

MANUALE TECNICO

Maxwell[®] CSC Genomic DNA Kit

Istruzioni per l'uso del prodotto
AS1850

Attenzione: maneggiare le cartucce con attenzione; i bordi del sigillo possono essere taglienti.

Maxwell[®] CSC Genomic DNA Kit

Tutta la letteratura tecnica è disponibile via Internet all'indirizzo: www.promega.com/protocols/
 Visitare il sito web per verificare che la versione in uso del presente manuale tecnico sia quella più aggiornata.
 In caso di domande sull'utilizzo del prodotto, contattare i Promega Technical Services all'indirizzo e-mail: techserv@promega.com

1. Descrizione	2
2. Componenti del prodotto, condizioni di conservazione e legenda dei simboli	3
3. Finalità prevista/uso previsto del prodotto.....	5
4. Limitazioni all'utilizzo del prodotto	5
5. Prima di iniziare	5
5.A. Preparazione di campioni di sangue e buffy coat.....	6
5.B. Preparazione di campioni aspirati di midollo osseo	7
5.C. Preparazione di campioni di pellet di cellule	8
5.D. Preparazione dei lisati da campioni di sangue intero, buffy coat, midollo osseo e pellet di cellule	9
5.E. Preparazione dei lisati dai campioni di tessuto.....	10
5.F. Preparazione dei lisati dai campioni di tamponi orali	11
5.G. Preparazione della Maxwell [®] CSC Genomic DNA Cartridge.....	13
6. Esecuzione del Maxwell [®] Instrument.....	15
7. Post-purificazione	17
8. Valutazione delle prestazioni analitiche	17
8.A. Resa del DNA	17
8.B. Qualità del DNA (purezza).....	23
8.C. Riproducibilità	30
8.D. Amplificabilità.....	31
8.E. Inibizione (sostanze interferenti).....	40
8.F. Contaminazione crociata	46
9. Valutazione delle prestazioni cliniche	47
10. Risoluzione dei problemi	48
11. Prodotti correlati	51

Il Maxwell® CSC Genomic DNA Kit è disponibile solo in alcuni paesi.

1. Descrizione

Il Maxwell® CSC Genomic DNA Kit^(a) viene usato in combinazione con i Maxwell® Instrument specificati nella Tabella 1 per fornire un metodo semplice per la preparazione dei campioni e per la purificazione del DNA genomico (gDNA) efficienti e automatiche da campioni biologici umani. I Maxwell® CSC Instrument sono progettati per l'uso con cartucce di reagenti predefinite e metodi di purificazione preprogrammati, massimizzando la semplicità e la praticità. Il metodo Maxwell® per il CSC Genomic DNA Kit può elaborare da uno fino al numero massimo di campioni del Maxwell® CSC Instrument in meno di 40 minuti. Il DNA purificato può essere utilizzato direttamente in svariate applicazioni downstream, ad esempio l'analisi basata sulla PCR.

Tabella 1. Strumenti supportati.

Strumento	Cat.#	Manuale tecnico	Numero massimo di campioni
Maxwell® CSC	AS6000	TM457	16
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623	48

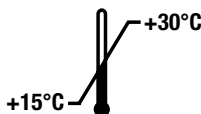
Principio del metodo

Il Maxwell® CSC Genomic DNA Kit purifica l'acido nucleico dei campioni utilizzando particelle paramagnetiche, che forniscono una fase solida mobile per ottimizzare la cattura dei campioni, il lavaggio e la purificazione del gDNA. I Maxwell® Instrument sono strumenti per la gestione di particelle magnetiche che legano efficacemente gli acidi nucleici alle particelle paramagnetiche nella prima camera di una cartuccia preriempita. I campioni vengono processati attraverso una serie di lavaggi prima che il gDNA venga eluito. Questo approccio alla cattura magnetica evita problemi frequenti quali puntali ostruiti o trasferimenti di reagente parziali, che portano a un'elaborazione della purificazione non ottimale mediante altri sistemi automatizzati comunemente usati.

2. Componenti del prodotto, condizioni di conservazione e legenda dei simboli

PRODOTTO	QUANTITÀ	CAT.#
Maxwell® CSC Genomic DNA Kit	48 prep	AS1850

Per uso diagnostico in vitro. Esclusivamente ad uso professionale. Contiene reagenti sufficienti per 48 isolamenti automatici da una varietà di campioni di biologici umani. Le cartucce sono esclusivamente mono-uso.



Include:

- 2 × 1 ml Soluzione proteinasi K (PK)
- 1 ml Soluzione RNasi A
- 20 ml Tampone di lisi
- 20 ml Lytic Enhancer (LE2)
- 48 Maxwell® CSC Cartridges (CSCQ)
- 50 Stantuffi CSC/RSC
- 50 Provette di eluizione (0,5 ml)
- 20 ml Tampone di eluizione

Condizioni di conservazione: conservare il Maxwell® CSC Genomic DNA Kit a una temperatura da +15°C a +30°C.



Informazioni sulla sicurezza: le Maxwell® CSC Cartridges (CSCQ) contengono etanolo e isopropanolo. Queste sostanze devono essere considerate infiammabili, pericolose e irritanti. Per informazioni dettagliate sulla sicurezza, consultare la scheda dati di sicurezza (SDS). Attenersi alle linee guida della struttura per la gestione e lo smaltimento di tutti i rifiuti chimici utilizzati con questo sistema.



Le Maxwell® CSC Cartridges (CSCQ) sono progettate per essere utilizzate con sostanze potenzialmente infettive. Indossare idonee protezioni (p. es., guanti e occhiali di sicurezza) nel maneggiare le sostanze infettive. Attenersi alle linee guida della propria struttura per la gestione e lo smaltimento di tutte le sostanze infettive utilizzate con questo sistema.



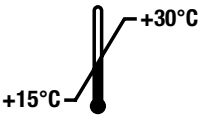















Attenzione: maneggiare le cartucce con attenzione; i bordi del sigillo possono essere taglienti.

Informazioni aggiuntive: i componenti del Maxwell® CSC Genomic DNA Kit sono qualificati e comprovati per funzionare insieme. Non mescolare i componenti di un kit tra lotti di kit differenti. Usare solo i componenti forniti nel kit. Per ulteriori informazioni sulla sicurezza, vedere la scheda di sicurezza (Safety Data Sheet) disponibile all'indirizzo: www.promega.com.

2. Componenti del prodotto, condizioni di conservazione e legenda dei simboli (continua)

Legenda dei simboli

Simbolo	Spiegazione	Simbolo	Spiegazione
	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Rappresentante autorizzato
	Conservare a una temperatura da +15°C a +30°C.		Fabbricante
	Rischio per la salute		Corrosivo
	Irritante		Infiammabile
	Conformità alle normative europee		Contenuto sufficiente per “n” test
	Avvertenza. Pericolo di schiacciamento.		Attenzione
	Numero lotto		Avvertenza. Rischio biologico.
	Non riutilizzare		Numero catalogo

3. Finalità prevista/uso previsto del prodotto

Il Maxwell® CSC Genomic DNA Kit è previsto per l'uso in combinazione con i Maxwell® CSC Instrument e i metodi di purificazione Maxwell® CSC e Maxwell® CSC 48 Genomic DNA, come dispositivo medico diagnostico in vitro (IVD) per eseguire l'isolamento automatico del DNA genomico da una varietà di campioni biologici umani. Il DNA genomico purificato è indicato per l'uso nelle analisi diagnostiche in vitro basate sull'amplificazione.

Il Maxwell® CSC Genomic DNA Kit è previsto per un impiego a una temperatura ambiente di 15°C–30°C. L'impiego al di fuori di questi valori può comportare risultati non ottimali.

Il Maxwell® CSC Genomic DNA Kit è destinato a un uso esclusivamente professionale. I risultati diagnostici ottenuti utilizzando il DNA genomico purificato grazie a questo sistema devono essere interpretati congiuntamente ad altri esami clinici o di laboratorio.

4. Limitazioni all'utilizzo del prodotto

Il Maxwell® CSC Genomic DNA Kit è stato valutato con sangue umano intero, buffy coat, midollo osseo, tamponi orali, campioni di tessuto e cellule. L'utente è responsabile di convalidarne l'uso per estrarre il DNA da altri tipi di campioni.

Qualsiasi applicazione diagnostica a valle che utilizzi DNA genomico purificato con Maxwell® CSC Genomic DNA Kit deve includere idonei controlli. L'utente è responsabile della verifica delle caratteristiche delle prestazioni necessarie per le applicazioni diagnostiche a valle.

