

TECHNICKÁ PŘÍRUČKA

Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit

Návod k použití produktu
AS1580

Pozor: Zacházejte s kazetami opatrně, těsnicí hrany mohou být ostré.

Poznámka: Chcete-li používat sadu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit, je potřeba do nástroje Maxwell® CSC nebo Maxwell® CSC 48 Instrument nahrát metodu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA.

Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit

Veškerá technická literatura je dostupná na: www.promega.com/protocols/
 Chcete-li ověřit, že používáte nejaktuálnější verzi této technické příručky, navštivte webovou stránku.
 Máte-li otázky k používání tohoto systému, pošlete e-mail technické službě Promega Technical Services: techserv@promega.com

1. Popis.....	2
2. Součásti produktu, podmínky skladování a klíč k symbolům	3
3. Zamýšlený účel / zamýšlené použití výrobku	5
4. Omezení pro používání produktu	5
5. Příprava vzorků plazmy	5
6. Příprava kazet Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges	6
7. Nastavení a spuštění přístroje Maxwell® Instrument	9
8. Po purifikaci	10
9. Hodnocení analytické účinnosti	11
9.A. Množství a kvalita ccfDNA	11
9.B. Amplifikovatelnost a inhibice (interferující látky)	12
9.C. Kvantifikace ccfDNA pomocí fluorescenčních barviv a qPCR13	13
9.D. Reprodukovatelnost.....	13
9.E. Křížová kontaminace	14
9.F. Kompatibilita se sekvenováním nové generace	14
9.G. Kompatibilita s digitální PCR	14
10. Hodnocení klinické účinnosti.....	14
11. Co je třeba vzít v úvahu při práci s ccfDNA	15
11.A. Příprava plazmy.....	15
11.B. Doporučení pro kvantifikaci ccfDNA	15
12. Řešení problémů.....	16
13. Související produkty.....	17

Sada Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit je dostupná pouze v některých zemích.

1. Popis

Sada Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit se používá s přístroji Maxwell® Instruments uvedenými v tabulce 1 a poskytuje snadnou metodu pro účinnou, automatizovanou izolaci a purifikaci volné cirkulující DNA (ccfDNA) z vzorků lidské plazmy o objemu 1–4 ml. Přístroje Maxwell® CSC Instruments jsou navrženy pro používání s kazetami s předem nadávkovaným reakčním činidlem a s předem naprogramovanými postupy izolace, což maximalizuje jednoduchost a pohodlí. Metoda Maxwell® CSC Rapid ccfDNA dokáže zpracovat od jednoho až po maximální počet vzorků podporovaných přístroji Maxwell® CSC Instrument za méně než 30 minut. Extrahovanou ccfDNA lze přímo použít v různých následných aplikacích, jako je například digitální PCR a sekvenování nové generace (NGS).

Tabulka 1. Podporované přístroje.

Přístroj	Cat.#	Technická příručka	Maximální počet vzorků
Maxwell® CSC	AS6000	TM457	16
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623	48

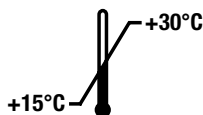
Princip metody

Sada Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit purifikuje ccfDNA ze vzorků plazmy pomocí paramagnetických částic, které poskytují mobilní pevnou fázi pro optimalizaci zachycení vzorku, promývání a purifikaci ccfDNA. Přístroje Maxwell® Instruments jsou přístroje pro manipulaci s magnetickými částicemi, které v prvních třech jamkách předem naplněné kazety účinně vážou ccfDNA na paramagnetické částice. Vzorky se před elucí ccfDNA zpracovávají sérií opakovaných promývání. Tento přístup magnetického zachytávání zabraňuje běžným problémům, jako jsou např. ucpané hroty nebo částečné přesuny činidla, které způsobují suboptimální provedení purifikace u jiných běžně používaných automatických systémů.

2. Součásti produktu, podmínky skladování a klíč k symbolům

PRODUKT	VELIKOST	CAT.#
Sada Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit	48 preparátů	AS1580

K diagnostickému použití in vitro. Pouze pro profesionální použití. Obsahuje dostatečné množství reakčních činidel pro 48 automatizovaných izolací ccfDNA ze vzorků plazmy. Kazety jsou určeny pouze k jednorázovému použití.



Obsahuje:

- 48 Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges (CSCS)
- 50 CSC/RSC Plungers
- 50 Elution Tubes (0,5 ml)
- 20 ml Elution Buffer (RCFD)
- 1 ml roztoku proteinázy K (PK2)

Podmínky skladování: Sadu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit uchovávejte při teplotách v rozmezí +15 °C až +30 °C.



Informace týkající se bezpečnosti: Podrobné informace týkající se bezpečnosti naleznete v bezpečnostních listech (SDS). Dodržujte směrnice příslušného pracoviště pro manipulaci se všemi infekčními látkami používanými v tomto systému a jejich likvidaci.



Kazety Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges (CSCS) jsou navrženy k použití s potenciálně infekčními látkami. Při manipulaci s infekčními látkami používejte odpovídající osobní ochranné prostředky (např. rukavice a ochranné brýle). Při používání s tímto systémem dodržujte institucionální směrnice pro manipulaci se všemi infekčními látkami a jejich likvidaci.

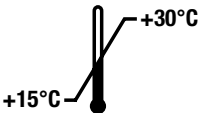


Pozor: Zacházejte s kazetami opatrně, těsnicí hrany mohou být ostré.

