kwasy nukleinowe ze względu na warunki utrwalania formaliną lub sposób obchodzenia się z nią. Jeżeli kwasy nukleinowe zostaną pofragmentowane przed zastosowaniem metody ekstrakcji, pofragmentowany kwas nukleinowy zostanie oczyszczony za pomocą tego zestawu. Należy powtórzyć ekstrakcję przy użyciu sąsiedniego wycinka w celu oceny, czy problem dotyczy wycinka tkanki FFPE, czy procesu ekstrakcji.

Niektóre testy amplifikacji są szczególnie wrażliwe na inhibitory. Dalsze kontrole testów powinny zidentyfikować obecność inhibitorów amplifikacyjnych w eluacie. Użytkownik jest odpowiedzialny za sprawdzenie kompatybilności produktu z oznaczeniami na dalszych etapach będących przedmiotem zainteresowania.

Obecność w eluacie różnych typów kwasów nukleinowych (DNA i RNA) może powodować konkurencję w dalszych testach. W przypadku konkurencji należy zoptymalizować test pod kątem interesującego analitu.

DNA obecne w eluatach RNA, co może zakłócać dalsze badania

Koktajl DNazy I nie został dodany do kartridża zgodnie z właściwym przebiegiem pracy (RNA lub sekwencyjnym RNA) lub został dodany do niewłaściwego dołka kartridża. Koktajl DNazy I należy dodawać wyłącznie do dołka nr 7 kartridża.

Podczas wykonywania przepływu pracy DNA/RNA Sequential nie wyjęto próbówki Elution Tube ze stojaka na kartridże i zastąpiono ją nową próbówką elucyjną i buforem elucyjnym.

RNA obecne w eluatach DNA, co może zakłócać dalsze badania

Eluaty DNA można poddać działaniu rybonukleazy w celu usunięcia RNA obecnego w próbkach DNA, jeśli wymagane jest DNA wolne od RNA.

Metoda DNA jest przypadkowo lub celowo przerywana w trakcie sekwencyjnego przepływu pracy DNA/RNA.

Próbki RNA można odzyskać, poddając kartridż działaniu metody Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA.

Przenoszenie żywicy do eluatów

Niestrawioną tkankę FFPE przeniesiono do kartridża. Jeżeli po upływie 1-godzinnej inkubacji pozostanie jakaś niestrawiona tkanka FFPE (sekcja 5.A), należy odwirować próbówki z próbką przy 10 000 × g przez 20 sekund w celu oddzielenia niestrawionego materiału. Nie wolno przenosić do kartridża materiału granulowanego lub niestrawionego.

Przenoszenie żywicy w pewnym zakresie jest zjawiskiem normalnym i nie ma wpływu na wydajność dalszych etapów badania. Jeśli to konieczne, użyć Elution Magnet ([Cat.# AS4017, Cat.# AS4018 lub oba]; dostępne oddzielnie), aby przenieść eluat do nowej próbówki. Patrz Rozdział 14, Powiązane produkty.

12. Rozwiązywanie problemów (ciąg dalszy)

Objawy	Przyczyny i komentarze
Brązowe smugi żywicy na ściankach próbek elucyjnych.	Resztki parafiny lub materiału próbki przylegają do ścianki próbki w trakcie przetwarzania. Tego typu rozmazywanie jest zjawiskiem normalnym, różni się w zależności od składu próbki (np. liczby zwojów, zawartości parafiny) i nie wpływa na jakość eluatu ani na wydajność dalszego procesu.
Odzyskana objętość eluatu jest zbyt mała lub zbyt duża do wykorzystania w dalszych analizach	Objętości elucji wynoszące 30–100 µl przetestowano przy użyciu zestawu Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit i wyniki były dobre.

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.

13. Tworzenie środowiska wolnego od rybonukleaz

Rybonukleazy są bardzo trudne do zdeaktywowania. 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 pleśń, które mogą występować na cząsteczkach kurzu unoszących się w powietrzu. Aby zapobiec zanieczyszczenia 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 podejrzewanym 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.

14. Powiązane produkty

Urządzenie i akcesoria

Produkt	Ilość	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument*	1 szt.	AS6000
Maxwell® CSC 48 Instrument*	1 szt.	AS8000
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 szt.	SP6019
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	1 szt.	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	1 szt.	AS8402
Microtube, 1,5 ml	1000 szt./opakowanie	V1231
Elution Magnet, 16 pozycji	1 szt.	AS4017
Elution Magnet, 24 pozycje	1 szt.	AS4018

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

Maxwell® CSC Reagent Kits

Listę dostępnych zestawów odczynników Maxwell® CSC można znaleźć na stronie www.promega.com.

© 2025 Promega Corporation. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Maxwell jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Promega Corporation.

cobas jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Roche Diagnostics Operations, Inc.

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.