5. Prima di iniziare

Fornitura materiali a cura dell'utente

- agitatore da banco
- pipette e puntali per il trasferimento del campione nelle cartucce preriempite di reagente
- si consiglia di utilizzare provette da 1,5–2,0 ml per l'incubazione dei campioni (p. es., Microtubes, 1,5 ml [Cat.# V1231]). Altri tipi di provette devono essere valutate dal laboratorio.
- blocco di riscaldamento a secco, bagno d'acqua o miscelatore termico portati a 56°C
- acqua deionizzata o Nuclease-Free Water (Cat.# MC1191) per pellet di cellule (Sezione 5.C) e campioni di tessuto (Sezione 5.E)
- 1X soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) per campioni cellulari preparati dall'urina (Sezione 5.C)
- **opzione:** colonne di purificazione (Cat.# Z3871) per campioni su tamponi orali (Sezione 5.F)
- **opzione:** miscelatore di provette rotante

5.A. Preparazione di campioni di sangue e buffy coat

Capacità di elaborazione dei campioni

La resa totale del DNA genomico proveniente da campioni di sangue intero e buffy coat dipende dal volume del campione e dal numero di leucociti (WBC) per millilitro. Per questi tipi di campione, è possibile utilizzare un intervallo di volume del campione di 50–300 µl. Nel corso dello sviluppo, il sangue intero e il buffy coat preparato dal sangue intero con un intervallo da 4×10^6 a 10×10^6 WBC/ml sono stati testati e le prestazioni sono risultate accettabili. I campioni esterni a questo intervallo possono essere compatibili con la chimica di estrazione, ma le prestazioni relative all'estrazione e alla compatibilità con le analisi downstream devono essere valutate dal laboratorio.

Per i campioni di sangue intero, è possibile utilizzare un intervallo del volume di eluizione di 50–200 µl. Poiché la resa di DNA genomico dei campioni di buffy coat in genere è elevata, è consigliabile l'eluizione con 200 µl, per offrire il massimo dell'efficienza di eluizione. Sebbene con i campioni di buffy coat sia possibile utilizzare volumi di eluizione di 50–200 µl, volumi inferiori a 200 µl potrebbero non fornire risultati ottimali.

Note

- a. Questo kit è stato testato con campioni di sangue umano intero e buffy coat preparati da sangue umano intero raccolto in provette con EDTA, citrato o eparina. Le prestazioni di questo kit con altri tipi di provette per la raccolta di sangue devono essere valutate dall'utente.
 - b. Questo kit è stato testato con campioni ematici e buffy coat conservati nelle condizioni indicate del seguito: a 15–30°C per un massimo di 72 ore, a 2–10°C per un massimo di 7 giorni oppure a –65°C o a temperature inferiori prima della purificazione del DNA. Altre condizioni di conservazione dei campioni possono offrire prestazioni accettabili, ma devono essere valutate dal laboratorio. I campioni congelati devono essere scongelati completamente prima dell'elaborazione. Tutti i campioni ematici e di buffy coat dovranno essere mescolati accuratamente prima dell'uso.
1. Miscelare tutti i campioni ematici o di buffy coat per almeno 5 minuti a una temperatura di 15–30°C. Questa operazione può essere eseguita mediante un miscelatore di provette rotante o la miscelazione intermittente con un agitatore vortex.
 2. Andare alla Sezione 5.D per istruzioni sulla preparazione del lisato.

5.B. Preparazione di campioni aspirati di midollo osseo

Capacità di elaborazione dei campioni

La resa totale di DNA genomico dai campioni aspirati di midollo osseo dipende dal numero totale di cellule elaborate. Nel corso dello sviluppo, i campioni aspirati di midollo osseo nell'intervallo di volume di 50–300 µl sono stati testati e le prestazioni da essi fornite sono risultate accettabili. I campioni esterni a questo intervallo possono essere compatibili con la chimica di estrazione, ma le prestazioni relative all'estrazione e alla compatibilità con le analisi downstream devono essere valutate dal laboratorio.

Poiché la resa di DNA genomico dei campioni aspirati di midollo osseo in genere è elevata, è consigliabile l'eluizione con 200 µl per offrire il massimo dell'efficienza. Sebbene con i campioni di midollo osseo sia possibile utilizzare volumi di eluizione di 50–200 µl, volumi inferiori a 200 µl potrebbero non fornire risultati ottimali.

Note

- a. Questo kit è stato testato con campioni aspirati di midollo osseo raccolti in provette con EDTA, citrato o eparina. Le prestazioni di questo kit con altri tipi di provette per la raccolta di sangue devono essere valutate dall'utente.
 - b. Questo kit è stato testato con campioni aspirati di midollo osseo conservati congelati (a una temperatura di –65°C o inferiore) prima della purificazione del DNA. Altre condizioni di conservazione dei campioni possono offrire prestazioni accettabili, ma devono essere valutate dal laboratorio. I campioni congelati devono essere scongelati completamente prima dell'elaborazione. Tutti i campioni aspirati di midollo osseo devono essere mescolati accuratamente prima dell'uso.
1. Miscelare tutti i campioni aspirati di midollo osseo per almeno 30 minuti a una temperatura di 15–30°C mediante un miscelatore di provette rotante o la miscelazione intermittente con un agitatore vortex.
 2. Andare alla Sezione 5.D per istruzioni sulla preparazione del lisato.

5.C. Preparazione di campioni di pellet di cellule

Capacità di elaborazione dei campioni

I pellet di cellule possono essere generati da un gran numero di tipi di campioni, tra cui fluidi biologici (p. es., urina o liquido amniotico), cellule purificate (p. es., cellule mononucleate da sangue periferico) o cellule da coltura. Per generare un pellet di cellule si utilizza la centrifugazione del campione; il pellet viene poi risospeso in 300 µl di Nuclease-Free Water. La resa totale di DNA genomico dei campioni pellet di cellule dipende dal numero di cellule presenti nel campione. Nel corso dello sviluppo, sono stati testati i pellet di cellule con un massimo di 5×10^6 cellule (vedere la Tabella 2) e le loro prestazioni sono risultate accettabili. I campioni esterni a questo intervallo possono essere compatibili con la chimica di estrazione, ma le prestazioni relative all'estrazione e alla compatibilità con le analisi downstream devono essere valutate dal laboratorio.

Tabella 2. Tipi di campioni di pellet di cellule valutati.

Tipo di campione	Intervallo di campioni testato	Volume di eluizione suggerito
Urina	15–50 ml	50 µl
Liquido amniotico	1–5 ml	50 µl
Cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC)	5×10^4 – 5×10^6 cellule	50–200 µl
Cellule da coltura	5×10^2 – 5×10^6 cellule	50–200 µl

Per i campioni di pellet di cellule, utilizzare un intervallo di volume di eluizione di 50–200 µl. Quando si elaborano campioni che generano numeri di cellule ridotti nel pellet di cellule, è consigliabile utilizzare un volume di eluizione di 50 µl. Per i campioni con più cellule, un volume di eluizione superiore può offrire una resa di DNA genomico più elevata. I laboratori dovranno confermare che il volume di eluizione per un determinato tipo di campione di pellet di cellule fornisca purezza e concentrazione sufficienti per l'analisi a valle.

Note

- Questo kit è stato testato con campioni di pellet di cellule elaborati subito dopo aver generato un pellet di cellule e averlo conservato congelato (a una temperatura di -65°C o inferiore) prima della purificazione del DNA. Altre condizioni di conservazione dei campioni possono offrire prestazioni accettabili, ma devono essere valutate dal laboratorio. I campioni congelati devono essere scongelati completamente prima dell'elaborazione.
- Se si desidera congelare i campioni, tale operazione deve essere eseguita dopo aver generato il pellet di cellule. La raccolta di un pellet di cellule da un campione che è stato congelato e scongelato può causare una perdita di prestazioni.

1. Centrifugare il volume di campione desiderato a una velocità di almeno $2.000 \times g$ per 20 minuti per generare un pellet di cellule.
 - a. Per i campioni di urina, lavare il pellet di cellule tramite risospensione in 750 μ l di 1X PBS.
 - b. Centrifugare il campione sospeso in PBS per generare un pellet di cellule.
2. Lasciar decantare oppure aspirare il liquido dalle cellule nel pellet. Risospendere il pellet in 300 μ l di Nuclease-Free Water.
3. Andare alla Sezione 5.D per istruzioni sulla preparazione del lisato.