Další informace: Součásti sady Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit byly schváleny a prošly testy kontroly kvality pro společné používání. Nedoporučuje se smíchávat součásti sady z různých šarží sad. Používejte pouze součásti obsažené v příslušné sadě. Další informace týkající se bezpečnosti naleznete v bezpečnostním datovém listu, který je dostupný na adrese:

www.promega.com

Klíč k symbolům

Symbol	Vysvětlení	Symbol	Vysvětlení
	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro		Zplnomocněný zástupce
	Skladujte při teplotě +15 °C až +30 °C.		Výrobce
	Pozor		Dráždidlo
	Nebezpečí pro zdraví		Obsah stačí na „n“ testů
	Conformité Européenne		Varování. Biologické nebezpečí.
	Varování. Nebezpečí skřípnutí.		Katalogové číslo
	Číslo šarže		Nepoužívejte opakovaně

3. Zamýšlený účel / zamýšlené použití výrobku

Sada Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit je určena k používání v kombinaci s přístroji Maxwell® CSC Instrument a metodou Maxwell® CSC Rapid ccfDNA jako zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro (IVD) pro provádění automatického izolování volné cirkulující DNA (ccfDNA) ze vzorků lidské plazmy. Purifikovaná ccfDNA je vhodná pro použití v testech pro diagnostiku in vitro založených na amplifikaci, včetně digitální PCR.

Sada Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit je určena k používání při teplotě 15 °C až 30 °C. Používání mimo toto teplotní rozmezí může způsobit suboptimální výsledky.

Sada Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit je určena pouze pro profesionální použití. Diagnostické výsledky získané s použitím ccfDNA purifikované tímto systémem musí být interpretovány ve spojení s dalšími klinickými nebo laboratorními údaji.

4. Omezení pro používání produktu

Účinnost sady Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit byla hodnocena pomocí vzorků lidské plazmy získaných z plné krve, která byla odebrána do zkumavek Streck Cell-Free DNA BCT a zkumavek s antikoagulantem K₂EDTA. Za validaci používání sady Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit k purifikaci ccfDNA z plazmy odebrané do jiných zkumavek nese odpovědnost uživatel.

Během vývoje produktu byla prokázána vhodnost kyseliny nukleové purifikované sadou Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit k použití v sekvenování nové generace (NGS), nebyla však validována.

Do veškerých následných diagnostických aplikací využívajících ccfDNA purifikovanou sadou Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit musí být začleněny odpovídající kontroly. Uživatel je odpovědný za zajištění funkčních charakteristik potřebných pro následné diagnostické aplikace.

5. Příprava vzorků plazmy

Materiály dodávané uživatelem

- Plná krev nebo plazma
- Stolní centrifuga

Co se týče plné krve odebírané do zkumavek s EDTA, je třeba tuto krev ihned po odběru zpracovat nebo ji až do přípravy plazmy uchovávat při teplotě +2 °C až +10 °C. Plnou krev ze zkumavek s EDTA ≥ 10 minut centrifugujte při ≥ 2000 × g, čímž dojde k peletování červených a bílých krvinek. Pokud používáte prostředky Streck Cell-Free DNA BCT®, řiďte se pokyny výrobce. Po první centrifugaci zkumavek Streck Cell-Free DNA BCT® nebo zkumavek s EDTA opatrně ze zkumavek odpipetujte co nejvíce plazmy, aniž byste přitom narušili buffy coat, a přeneste ji do nové zkumavky. Aby bylo zajištěno, že nedojde k přenosu žádných bílých krvinek, plazmu znovu ≥ 10 minut centrifugujte při ≥ 2000 × g a supernatant přeneste do čisté zkumavky.

Plazmu můžete až 1 týden skladovat při teplotě +2 °C až +10 °C. Potřebujete-li plazmu skladovat déle, uchovávejte ji při teplotě –30 °C až –10 °C (nebo nižší než –65 °C). Plazmu nevystavujte cyklům zmrazení a rozmrazení. Co je třeba vzít v úvahu v případě použití zmrazené plazmy viz část 11.A.

6. Příprava kazet Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges

1. Před manipulací s kazetami Maxwell® CSC, plunžry CSC/RSC Plungers a zkumavkami Elution Tubes (0,5 ml) si vyměňte rukavice. Kazety, které chcete použít, umístěte do zásobníku (zásobníků) Maxwell® CSC/RCS tak, aby jamka č. 1 (první největší jamka na kazetě) byla nejdále od elučních zkumavek. Kazetu zatlačte směrem dolů, aby zacvakla na pozici. Opatrně odloupněte utěsnění tak, aby bylo kompletně odstraněno z horní strany kazety. Dbejte na to, aby před umístěním kazet do přístroje byla z kazet odstraněna veškerá těsnicí páska i jakékoliv zbytky lepidla.



Pozor: Zacházejte s kazetami opatrně. Těsnicí okraje mohou být ostré.