5.D. Preparazione dei lisati da campioni di sangue intero, buffy coat, midollo osseo e pellet di cellule

1. Preparare ed etichettare provette da incubazione che possano essere alloggiare in un blocco di riscaldamento portato a 56°C.
2. Aggiungere 30 μ l di soluzione di proteinasi K (PK) a ciascuna provetta da incubazione.
3. Trasferire il volume di campione desiderato in ciascuna provetta da incubazione. Cambiare i puntali tra un trasferimento di campione e l'altro per prevenire contaminazioni crociate.
Nota: il trasferimento di materiale coagulante, grasso o di altro materiale solido nella provetta da incubazione può causare una lisi del campione insufficiente. Trasferire solo il campione liquido nella provetta da incubazione.
4. Tappare e agitare in vortex ciascuna provetta a velocità massima per 10 secondi.
5. Aggiungere 300 μ l di Lytic Enhancer (LE2) a ciascuna provetta da incubazione. Sostituire i puntali ogni volta che viene erogato il Lytic Enhancer (LE2) per evitare la contaminazione crociata.
Nota: andare al passaggio 6 senza mescolare o agitare in vortex.
6. Aggiungere 300 μ l di tampone di lisi a ciascuna provetta da incubazione. Sostituire i puntali ogni volta che viene erogato il tampone di lisi per evitare la contaminazione crociata.
7. Tappare e agitare in vortex ciascuna provetta a velocità massima per 10 secondi.
Nota: verificare che l'uso del vortex abbia generato un lisato omogeneo.
8. Incubare ogni provetta nel blocco di riscaldamento a 56°C per 20 minuti. Durante questa incubazione, preparare le Maxwell® CSC Cartridges come descritto nella Sezione 5.G.
9. Agitare in vortex a velocità massima per 10 secondi.
10. Trasferire ciascun campione di lisato dalla provetta di incubazione alla camera n.1 di un'altra cartuccia e mescolare bene con la soluzione di legame nella camera n.1 aspirando ed erogando per 5–10 volte dopo il trasferimento per creare una miscela omogenea (la camera n.1 è la più grande della cartuccia). Cambiare i puntali tra un trasferimento di campione e l'altro per evitare la contaminazione crociata.
Nota: se non si riesce a creare una miscela omogenea di lisato campione e soluzione di legame nella camera n.1 della cartuccia, la resa e la purezza dell'eluito finale possono ridursi.

5.E. Preparazione dei lisati dai campioni di tessuto

Capacità di elaborazione dei campioni

La resa totale di DNA genomico dai campioni di tessuto dipende dalla massa e dal tipo di tessuto elaborato. Per i campioni di tessuto, è possibile utilizzare un intervallo di campioni di 5–50 mg. Nel corso dello sviluppo, i campioni di tessuto cardiaco, pancreatico, cerebrale e mammario sono stati valutati come esemplari e le loro prestazioni sono risultate accettabili. Una gamma di tipi di tessuti più ampia può essere compatibile con la chimica di estrazione, ma le prestazioni relative all'estrazione e la compatibilità con le analisi downstream devono essere valutate dal laboratorio.

Per i campioni di tessuti, è possibile utilizzare un intervallo del volume di eluizione di 50–200 µl. Il volume di tampone di eluizione da utilizzare dipenderà dalla massa e dal tipo di tessuto elaborato. I laboratori devono valutare i volumi di eluizione che forniscono prestazioni accettabili nelle loro analisi downstream per la massa e il tipo del tessuto elaborato.

Nota: questo kit è stato testato con campioni di tessuti conservati congelati (a una temperatura di –65°C o inferiore) prima della purificazione del DNA. Altre condizioni di conservazione dei campioni possono offrire prestazioni accettabili, ma devono essere valutate dal laboratorio. I campioni congelati devono essere scongelati completamente prima dell'elaborazione.

1. Per la lisi dei campioni di tessuto, portare la temperatura di un blocco di riscaldamento a secco, di un bagno d'acqua o di un miscelatore termico a 56°C. Preparare ed etichettare le provette da incubazione più adatte all'opzione di riscaldamento desiderata.
2. Trasferire 5–50 mg di tessuto in ogni provetta. Tagliando il tessuto in frammenti più piccoli il tempo di lisi può essere ridotto. Centrifugare la provetta alla massima velocità per 15 secondi, per raccogliere parti di tessuto sul fondo della provetta stessa.
3. Aggiungere 300 µl di Nuclease-Free Water (Cat. # MC1191 o equivalente) a ciascuna provetta da incubazione.
4. Aggiungere 30 µl di soluzione di proteinasi K (PK) a ciascuna provetta da incubazione. Sostituire i puntali ogni volta che viene erogata la soluzione proteinasi K (soluzione PK) per evitare la contaminazione crociata.
5. Tappare e agitare in vortex ciascuna provetta a velocità massima per 10 secondi.
6. Aggiungere 300 µl di Lytic Enhancer (LE2) a ciascuna provetta da incubazione. Sostituire i puntali ogni volta che viene erogato Lytic Enhancer (LE2) per evitare la contaminazione crociata.
7. Tappare e agitare in vortex ciascuna provetta a velocità massima per 10 secondi.
8. Incubare ogni provetta 56°C utilizzando una delle seguenti opzioni:
 - a. Con un miscelatore termico, utilizzare una velocità di miscelazione elevata (p. es., 1.500 giri/min) per un massimo di 2 ore.
 - b. Con un blocco di riscaldamento a secco, utilizzare senza mescolare per almeno 16 ore.
9. Agitare in vortex a velocità massima per 10 secondi.
10. Centrifugare ogni provetta a una velocità massima in una microcentrifuga per 5 minuti per raccogliere il materiale non digerito.

11. Trasferire tutto il surnatante da ciascuna provetta da incubazione a una nuova provetta. Evitare di trasferire il materiale raccolto. Se sulla parte superiore del campione, dopo la centrifuga, compare uno strato distinto di grasso, non trasferire tale strato nella nuova provetta.
12. Aggiungere 300 µl di tampone di lisi a ciascuna provetta nuova. Sostituire i puntali ogni volta che viene erogato il tampone di lisi per evitare la contaminazione crociata.
13. Tappare e agitare in vortex ciascuna provetta a velocità massima per 10 secondi.
14. Preparare le cartucce come descritto nella Sezione 5.G.
15. Trasferire il campione lisato di tessuto da ciascuna provetta alla camera n.1 di un'altra cartuccia e mescolare bene con la soluzione di legame nella camera n.1 aspirando ed erogando per almeno 10 volte dopo il trasferimento, per creare una miscela omogenea (la camera n.1 è la più grande della cartuccia). Cambiare i puntali tra un trasferimento di campione e l'altro per evitare la contaminazione crociata.

Note

- a. Il trasferimento del pellet di tessuto o dello stato grasso da una provetta da incubazione a una nuova provetta può dar luogo a una resa o a purezze insufficienti.
- b. Se non si riesce a creare una miscela omogenea di lisato campione e soluzione di legame nella camera n.1 della cartuccia, la resa e la purezza dell'eluato finale possono ridursi.

5.F. Preparazione dei lisati dai campioni di tamponi orali**Capacità di elaborazione dei campioni**

La resa totale del DNA genomico dei campioni di tamponi orali dipende da quanto correttamente è stato eseguito il trasferimento delle cellule orali al tampone. Nel corso dello sviluppo, 1 e 2 tamponi orali sono stati testati e hanno fornito prestazioni accettabili. Per i campioni di tamponi orali, è possibile utilizzare un intervallo del volume di eluizione di 50–200 µl. I laboratori devono scegliere un volume di eluizione per i campioni di tamponi orali che offra purezza e concentrazione sufficienti per la loro analisi downstream.

Nota: questo kit è stato testato con campioni di tamponi orali a secco conservati a una temperatura di 15–30°C prima della purificazione del DNA. Altre condizioni di conservazione dei campioni possono offrire prestazioni accettabili, ma devono essere valutate dal laboratorio.

1. Preparare ed etichettare provette da incubazione da 1,5–2,0 ml che possano essere alloggiare in un blocco di riscaldamento portato a 56°C.
2. **Opzione:** collocare una colonna di purificazione (Cat.# Z3871) in ogni provetta da incubazione.
3. Collocare 1–2 testine di tamponi orali in ogni provetta da incubazione o colonna di purificazione in ogni provetta da incubazione. Rimuovere il bastoncino dalle testine dei tamponi orali tagliandolo o staccandolo dalla testina del tampone in modo da poter chiudere il tappo sulla provetta o sulla colonna di purificazione contenente la testa del tampone.

5.F. Preparazione dei lisati dai campioni di tampone orale (continua)

4. In un'altra provetta, combinare 300 µl di Lytic Enhancer (LE2) con 30 µl di soluzione proteinasi (PK) per ciascun campione più un campione extra. Vedere la tabella di seguito. Ad esempio, per elaborare 16 campioni, creare un Master Mix per 17 reazioni combinando $300 \mu\text{l} \times 17 = 5.100 \mu\text{l}$ di Lytic Enhancer (LE2) e $30 \mu\text{l} \times 17 = 510 \mu\text{l}$ di proteinasi K.

Reagente	Quantità per reazione	Reazioni (numero di campioni + 1)	Totale
Lytic Enhancer (LE2)	300 µl	n + 1	$300 \times (n + 1) \mu\text{l}$
Soluzione proteinasi K (PK)	30 µl	n + 1	$30 \times (n + 1) \mu\text{l}$

5. Miscelare la soluzione di Lytic Enhancer (LE2)/proteinasi K (PK) capovolgendo la provetta almeno 10 volte.
6. Aggiungere 330 µl di soluzione di Lytic Enhancer (LE2)/proteinasi K (PK) a ciascun campione e chiudere la provetta. Sostituire i puntali ogni volta che viene erogata la soluzione Lytic Enhancer (LE2)/proteinasi K (PK) per evitare la contaminazione crociata.
7. Incubare ogni provetta a 56°C per 20 minuti. Durante questa incubazione, preparare le cartucce come descritto nella Sezione 5.G.
8. Utilizzare una delle seguenti opzioni per rimuovere le testine dei tamponi dalla provetta:
- Se si utilizza una colonna di purificazione, posizionare la provetta in una microcentrifuga e centrifugare alla massima velocità per 2 minuti. Rimuovere la provetta dalla microcentrifuga. Aprire la provetta; rimuovere e smaltire la colonna di purificazione contenente le testine dei tamponi.
 - Se non si sta utilizzando una colonna di purificazione, rimuovere le testine dei tamponi con delle pinzette, estraendo con cura il restante lisato dalle testine dei tamponi. Smaltire le testine dei tamponi. Pulire le pinzette e cambiare i guanti tra la rimozione di una testina di tampone e l'altra per evitare la contaminazione crociata.
9. Aggiungere 300 µl di tampone di lisi alla camera n.1 di ogni cartuccia da utilizzare (la camera n.1 è la più grande della cartuccia).
10. Trasferire ciascun campione di lisato del tampone dalla provetta di incubazione alla camera n.1 di un'altra cartuccia e miscelare con il tampone di lisi e la soluzione di legame nella camera n.1 aspirando ed erogando per 5–10 volte dopo il trasferimento, per creare una miscela omogenea (la camera n.1 è la più grande della cartuccia). Cambiare i puntali tra un trasferimento di campione e l'altro per evitare la contaminazione crociata.
- Nota:** se non si riesce a creare una miscela omogenea di lisato campione, tampone di lisi e soluzione di legame nella camera n.1, la resa e la purezza dell'eluito finale possono ridursi.

5.G. Preparazione della Maxwell® CSC Genomic DNA Cartridge

1. Cambiare i guanti prima di maneggiare cartucce, stantuffi CSC/RSC e provette di eluizione (0,5 ml). Le cartucce vengono preparate negli appositi vassoi esternamente allo strumento prima che i vassoi con le cartucce e i campioni vengano trasferiti allo strumento per la purificazione. Posizionare ciascuna cartuccia nel vassoio con la camera n.1 (la più grande della cartuccia) alla distanza massima dalle provette di eluizione (Figura 2). Premere sulla cartuccia fino a quando non scatta in posizione. Assicurarsi che ambedue le estremità della cartuccia siano completamente inserite nel vassoio. Staccare delicatamente il sigillo in modo che venga completamente rimosso dalla parte superiore della cartuccia. Assicurarsi che siano stati rimossi dalla cartuccia il nastro sigillante e qualunque residuo di adesivo.



Attenzione: maneggiare le cartucce con attenzione. I bordi del sigillo possono essere taglienti.

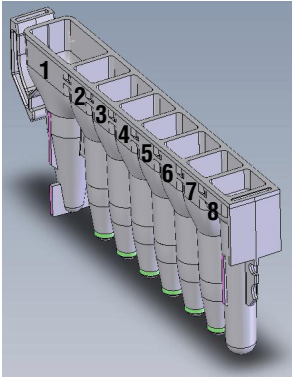
2. Aggiungere 15 µl di soluzione RNasi A nella camera n.3 della Maxwell® CSC Cartridge (CSCQ).
3. Posizionare uno stantuffo nella camera n.8 di ciascuna cartuccia.
4. Porre nell'apposita posizione una provetta di eluizione vuota per ciascuna cartuccia del vassoio.
Nota: usare esclusivamente le provette di eluizione fornite con il Maxwell® CSC Genomic DNA Kit. Altre provette di eluizione possono non essere compatibili con i Maxwell® CSC Instrument e interferire con la purificazione del DNA.
5. Aggiungere 50–200 µl di tampone di eluizione sul fondo di ciascuna provetta di eluizione.
Nota: usare esclusivamente il tampone di eluizione fornito con il Maxwell® CSC Genomic DNA Kit. L'impiego di altri tamponi di eluizione potrebbe interferire con la resa della purificazione del DNA.
6. Procedere alla Sezione 6, Esecuzione del Maxwell® Instrument.

5.G. Preparazione della Maxwell® CSC Genomic DNA Cartridge (continua)

Note sulla preparazione della Maxwell® CSC Genomic DNA Cartridge:



Eventuali fuoriuscite di campione o reagente su qualunque parte del vassoio devono essere pulite con una soluzione a base d'acqua e detergente e applicando successivamente uno spray battericida, oppure strofinando e lavando nuovamente con acqua. Non usare candeggina su nessuna parte dello strumento.



Componenti aggiunti dall'utente alle camere

1. Campione lisato
3. 15 µl di soluzione RNasi A
8. Stantuffo CSC/RSC

Figura 1. Maxwell® CSC Cartridge. Il campione lisato viene aggiunto alla camera n.1; una soluzione di 15 µl di RNasi A viene aggiunta alla camera n.3 e uno stantuffo viene aggiunto alla camera n.8.



Figura 2. Preparazione e allestimento dei vassoi. Il tampone di eluizione viene aggiunto alle provette di eluizione come indicato. Il vassoio illustrato è quello del Maxwell® CSC Instrument (Cat.# AS6000).

6. Esecuzione del Maxwell® Instrument

Per informazioni dettagliate, consultare il manuale tecnico specifico del Maxwell® CSC Instrument in uso. Vedere la Tabella 1.

1. Accendere il Maxwell® Instrument e il tablet PC. Accedere al tablet PC e avviare il software Maxwell® IVD mode toccando due volte l'icona sul desktop. Lo strumento procederà a un'auto-verifica e tutte le parti mobili verranno portate nella posizione base.
2. Selezionare **Avvia** nella schermata "Home".
3. Leggere o digitare il codice a barre nell'angolo in alto a destra dell'etichetta di Maxwell® CSC Genomic DNA Kit e premere **OK** per selezionare automaticamente il metodo da eseguire (Figura 3).

Nota: il codice a barre del metodo di Maxwell® CSC Genomic DNA Kit è necessario per la purificazione del DNA con i Maxwell® CSC Instrument. L'etichetta del kit contiene due codici a barre. Il codice a barre del metodo è indicato nella Figura 3. Se il codice a barre non è leggibile, contattare i Promega Technical Services.



Figura 3. Etichetta del kit con l'indicazione del codice a barre da leggere. Il codice a barre da leggere per avviare un ciclo di purificazione è indicato nella casella rossa nell'angolo in alto a destra dell'etichetta del kit.

4. Nella schermata "Impostazione cartuccia", confermare che il metodo Maxwell® CSC Genomic DNA sia visualizzato in cima. Toccare le posizioni della cartuccia per selezionare/deselezionare le posizioni da usare per questo ciclo di estrazione. Immettere eventuali informazioni di tracciabilità richieste per il campione e premere il pulsante **Procedi** per continuare.

Nota: quando si usa il Maxwell® CSC 48 Instrument, premere il pulsante **Anteriore** o **Posteriore** per selezionare o deselezionare le posizioni delle cartucce per il vassoio prescelto.

6. Esecuzione del Maxwell® Instrument (continua)

5. Una volta aperto lo sportello, confermare che tutte le voci della lista di controllo estrazione siano state eseguite. Verificare che i campioni siano stati aggiunti alla camera n.1 delle cartucce, che le cartucce siano caricate sullo strumento e che nella camera n.8 siano presenti le provette di eluizione stappate con tampone di eluizione e stantuffi. Trasferire i vassoi contenenti le cartucce preparate sulla piattaforma del Maxwell® Instrument.

Inserimento dei vassoi Maxwell®: tenere il vassoio dai lati per evitare di spostare le cartucce dal vassoio. Assicurarsi che il vassoio sia posizionato nel Maxwell® Instrument con le provette di eluizione il più vicino possibile allo sportello. Inclinare la parte posteriore del vassoio verso il basso e inserirla dentro lo strumento in modo che la parte posteriore del vassoio sia a contatto con la parte posteriore della piattaforma dello strumento. Premere la parte frontale del vassoio per fissarlo saldamente sulla piattaforma dello strumento. Se si riscontrano difficoltà nel posizionare il vassoio sulla piattaforma, verificare che il vassoio sia orientato correttamente. Accertarsi che il vassoio sia a livello con la piattaforma dello strumento e ben posizionato.

Nota: controllare l'identificativo sui vassoi Maxwell® a 24 posizioni per stabilire se devono essere posizionati nella parte anteriore o posteriore dello strumento.

6. Toccare il pulsante **Avvia** per iniziare il ciclo di estrazione. La piattaforma rientra e lo sportello si chiude.



Avvertenza: pericolo di schiacciamento.