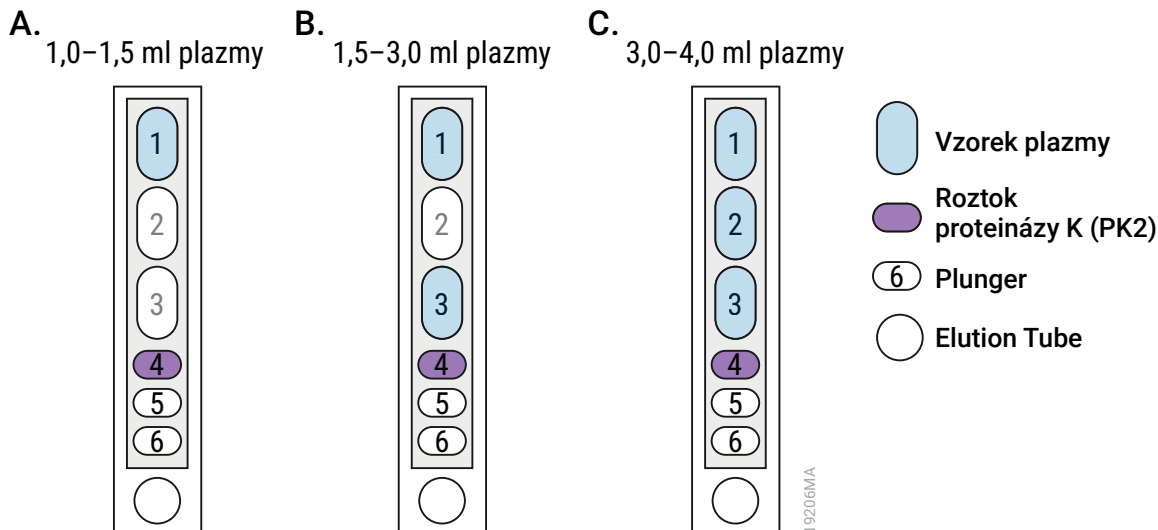
2. V závislosti na celkovém objemu vzorku plazmy přeneste plazmu na kazetu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA pouze do jamky č. 1 (první největší jamka), do jamek č. 1 a 3 (první a třetí největší jamka), nebo do jamek č. 1, 2 a 3 (tři největší jamky), jak je uvedeno v tabulce 2. Aby nedošlo ke křížové kontaminaci, vyměňujte mezi jednotlivými vzorky plazmy hroty pipet.

Tabulka 2. Přenos vzorků plazmy do různých jamek na kazetě Maxwell® CSC Cartridge v závislosti na vstupním objemu vzorku.

Objem vzorku (ml)	Pokyny k přenosu vzorku
1,0 ml až 1,5 ml plazmy	Plazmu dejte pouze do jamky č. 1. Viz obrázek 1, panel A.
> 1,5 ml až ≤ 3,0 ml plazmy	Stejné množství plazmy rozdělte do jamek č. 1 a 3. Viz obrázek 1, panel B.
3,0 ml až 4,0 ml plazmy	Stejné množství plazmy rozdělte do jamek č. 1, 2 a 3. Viz obrázek 1, panel C.

Poznámky:

- **Do jamky nedávejte více než 1,5 ml plazmy.**
- **Při vstupním objemu plazmy 1,0–1,5 ml se musí celý vzorek plazmy dát pouze do jamky č. 1.** Pokud dáte plazmu do jamek č. 2 a 3, bude to mít negativní vliv na obnovu ccfDNA.
- **Při vstupním objemu plazmy 1,5–3,0 ml se musí plazma dát pouze do jamek č. 1 a 3.** Pokud dáte plazmu do jiných jamek (např. do jamek č. 2 a 3 nebo č. 1 a 2), bude to mít negativní vliv na obnovu ccfDNA.



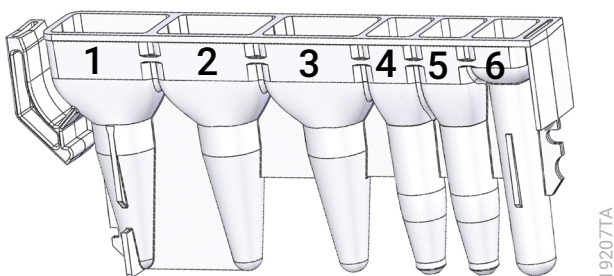
Obrázek 1. Přenos vzorků plazmy do různých jamek na kazetě Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridge závisí na vstupním objemu vzorku. Pokud objem vzorku plazmy činí 1,0–1,5 ml, přeneste celý vzorek do jamky č. 1 (**Panel A**). Pokud objem vzorku plazmy činí 1,5–3,0 ml, rozdělte plazmu rovnoměrně do jamek č. 1 a 3 (**Panel B**). Pokud objem vzorku plazmy činí 3,0–4,0 ml plazmy, rozdělte plazmu rovnoměrně do jamek č. 1, 2 a 3 (**Panel C**). Do jamky č. 4 naneste 10 µl roztoku proteinázy K (PK2). Do zkumavky Elution Tube (která je ve spodní části panelu znázorněna kroužkem) přidejte 50 µl pufru Elution Buffer (RCFD). Do jamky č. 6 umístěte plunžr.

- Do jamky č. 4 naneste 10 µl roztoku proteinázy K (PK2).
- Do jamky č. 6 na všech kazetách umístěte jeden plunžr.
- Prázdnou zkumavku Elution Tube umístěte do příslušné pozice na každé kazetě v zásobníku. Na dno každé zkumavky Elution Tube přidejte 50 µl pufru Elution Buffer (RCFD).
- Přejděte k části 7, Nastavení a spuštění přístroje Maxwell® Instrument.

Poznámky:

- Vzorek nebo činidlo rozlité na jakékoli části zásobníku je třeba očistit roztokem vody a čisticího prostředku, pak baktericidním sprejem nebo ubrouskem a následně vodou. Na žádné části přístroje Maxwell® Instrument nepoužívejte bělidlo.
- Používejte pouze 0,5ml zkumavky Elution Tube dodané v sadě; jiné zkumavky mohou být s přístrojem Maxwell® Instrument nekompatibilní.
- Dodaný pufr Elution Buffer (RCFD) je nezbytný k účinné obnově ccfDNA. Pufr Elution Buffer (RCFD) nenahrazujte žádným alternativním elučním pufrem. Použití jiných elučních pufů negativně ovlivní obnovu ccfDNA.
- Vyšší koncentrace ccfDNA lze dosáhnout použitím méně než 50 µl pufru Elution Buffer (RCFD), může však dojít ke snížení celkové výtěžnosti.

6. Příprava kazet Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges (pokračování)



Uživatel přidává do jamek:

1. Vzorek plazmy (podrobnosti viz tabulka 2 a obrázek 1)
nebo
- 1., 3. Vzorek plazmy
nebo
- 1., 2., 3. Vzorek plazmy
4. Roztok proteinázy K (PK2)
6. CSC/RSC Plunger

Obrázek 2. Kazeta Maxwell® CSC Cartridge. V závislosti na objemu vzorku se vzorek plazmy přidá do jamky č. 1 (jedná-li se o 1,0–1,5 ml vzorku), do jamek č. 1 a 3 (jedná-li se o 1,5–3,0 ml vzorku), nebo do jamek č. 1, 2 a 3 (jedná-li se o 3,0–4,0 ml vzorku). Do jamky č. 4 se nanese 10 µl roztoku proteinázy K (PK2) a do jamky č. 6 se přidá plunžr.



Obrázek 3. Nastavení a konfigurace zásobníku (zásobníků). Jak je naznačeno, přidá se do elučních zkumavek pufr Elution Buffer (RCFD). Plunžry jsou na kazetě na pozici č. 6. Vyobrazený zásobník je z přístroje Maxwell® CSC Instrument (Cat.# AS6000).

7. Nastavení a spuštění přístroje Maxwell® Instrument

Podrobné informace jsou uvedeny v návodu k obsluze konkrétního přístroje Maxwell® CSC Instrument. Viz tabulka 1.

1. Zapněte přístroj Maxwell® Instrument a Tablet PC. Přihlaste se do Tablet PC a dvojným kliknutím na ikonu na ploše spusťte softwarový režim Maxwell® CSC IVD. Přístroj bude pokračovat automatickou kontrolou a přesunutím všech pohyblivých částí do výchozí polohy.
2. Na domovské obrazovce stiskněte tlačítko **Start**.
3. Naskenujte nebo zadejte čárový kód v horním pravém rohu štítku Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit a stisknutím **OK** automaticky vyberte metodu ke spuštění (obrázek 4).

Poznámka: Čárový kód metody Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit je v přístrojích Maxwell® CSC Instruments požadován pro purifikaci ccfDNA. Štítek sady obsahuje dva čárové kódy. Čárový kód metody je označen na obrázku 4. Pokud nelze čárový kód naskenovat, kontaktujte Promega Technical Services.



Obrázek 4. Štítek sady indikující čárový kód k naskenování. Čárový kód k naskenování pro spuštění purifikačního cyklu je zobrazen v pravém horním rohu štítku sady v modrém rámečku.

4. Na obrazovce „Nastavení kazety“ zkontrolujte, zda je v horní části obrazovky zobrazena metoda Maxwell® CSC Rapid ccfDNA. Výběrem pozice kazety provedte výběr / zrušte výběr jakýchkoliv pozic používaných v tomto extrakčním cyklu. Zadejte veškeré požadované trasovací informace o vzorku a pokračujte stisknutím tlačítka **Pokračovat**.

Poznámka: Při používání přístroje Maxwell® CSC 48 Instrument můžete vybírat pozice kazet v jednotlivých zásobnících nebo zrušit jejich výběr stisknutím tlačítka **Přední** nebo **Zadní**.

5. Po otevření dvířek potvrďte, že byly provedeny všechny položky z kontrolního seznamu inspekce. Ověřte, že vzorky plazmy byly přidány do příslušných jamek na kazetách, roztok proteinázy K (PK2) byl přidán do jamky č. 4, v jamce č. 6 jsou plunžry, kazety byly zavedeny do přístroje a jsou přítomny odvíčkové eluční zkumavky s pufrům Elution Buffer (RCFD). Zásobník(y) obsahující připravené kazety přeneste na platformu přístroje Maxwell® Instrument.

Vkládání zásobníku/zásobníků Maxwell®: Držte zásobník na stranách, aby se předešlo uvolnění kazet z něj. Ujistěte se, že je zásobník vložený do přístroje Maxwell® Instrument s elučními zkumavkami nejbližší dvířkům. Nakloňte zadní stranu zásobníku dolů a umístěte jej do přístroje tak, aby zadní strana zásobníku směřovala k zadní straně platformy přístroje. Zatlačte čelní stranu zásobníku dolů, aby pevně dosedl na platformu přístroje. Pokud máte potíže s dosednutím zásobníku na platformu, zkontrolujte jeho správnou orientaci. Ujistěte se, že zásobník je rovně na platformě přístroje a těsně doléhá.

Poznámka: Zkontrolujte identifikátor na zásobníku Maxwell® s 24 pozicemi a určete, zda by měl být umístěn do přední nebo zadní části přístroje.

7. Nastavení a spuštění přístroje Maxwell® Instrument (pokračování)

6. Stisknutím tlačítka **Start** zahájte extrakční cyklus. Platforma se vysune a dvířka se zavřou.



Varování: Nebezpečí skřípnutí.