Nota: se si usa un Maxwell® Instrument a 48 posizioni ed è stato abilitato il Vision System, i vassoi saranno letti quando lo piattaforma si ritrae. Qualsiasi errore nella configurazione dei vassoi (p. es., stantuffi non nella camera n.8, provette di eluizione non presenti e aperte) causerà il ritorno del software alla schermata “Impostazione cartuccia” e le posizioni problematiche saranno contrassegnate con un punto esclamativo racchiuso in un cerchio rosso. Toccare il punto esclamativo per visualizzare la descrizione dell'errore e risolvere tutti gli stati di errore. Toccare di nuovo il pulsante **Avvia** per ripetere la lettura dei vassoi e iniziare il ciclo di estrazione.

7. Maxwell® Instrument inizierà immediatamente il ciclo di purificazione. La schermata visualizzerà i passaggi man mano che vengono eseguiti e una stima del tempo rimanente per la fine del ciclo.

Note

- Toccando il pulsante **Interrompi** il ciclo sarà abbandonato. Tutti i campioni di un ciclo interrotto andranno persi.
 - Se il ciclo viene annullato prima che sia completato, potrebbe essere richiesto di controllare se gli stantuffi sono ancora caricati nell'apposita barra. Se nella barra sono presenti degli stantuffi, è necessario eseguire la **Rimozione Stantuffi** quando richiesto. Se non ci sono stantuffi nell'apposita barra, si può scegliere di saltare la **Rimozione Stantuffi** quando richiesto. I campioni andranno persi.
8. Una volta completato il ciclo, l'interfaccia utente visualizzerà un messaggio indicante che il metodo è stato completato.

Fine del ciclo

9. Seguire le istruzioni a schermo al termine del metodo per aprire lo sportello. Verificare che gli stantuffi si trovino nella camera n.8 della cartuccia al termine del ciclo. Se gli stantuffi non sono stati rimossi dalla barra, seguire le istruzioni del manuale d'uso del Maxwell® Instrument in uso (vedere la Tabella 1) per eseguire un processo di **Rimozione Stantuffi** e cercare di scaricare gli stantuffi.
10. Rimuovere il vassoio dallo strumento subito dopo il ciclo per evitare l'evaporazione degli eluiti. Rimuovere le provette di eluizione contenenti il DNA e tapparle.
Nota: dopo la procedura di purificazione automatica, il vassoio sarà caldo. Per rimuovere il vassoio dalla piattaforma dello strumento, tenerlo ai lati.
Assicurarsi che i campioni vengano rimossi dallo strumento prima di eseguire un protocollo di igienizzazione UV per evitare di danneggiare l'acido nucleico.
11. Rimuovere le cartucce e gli stantuffi dai vassoi Maxwell®. Smaltire come rifiuto pericoloso secondo le procedure della propria struttura. Non riutilizzare Maxwell® CSC Cartridges, stantuffi CSC/RSC o provette di eluizione.



7. Post-purificazione

Stabilire se la resa e la purezza del campione di DNA purificato sono conformi ai requisiti di immissione dell'analisi diagnostica downstream prima di impiegarlo in tale analisi.

8. Valutazione delle prestazioni analitiche

La valutazione delle prestazioni analitiche è stata eseguita con campioni umani con il Maxwell® CSC Genomic DNA Kit e i Maxwell® CSC Instrument.

8.A. Resa del DNA

La resa del DNA è stata valutata utilizzando il DNA purificato con il Maxwell® CSC Genomic DNA Kit da sangue intero fresco e congelato raccolto in provette con EDTA; da sangue intero congelato raccolto in provette con citrato ed eparina; da campioni di buffy coat freschi e congelati generati da sangue intero raccolto in provette con EDTA; da campioni di buffy coat congelati generati da sangue intero raccolto in provette con citrato ed eparina; da uno e due campioni orali pre-elaborati con una colonna di purificazione; da tessuto cardiaco, pancreatico e cerebrale; da cellule da coltura tissutale; e da aspirati di midollo osseo congelati raccolti in provette con EDTA, citrato ed eparina.

I grafici e la tabella di questa sezione rappresentano la resa dell'assorbanza di ciascun replicato che è stato purificato per ogni tipo di campione. Ogni puntino dei grafici rappresenta una singola misurazione sulla sinistra, mentre la media con la deviazione standard si trova sulla destra. Ciascun set di dati include un totale di 12 replicati, quattro purificati utilizzando il Maxwell® CSC Instrument e otto purificati con il Maxwell® CSC 48 Instrument.

Le tabelle sotto le legende delle figure descrivono le informazioni sui campioni per ciascun set di campioni mostrato nei grafici associati.

8.A. Resa del DNA (continua)

Sangue intero

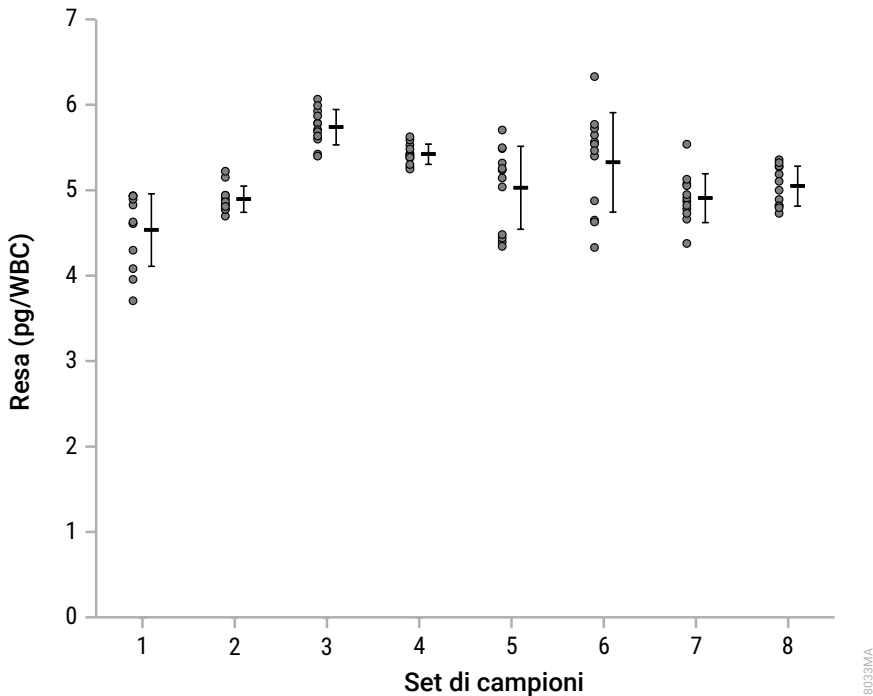


Figura 4. Resa del DNA del sangue intero. Per 300 μ l di campioni di sangue intero freschi e congelati raccolti in provette con EDTA e campioni di sangue intero congelato raccolti in provette con citrato ed eparina, l'intervallo delle rese medie di DNA è stato di 4,5–5,7 pg/WBC.

Set di campioni	Anticoagulante	Conservazione	Volume immesso (μ l)	Volume di eluizione (μ l)
1	EDTA	Congelato	300	50
2	EDTA	Congelato	300	200
3	EDTA	Fresco	300	50
4	EDTA	Fresco	300	200
5	Citrato	Congelato	300	50
6	Citrato	Congelato	300	200
7	Eparina	Congelato	300	50
8	Eparina	Congelato	300	200

Buffy coat

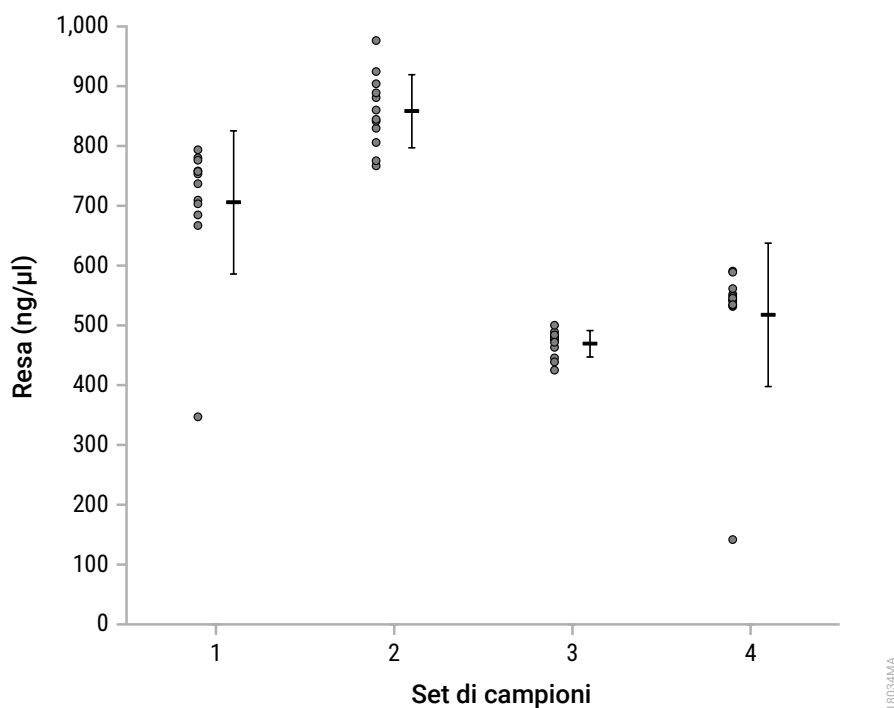


Figura 5. Resa del DNA dei buffy coat. Con un volume immesso di campione di 300 µl e un volume di eluizione di 200 µl per i campioni di buffy coat freschi e congelati generati da sangue intero raccolto in provette con EDTA e i campioni di buffy coat congelati generati da sangue intero raccolto in provette con citrato ed eparina, l'intervallo delle concentrazioni medie di DNA è stato di 469,3–858,2 ng/µl.

Set di campioni	Anticoagulante	Conservazione	Volume immesso (µl)	Volume di eluizione (µl)
1	EDTA	Congelato	300	200
2	EDTA	Fresco	300	200
3	Citrato	Congelato	300	200
4	Eparina	Congelato	300	200

8.A. Resa del DNA (continua)

Tampone orale

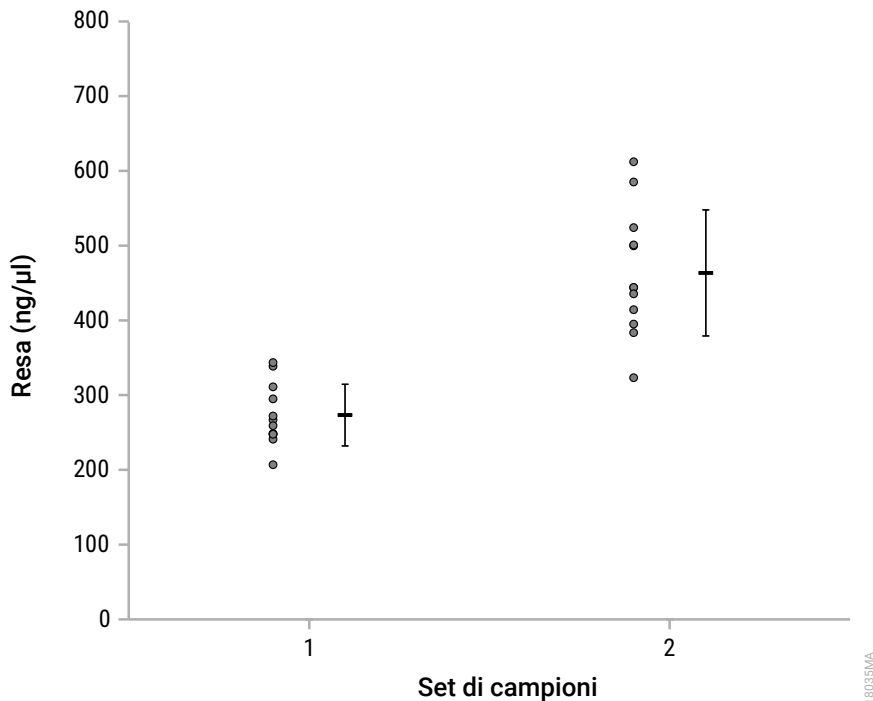


Figura 6. Resa del DNA dei tamponi orali. Per uno e due tamponi orali immessi, pre-elaborati con una colonna di purificazione, l'intervallo delle concentrazioni di DNA medie è stato di 273,2–463,5 ng/μl. Il set di campioni 1 si riferisce a un campione e il set di campioni 2 si riferisce a due tamponi. Per tutti i campioni è stato utilizzato un volume di eluizione di 50 μl.

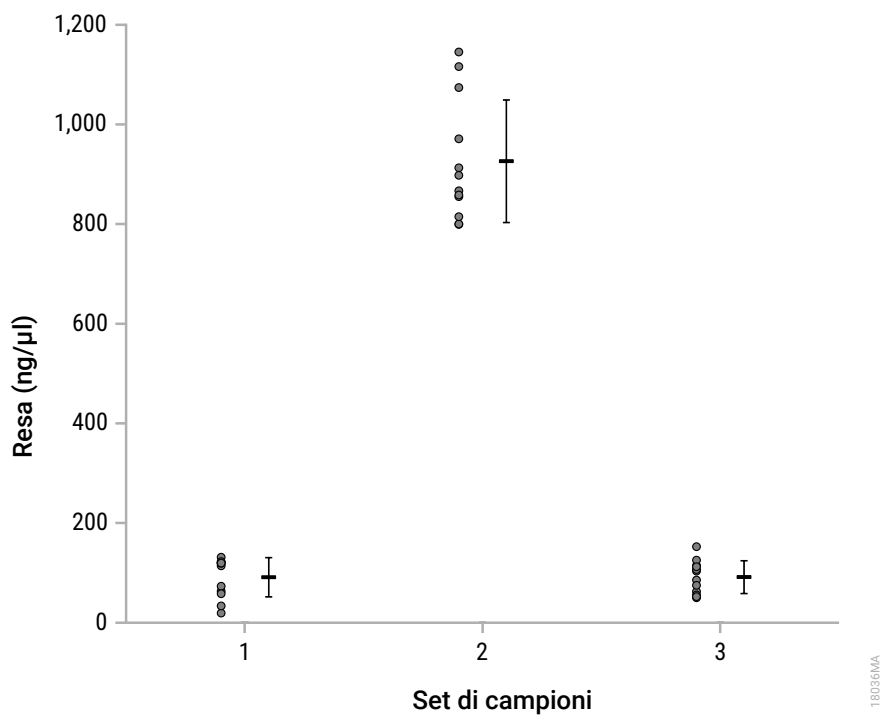
Tessuto


Figura 7. Resa del DNA dei tessuti. Per 50 mg di tessuto cardiaco, pancreatico e cerebrale con un volume di eluizione di 200 μ l, l'intervallo delle concentrazioni medie di DNA è stato di 91,2–926,0 ng/ μ l. Il set di campioni 1 si riferisce al tessuto cardiaco, il set di campioni 2 al tessuto pancreatico e il set di campioni 3 al tessuto cerebrale.

8.A. Resa del DNA (continua)

Cellule

Per 5×10^6 di cellule HEK293 da coltura tissutale con un volume di eluizione di 200 μl , la concentrazione media di DNA è stata di 550,2 ng/ μl .

Tipo di cellula	Numero di cellule immerse	Volume di eluizione	Concentrazione (ng/ μl)
Cellule HEK293 da coltura tissutale	5×10^6	200 μl	523,4
			526,8
			536,1
			650,1
			481,6
			522,9
			530,4
			618,9
			546,5
			550,1
			569,9
			545,4
Media			550,2

Midollo osseo

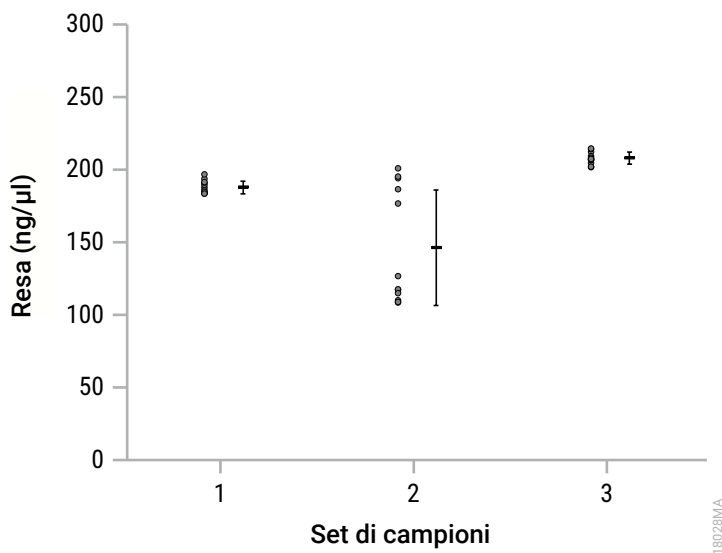


Figura 8. Resa del DNA del midollo osseo. Per 300 μl di aspirati di midollo osseo raccolti in provette con EDTA, citrato ed eparina e con un volume di eluizione di 200 μl, l'intervallo delle concentrazioni medie di DNA è stato di 146,3–207,8 ng/μl. Il set di campioni 1 fa riferimento agli aspirati di midollo osseo raccolti in provette con EDTA, il set di campioni 2 fa riferimento agli aspirati di midollo osseo raccolti in provette con citrato e il set di campioni 3 fa riferimento agli aspirati di midollo osseo raccolti in provette con eparina.