Poznámka: Pokud byl při používání přístroje Maxwell® Instrument s 48 pozicemi aktivován Vision System, budou zásobníky naskenovány při vysunutí platformy. Veškeré chyby v konfiguraci zásobníku (např. plunžry nejsou v jamce č. 6, eluční zkumavky nejsou přítomné a otevřené) způsobí návrat softwaru na obrazovku „Nastavení kazety“ a problémové pozice budou označeny vykřičníkem v červeném kroužku. Klepnutím na vykřičník zobrazíte popis chyby a můžete vyřešit všechny chybové stavy. Výběrem tlačítka **Start** zopakujete skenování zásobníku a zahájíte extrakční cyklus.

7. Přístroj Maxwell® Instrument ihned zahájí purifikační cyklus. Obrazovka bude zobrazovat prováděné kroky a přibližný zbývajíc čas v cyklu.

Poznámky:

- Stisknutím tlačítka **Přerušit** ukončíte cyklus. Všechny vzorky z ukončeného cyklu budou ztraceny.
- Pokud dojde k ukončení cyklu před dokončením, můžete být vyzváni ke zkontrolování, zda jsou plunžry stále založeny na plunžrové liště přístroje Maxwell® Instrument. Pokud jsou plunžry přítomny na plunžrové liště, proveďte při požadavku úkon **Čištění**. Pokud nejsou plunžry přítomny na plunžrové liště, můžete při požadavku rozhodnout o přeskočení úkonu **Čištění**. Vzorky budou ztraceny.

8. Po dokončení cyklu se zobrazí uživatelské rozhraní s hlášením, že metoda byla ukončena.

Konec cyklu

9. Otevřete dvířka podle pokynů na konci metody. Ověřte, že jsou plunžry na konci cyklu umístěny na kazetě v jamce č. 6. Pokud plunžry nejsou odstraněny z plunžrové lišty, postupujte podle pokynů v technické příručce pro příslušný přístroj Maxwell® Instrument (viz tabulka 1) a provedením procesu **Čištění** se pokuste plunžry vyložit.

10. Ihned po cyklu vyjměte zásobníky z přístroje, aby se předešlo odpařování eluátů. Vyjměte eluční zkumavky obsahující ccfDNA a uzavřete zkumavky.

Před spuštěním protokolu sanitace UV zářením se ujistěte, že jsou všechny vzorky purifikované kyseliny nukleové z přístroje odstraněny, aby se předešlo poškození purifikované nukleové kyseliny.



11. Ze zásobníku/zásobníků Maxwell® vyjměte kazety a plunžry. Zlikvidujte jako nebezpečný odpad podle předpisů příslušného pracoviště. Kazety Maxwell® CSC Cartridges, plunžry CSC/RSC Plungers a zkumavky Elution Tubes nepoužívejte opakovaně.

8. Po purifikaci

Před použitím vzorků purifikované ccfDNA v následném diagnostickém testu určete, zda vzorky splňují vstupní požadavky pro příslušný test. Pokud se purifikované vzorky ccfDNA nezpracovávají okamžitě, lze je až 7 dní uchovávat při teplotě 4 °C. Pro dlouhodobější skladování zmrazte vzorky při teplotě -20 °C, -70 °C nebo nižší. Konkrétní doporučení pro skladování vzorků ccfDNA a manipulaci s nimi naleznete v návodu k následným aplikacím.

9. Hodnocení analytické účinnosti

Analytická účinnost sady Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit byla hodnocena na přístroji Maxwell® CSC Instrument a Maxwell® CSC 48 Instrument s použitím vzorků lidské plazmy. K potvrzení spolehlivosti a vhodnosti ccfDNA izolované pomocí sady Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit pro následné aplikace byly hodnoceny klíčové metriky, jako například množství, kvalita, amplifikovatelnost, reprodukovatelnost a křížová kontaminace ccfDNA.

9.A. Množství a kvalita ccfDNA

Vzorky plazmy byly izolovány z krve šesti osob a ta byla odebrána buď do zkumavek K₂EDTA, nebo do zkumavek Streck Cell-Free DNA BCT®. ccfDNA byla extrahována z 1–4ml vzorků plazmy pomocí sady Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit. Množství a kvalita ccfDNA byly hodnoceny analýzou TapeStation (Agilent Technologies, Inc.), kdy se analyzoval jeden biologický replikát na podmínku a pozornost se zaměřovala na procento volné DNA (cfDNA) a největší velikost DNA, které odrážejí kvalitu fragmentu. Procento cfDNA odkazuje na poměr fragmentů DNA v rozmezí 50–700 bp ve srovnání s celkovým obsahem DNA v purifikovaném vzorku stanoveným analýzou TapeStation. Tato hodnota uvádí míru enrichmentu vzorku ccfDNA, který je obvykle menší, protože pochází z fragmentované DNA uvolněné po smrti buňky.

Analýza TapeStation naznačila, že procentuální rozmezí cfDNA činilo 76–93 % a maximální velikost ve všech purifikovaných vzorcích ccfDNA byla 177 bp až 203 bp. Nebyly zaznamenány žádné významné rozdíly v množství a kvalitě ccfDNA extrahované z plazmy, ať už byla odebrána do jakékoli zkumavky s antikoagulanty a ať již byly vstupní objemy vzorků plazmy jakékoli.

Tabulka 3. Výsledky analýzy TapeStation purifikované ccfDNA s uvedeným procentuálním podílem volné DNA a maximální velikostí s ohledem na různé vstupní objemy vzorků plazmy a různé antikoagulanty.