8.B. Qualità del DNA (purezza)

Le purezze del DNA sono state valutate utilizzando il DNA purificato con il Maxwell® CSC Genomic DNA Kit da sangue intero fresco e congelato raccolto in provette con EDTA; da sangue intero congelato raccolto in provette con citrato ed eparina; da campioni di buffy coat freschi e congelati generati da sangue intero raccolto in provette con EDTA; da campioni di buffy coat congelati generati da sangue intero raccolto in provette con citrato ed eparina; da uno e due tamponi orali pre-elaborati con una colonna di purificazione; da tessuto cardiaco, pancreatico e cerebrale; da cellule da coltura tissutale; e da aspirati di midollo osseo congelati raccolti in provette con EDTA, citrato ed eparina.

I grafici e la tabella di questa sezione rappresentano i rapporti di assorbanza A_{260}/A_{280} e purezza A_{260}/A_{230} di ciascun replicato purificato per ciascun tipo di campione. Ogni puntino dei grafici rappresenta una singola misurazione sulla sinistra, mentre la media con la deviazione standard si trova sulla destra. Ciascun set di dati include un totale di 12 replicati, quattro purificati utilizzando il Maxwell® CSC Instrument e otto purificati con il Maxwell® CSC 48 Instrument.

Le tabelle sotto le legende delle figure descrivono le informazioni sui campioni per ciascun set di campioni mostrato nei grafici associati.

8.B. Qualità del DNA (purezza; continua)

Sangue intero

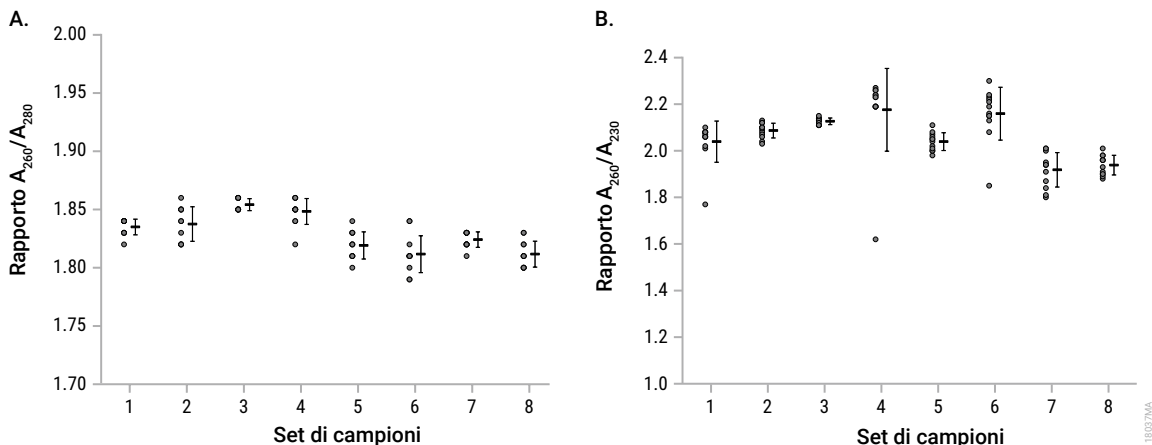


Figura 9. Qualità del DNA del sangue intero. Per 300 μ l di campioni di sangue intero freschi e congelati raccolti in provette con EDTA e di campioni di sangue intero congelati raccolti in provette con citrato ed eparina, l'intervallo dei rapporti medi A_{260}/A_{280} è stato di 1,8–1,9 (**Riquadro A**) e l'intervallo dei rapporti medi A_{260}/A_{230} è stato di 1,9–2,2 (**Riquadro B**).

Set di campioni	Anticoagulante	Conservazione	Volume immesso (μ l)	Volume di eluizione (μ l)
1	EDTA	Congelato	300	50
2	EDTA	Congelato	300	200
3	EDTA	Fresco	300	50
4	EDTA	Fresco	300	200
5	Citrato	Congelato	300	50
6	Citrato	Congelato	300	200
7	Eparina	Congelato	300	50
8	Eparina	Congelato	300	200

Buffy coat

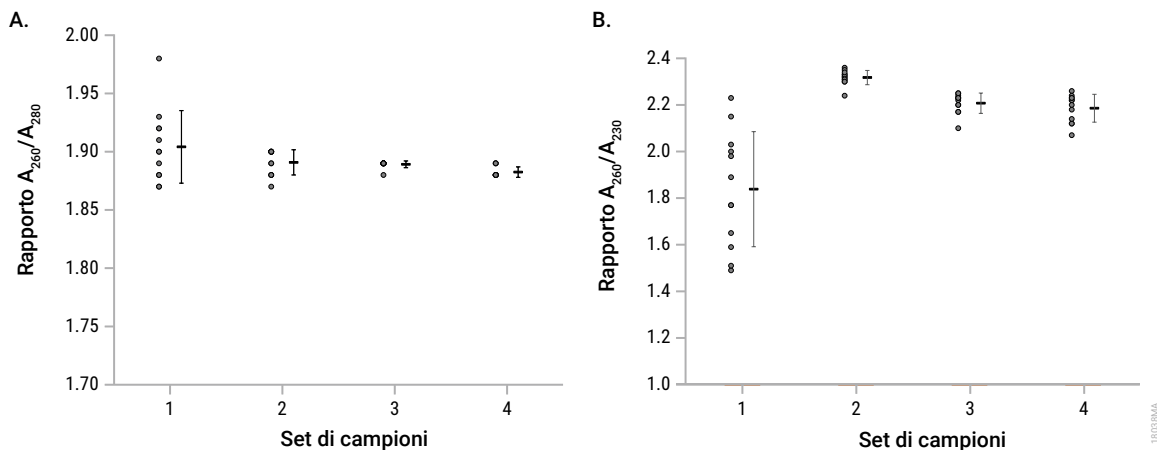


Figura 10. Qualità del DNA dei buffy coat. Con un volume immesso di campione di 300 μ l e un volume di eluizione di 200 μ l per campioni di buffy coat freschi e congelati generati da sangue intero raccolto in provette con EDTA, e di campioni di buffy coat congelati generati da sangue intero raccolto in provette con citrato ed eparina, l'intervallo dei rapporti medi A_{260}/A_{280} è stato di circa 1,9 (**Riquadro A**) e l'intervallo dei rapporti medi A_{260}/A_{230} è stato di 1,8–2,3 (**Riquadro B**).

Set di campioni	Anticoagulante	Conservazione	Volume immesso (μ l)	Volume di eluizione (μ l)
1	EDTA	Congelato	300	200
2	EDTA	Fresco	300	200
3	Citrato	Congelato	300	200
4	Eparina	Congelato	300	200

8.B. Qualità del DNA (purezza; continua)

Tampone orale

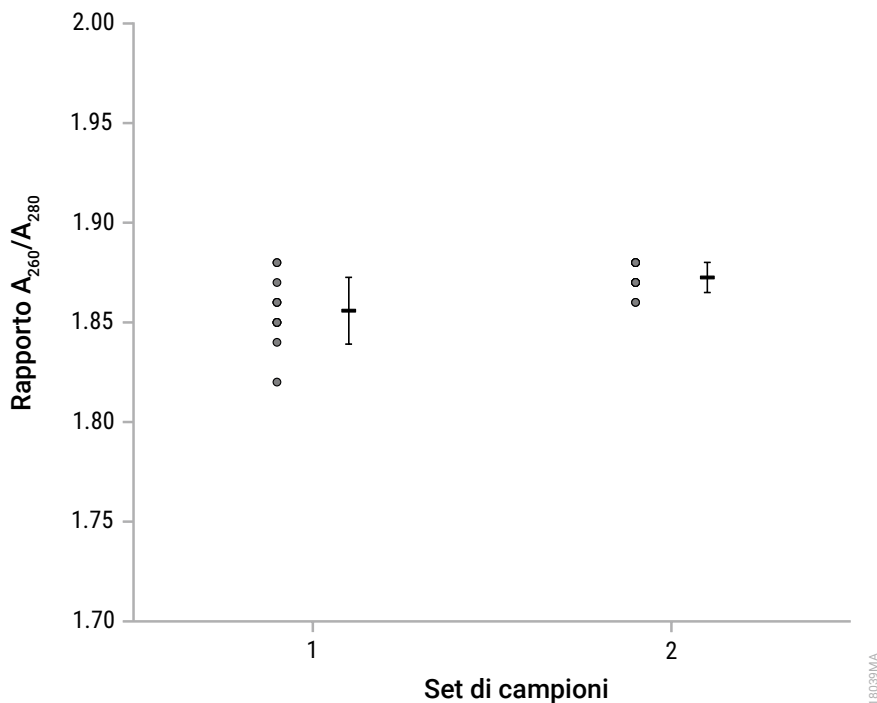


Figura 11. Qualità del DNA dei tamponi orali. Per uno e due tamponi orali immessi pre-elaborati con una colonna di purificazione e con un volume di eluizione di 50 μ l, l'intervallo dei rapporti medi A_{260}/A_{280} è stato di 1,8–1,9. Nel grafico, il set di campioni 1 si riferisce a un tampone e il set di campioni 2 si riferisce a due tamponi.