ID vzorku (antikoagulans)	Vstupní objem vzorku		Procento volné DNA	Maximální velikost (bp)
	plazmy (ml)			
1 (K ₂ EDTA)	1,0		81	186
	1,5		79	181
	3,0		80	183
	4,0		79	183
2 (K ₂ EDTA)	1,0		81	177
	1,5		88	178
	3,0		84	179
	4,0		91	175
3 (K ₂ EDTA)	1,0		90	184
	1,5		90	187
	3,0		89	183
	4,0		88	185

ID vzorku (antikoagulans)	Vstupní objem vzorku plazmy (ml)	Procento volné DNA	Maximální velikost (bp)
4 (Streck)	1,0	93	195
	1,5	76	200
	3,0	89	193
	4,0	84	192
5 (Streck)	1,0	92	195
	1,5	92	197
	3,0	90	195
	4,0	89	194
6 (Streck)	1,0	89	183
	1,5	79	182
	3,0	86	203
	4,0	86	203

9.B. Amplifikovatelnost a inhibice (interferující látky)

Amplifikovatelnost a nedostatečná inhibice purifikované ccfDNA byly hodnoceny pomocí qPCR k amplifikaci cílové DNA o velikosti 75 bp a analýze údajů qPCR o případné inhibici. ccfDNA byla ve čtyřech opakováních extrahována ze všech 4ml vzorků lidské plazmy z krve odebrané šesti osobám do zkumavek s K₂EDTA nebo do zkumavek Streck Cell-Free DNA BCT®. Všechny extrahované vzorky ccfDNA byly analyzovány pomocí qPCR. Aby bylo možné stanovit míru inhibice, byly průměrné hodnoty interní pozitivní kontroly (IPC) $|\Delta C_q|$ vypočítány s ohledem na standard qPCR, jehož koncentrace byla nejbližší koncentraci vzorku ccfDNA amplifikovaného qPCR.

Protože průměrné hodnoty IPC $|\Delta C_q|$ všech vzorků purifikované ccfDNA se rovnají $\leq 0,5$, nenaznačují výsledky qPCR (tabulka 4) žádnou nebo jen minimální inhibici amplifikace.

Tabulka 4. Posouzení inhibice na základě amplifikace ccfDNA extrahované ze 4ml vzorků lidské plazmy.

ID vzorku (antikoagulans)	Průměrná IPC $ \Delta C_q $
1 (K ₂ EDTA)	0,2
2 (K ₂ EDTA)	0,2
3 (K ₂ EDTA)	0,4
4 (Streck)	0,5
5 (Streck)	0,3
6 (Streck)	0,3

9.C. Kvantifikace ccfDNA pomocí fluorescenčních barviv a qPCR13

Konzistentnost kvantifikace ccfDNA byla hodnocena tak, že koncentrace ccfDNA byly porovnány metodou využívající fluorescenční barviva specifická pro vláknovou DNA a metodou qPCR, která amplifikuje cílovou DNA o velikosti 75 bp. K analýzám byly použity vzorky ccfDNA extrahované ve čtyřech opakováních ze všech 4ml vzorků lidské plazmy z krve odebrané šesti osobám do zkumavek s K₂EDTA nebo do zkumavek Streck Cell-Free DNA BCT®. Byl vypočítán poměr kvantifikace ccfDNA pomocí fluorescenčních barviv ke kvantifikaci ccfDNA na základě qPCR.

Výsledky prokázaly mezi těmito dvěma metodami kvantifikace silnou míru korelace, přičemž poměry koncentrace ccfDNA se v jednotlivých vzorcích pohybovaly v rozmezí od 0,7 do 1,4.

Tabulka 5. Porovnání koncentrací ccfDNA pomocí kvantifikační metody využívající fluorescenční barviva a kvantifikační metody využívající qPCR.

ID vzorku (antikoagulans)	Poměr koncentrace fluorescence vůči qPCR
1 (K ₂ EDTA)	0,7
2 (K ₂ EDTA)	1,3
3 (K ₂ EDTA)	0,9
4 (Streck)	1,3
5 (Streck)	0,9
6 (Streck)	1,4

9.D. Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost extrakce ccfDNA při použití sady Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit byla hodnocena na základě analýzy procentuálního variačního koeficientu výtěžnosti (CV) ccfDNA mezi cykly a v rámci cyklu. Ze 4 ml plazmy odebrané do zkumavek s antikoagulantem K₂EDTA byla ccfDNA extrahována ve třech po sobě jdoucích cyklech na přístrojích Maxwell® CSC Instrument a Maxwell® CSC 48 Instrument. Každý cyklus extrakce vyústil ve 24 eluátů. Výtěžek ccfDNA byl kvantifikován metodou qPCR, která amplifikuje cílovou DNA o velikosti 75 bp.

Výsledky prokázaly, že procentuální CV v rámci cyklu činila u přístroje Maxwell® CSC Instrument 11 % a u přístroje Maxwell® CSC 48 Instrument 14 %. Hodnota procentuálního CV mezi cykly činila u obou přístrojů 5 %.

Tabulka 6. Variabilita výtěžnosti ccfDNA v rámci cyklu a mezi cykly.

Přístroj	Antikoagulans	Vstupní objem vzorku plazmy (ml)	Procentuální variační koeficient v rámci cyklu	Procentuální variační koeficient mezi cykly
Maxwell® CSC	K ₂ EDTA	4	11 %	5 %
Maxwell® CSC 48	K ₂ EDTA	4	14 %	5 %

9.E. Křížová kontaminace

Možnost křížové kontaminace během extrakce ccfDNA sadou Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit byla hodnocena na základě zpracování vzorků lidské a bovinní plazmy, které byly umístěny na střídavé pozice v zásobníku přístrojů Maxwell® CSC Instrument a Maxwell® CSC 48 Instrument. Aby se stanovila křížová kontaminace, byly eluáty ccfDNA z bovinní plazmy analyzovány kvůli přítomnosti jakékoliv kontaminující lidské DNA metodou qPCR, která amplifikuje lidskou cílovou DNA o velikosti 75 bp.

Když byly vzorky lidské plazmy zpracovávány na přístroji Maxwell® Instrument vedle vzorků bovinní plazmy, na žádných eluátech ccfDNA nebylo zaznamenáno kvantifikovatelné množství lidské DNA, což potvrzuje, že nedochází k detekovatelné křížové kontaminaci.

9.F. Kompatibilita se sekvenováním nové generace

Kompatibilita eluátů ccfDNA s pracovními postupy sekvenování nové generace (NGS) byla hodnocena přípravou knihovny ccfDNA a následně analýzou TapeStation. ccfDNA byla extrahována ze vzorků plazmy z krve odebrané do zkumavek s antikoagulantem K₂EDTA nebo do zkumavek Streck Cell-Free DNA BCT® sadou Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit na přístroji Maxwell® CSC nebo Maxwell® CSC 48 Instrument. Úspěšná příprava knihovny byla stanovena na základě pozorování charakteristického posunu párů bází adaptérů v analýze TapeStation.

Všechny hodnocené knihovny ccfDNA prokázaly očekávaný posun párů bází a potvrdily tak úspěšnou přípravu NGS knihovny.

9.G. Kompatibilita s digitální PCR

Kompatibilita eluátů ccfDNA s pracovními postupy digitální PCR (dPCR) byla hodnocena pomocí kapkové digitální PCR. Studie zahrnovala vzorky ccfDNA extrahované z lidské plazmy z krve odebrané do zkumavek s antikoagulantem K₂EDTA nebo do zkumavek Streck Cell-Free DNA BCT® a vstupní objemy vzorků plazmy činily 3 ml a 4 ml. Eluáty ccfDNA byly hodnoceny metodou Copy Number Variation (gen PIK3CA) a byly zaznamenávány počty kapek.

Výsledky prokázaly úspěšnou amplifikaci všech testovaných vzorků ccfDNA, počty kapek překročily 15 000 na reakci.

10. Hodnocení klinické účinnosti

Klinická účinnost sady Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit byla hodnocena v externí klinické laboratoři s použitím vzorků lidské plazmy zpracovaných na přístroji Maxwell® CSC 48 Instrument.

V první studii dva testovací pracovníci nezávisle na sobě purifikovali ccfDNA z 1,5ml vzorků lidské plazmy (n = 10) sadou Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit a standardní referenční purifikační metodou používanou v laboratoři. U výsledných eluátů ccfDNA byl testem využívajícím amplifikaci analyzován Rh faktor. ccfDNA extrahovaná ze vzorků lidské plazmy sadou Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit vykazovala očekávané výsledky, které byly v souladu s výsledky získanými laboratorní referenční metodou.

Ve druhé studii dva testovací pracovníci nezávisle na sobě purifikovali ccfDNA z 1,5ml vzorků lidské plazmy (n = 10) sadou Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit. U purifikovaných eluátů ccfDNA byl testem využívajícím amplifikaci analyzován Rh faktor a oba pracovníci dosáhli shodných výsledků.

11. Co je třeba vzít v úvahu při práci s ccfDNA

11.A. Příprava plazmy

Jedním potenciálním problémem purifikace ccfDNA je přítomnost kontaminující genomové DNA z lýzovaných bílých krvinek. Centrifugace plazmy se obvykle provádí dvakrát. Při první se odstraňují červené a bílé krvinky a při druhé se odstraňují všechny zbývající bílé krvinky. Pokud byl vzorek krve inkubován delší dobu při pokojové teplotě, nebo byl před zpracováním zmrazen a znovu rozmrazen, mohly některé bílé krvinky lýzovat a do plazmy uvolnit genomovou DNA.

Pokud byl vzorek plazmy zmrazen, může po rozmrazení vzniknout kryoprecipitát. I když kryoprecipitát nemá na purifikaci ccfDNA prováděnou sadou Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit žádný vliv, může mít vliv na pipetování plazmy. Abyste kryoprecipitát peletovali, je třeba vzorek plazmy před zpracováním ≥ 5 minut centrifugovat při $\geq 1000 \times g$.

11.B. Doporučení pro kvantifikaci ccfDNA

Nízká koncentrace a fragmentace ccfDNA představují jedinečné výzvy. Z plazmy zdravých lidí je obvyklá výtěžnost 5–30 ng ccfDNA na mililitr plazmy. Většina fragmentů ccfDNA je přibližně o velikosti 160–200 bp a další přibližně 340 bp a 510 bp.

UV kvantifikace

Přesné stanovení koncentrace ccfDNA na základě absorbance při 260 nm je díky nízké koncentraci ccfDNA obtížné. Pro lepší purifikaci ccfDNA se některé produkty používají jako nosiče RNA. Nosič RNA se vyskytuje ve větším množství než ccfDNA a purifikuje se. To může vést k falešné hodnotě A_{260} a významně vyšší zřejmé koncentraci ccfDNA. Pro přesnou kvantifikaci použijte fluorescenční barviva nebo PCR.

Kvantifikace pomocí fluorescenčních barviv

Protože jsou barviva specifická pro vláknovou DNA vysoce citlivá, hodí se ke kvantifikaci ccfDNA lépe, i když existují dvě obavy. Ta první zahrnuje nosič RNA. Zatímco barviva specifická pro vláknovou DNA jsou mnohem více specifická pro DNA než pro RNA, mohou vysoké úrovně nosičů RNA v jiných sadách ccfDNA zapříčinit zvýšení hodnot relativních fluorescenčních jednotek (RFU), a proto se koncentrace ccfDNA zdají vyšší, než ve skutečnosti jsou.

Druhým faktorem je, že standardy používanými s fluorescenčními barvivy jsou obvykle genomová DNA s vysokou molekulovou hmotností nebo lambda DNA. ccfDNA je velmi fragmentovaná a má relativně nízkou molekulovou hmotnost. Neváží proto fluorescenční barviva tak účinně jako DNA s vysokou molekulovou hmotností a to má za následek zdánlivě nižší koncentrace. Je-li to možné, používejte pro přesnější kvantifikace standardy obsahující DNA s nízkou molekulovou hmotností.

Kvantifikace na základě amplifikace

Nejpřesnější kvantifikaci ccfDNA poskytuje qPCR nebo digitální PCR. Vedle citlivosti může kvantifikace na základě amplifikace indikovat vhodnost vzorků pro následné aplikace na základě amplifikace.

12. Řešení problémů

Pokud jste zde nenašli odpovědi na některé otázky, obraťte se na příslušnou místní pobočku nebo distributora společnosti Promega. Kontaktní informace jsou dostupné na webových stránkách: www.promega.com.

E-mail: techserv@promega.com

Projevy	Příčiny a komentáře
Přístroj není schopen zvedat plunžry	Ujistěte se, že se používá chemická sada specifická pro Maxwell® CSC; plunžry pro sady Maxwell® CSC jsou specifické pro podporované přístroje Maxwell® Instruments (viz tabulka 1).
Nízká výtěžnost ccfDNA	V sadě Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit je možné použít vzorek plazmy o maximálním objemu 4 ml. Extrakci zopakujte a použijte maximálně 4 ml plazmy. Pokud se použije méně než 1 ml plazmy, může to negativně ovlivnit obnovu ccfDNA. Ověřte, že do jamky č. 4 bylo přidáno správné množství roztoku proteinázy K (PK2). Po nanesení 10 µl roztoku proteinázy K (PK2) do jamky č. 4 extrakci zopakujte. Výtěžnost může být nižší, pokud se eluce provádí v méně než 50 µl pufru Elution Buffer (RCFD). Extrakci zopakujte a použijte 50 µl pufru Elution Buffer (RCFD). Dodaný pufr Elution Buffer (RCFD) je nezbytný k účinné obnově ccfDNA. Pufr Elution Buffer (RCFD) nenahrazujte žádným alternativním elučním pufrům. Extrakci zopakujte s pufrům Elution Buffer (RCFD). Ověřte, že plazma byla přenesena na kazetu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridge do správných jamek (viz část 6, tabulka 2 a obrázek 1). • Při vstupním objemu plazmy 1,0–1,5 ml přeneste veškerou plazmu do jamky č. 1. • Při vstupním objemu plazmy 1,5–3,0 ml se musí plazma rovnoměrně rozdělit do jamek č. 1 a 3. • Při vstupním objemu plazmy 3,0–4,0 ml rozdělte množství plazmy rovnoměrně do jamek č. 1, 2 a 3.
Kontaminace genomovou DNA	Preparát plazmy obsahuje lýzované bílé krvinky. Doporučení pro přípravu vzorků plazmy z plné krve viz část 5 a 11.A.

Jakákoli závažná událost, ke které došlo v souvislosti se zařízením a která vedla nebo by mohla vést k smrtelnému nebo vážnému zranění uživatele nebo pacienta, by měla být neprodleně nahlášena výrobci. Uživatelé se sídlem v Evropské unii by měli rovněž hlásit veškeré závažné incidenty příslušnému orgánu členského státu, ve kterém uživatel a/nebo pacient přebývá.

13. Související produkty

Produkt	Velikost	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument*	vždy 1	AS6000
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	vždy 1	SP6019
Maxwell® CSC 48 Instrument*	vždy 1	AS8000
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	vždy 1	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	vždy 1	AS8402
RSC/CSC Plungers	50 v balení	AS1331
Elution Tubes (0,5 ml)	50 v balení	AS6201
Elution Magnet, 16 pozic	vždy 1	AS4017
Elution Magnet, 24 pozic	vždy 1	AS4018

*K diagnostickému použití in vitro. Tento produkt je dostupný pouze v určitých zemích.

Sady činidel Maxwell® CSC Reagent Kits

Na internetových stránkách www.promega.com naleznete seznam dostupných extrakčních sad Maxwell® CSC.

© 2025 Promega Corporation. Všechna práva vyhrazena.

Maxwell je ochranná známka společnosti Promega Corporation.

Cell-Free DNA BCT je registrovaná ochranná známka společnosti Streck LLC.

Na produkty se mohou vztahovat nevyřízené nebo vydané patenty nebo mohou podléhat určitým omezením. Další informace najdete na našich webových stránkách.

Všechny ceny a specifikace se mohou změnit bez předchozího upozornění.

Tvrzení o produktu se mohou změnit. Nejnovější informace o produktech společnosti Promega získáte od technické služby Promega Technical Services nebo v jejím online katalogu.