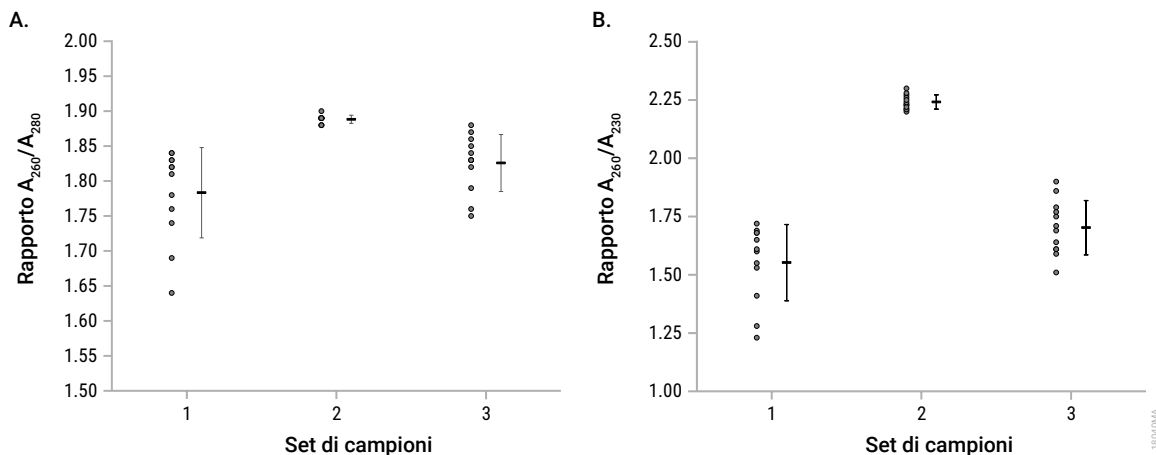
Tessuto


Figura 12. Qualità del DNA dei tessuti. Per 50 mg di tessuto cardiaco, pancreatico e cerebrale con un volume di eluizione di 200 μ l l'intervallo dei rapporti A_{260}/A_{280} medi è stato di 1,7–1,9 (**Riquadro A**) e l'intervallo dei rapporti A_{260}/A_{230} medi è stato di 1,5–2,3 (**Riquadro B**). Nel grafico, il set di campioni 1 si riferisce al tessuto cardiaco, il set di campioni 2 al tessuto pancreatico e il set di campioni 3 al tessuto cerebrale.

8.B. Qualità del DNA (purezza; continua)

Cellule

Per 5×10^6 cellule HEK293 da coltura tissutale con un volume di eluizione di 200 μ l, il rapporto A_{260}/A_{280} medio è stato di 1,9 e il rapporto A_{260}/A_{230} medio è stato di 2,3.

Tipo di cellula	Numero di cellule immerse	Volume di eluizione	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
Cellule HEK293 da coltura tissutale	5×10^6	200 μ l	1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,2
			1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,2
			1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,3
		Media	1,9	2,3

Midollo osseo

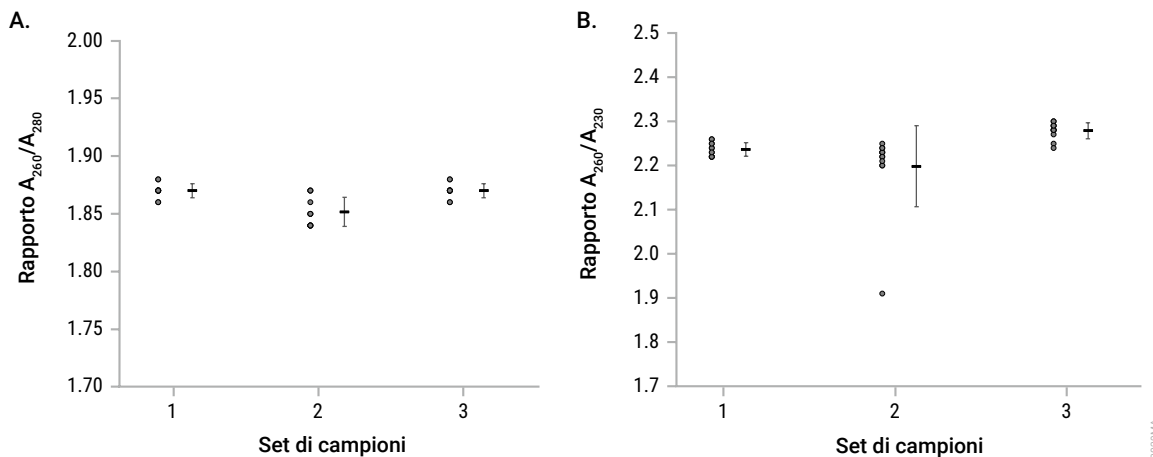


Figura 13. Qualità del DNA del midollo osseo. Per 300 μ l di aspirati di midollo osseo raccolti in provette con EDTA, citrato ed eparina e con un volume di eluizione di 200 μ l, l'intervallo dei rapporti A_{260}/A_{280} medi è stato di 1,8–1,9 (**Riquadro A**) e l'intervallo dei rapporti A_{260}/A_{230} medi è stato di 2,2–2,3 (**Riquadro B**). Nel grafico, il set di campioni 1 fa riferimento agli aspirati di midollo osseo raccolti in provette con EDTA, il set di campioni 2 fa riferimento agli aspirati di midollo osseo raccolti in provette con citrato e il set di campioni 3 fa riferimento agli aspirati di midollo osseo raccolti in provette con eparina.

8.C. Riproducibilità

Per valutare la precisione nella purificazione del DNA all'interno di ciascun ciclo di estrazione, il DNA è stato purificato da otto replicati di 300 µl di un singolo campione di sangue umano intero durante tre cicli di strumento con lo Strumento 1 e quattro replicati da 300 µl di un singolo campione di sangue umano intero durante tre cicli di strumento con lo Strumento 2. La resa del DNA è stata quantificata mediante l'assorbanza, e successivamente è stato calcolato il coefficiente di variazione (CV percentuale) per ciascuno dei tre cicli per ogni strumento. La resa del DNA con il Maxwell® CSC Genomic DNA Kit era riproducibile all'interno di ogni ciclo, con i CV percentuali all'interno del ciclo nell'intervallo di 6–9% per lo Strumento 1 e di 5–12% per lo Strumento 2.

Per determinare la precisione nella purificazione del DNA tra cicli di estrazione, il DNA è stato purificato da otto replicati di 300 µl di un singolo campione di sangue umano intero durante tre cicli di strumento con lo Strumento 1 e quattro replicati da 300 µl di un singolo campione di sangue umano intero durante tre cicli di strumento con lo Strumento 2. La resa del DNA è stata quantificata mediante l'assorbanza, e successivamente è stato calcolato il coefficiente di variazione (CV percentuale) per tutti i campioni di tutti e tre i cicli per ogni strumento. La resa del DNA con il Maxwell® CSC Genomic DNA Kit era riproducibile tra i cicli, con un CV del 7% all'interno del ciclo per lo Strumento 1 e dell'8% per lo Strumento 2.

Strumento	N. ciclo	Percentuale CV intraserie	Percentuale CV interserie
1	1 (n = 8)	9%	7%
	2 (n = 8)	7%	
	3 (n = 8)	6%	
2	1 (n = 4)	12%	8%
	2 (n = 4)	7%	
	3 (n = 4)	5%	

8.D. Amplificabilità

La compatibilità con l'amplificazione a valle è stata valutata utilizzando il DNA purificato da sangue intero fresco e congelato raccolto in provette con EDTA; da sangue intero congelato raccolto in provette con citrato ed eparina; da campioni di buffy coat freschi e congelati generati da sangue intero raccolto in provette con EDTA; da campioni di buffy coat congelati generati da sangue intero raccolto in provette con citrato ed eparina; da 1 e 2 campioni orali con e senza pre-elaborazione con una colonna di purificazione; da tessuto cardiaco, pancreatico e cerebrale; da cellule da coltura tissutale; da liquido amniotico, urina e PBMC; e da aspirati di midollo osseo congelati raccolti in provette con EDTA, citrato ed eparina con il Maxwell® CSC Genomic DNA Kit.

Le purificazioni del DNA sono state eseguite per ogni tipo di campione con i volumi di campione immesso e di eluizione più alti e più bassi per ciascun tipo di campione. Le cellule da coltura tissutale e PBMC includevano anche una diluizione seriale di cellule.

Il DNA da tutti i campioni è stato quantificato mediante l'assorbanza, diluito a una concentrazione all'interno della curva qPCR standard e quindi amplificato con un'analisi della qPCR utilizzando il target 300 bp. Vengono riportati il valore C_q per ciascun campione di DNA purificato e il valore medio di C_q per tre replicati di DNA genomico umano 0,0032 ng/ μ l standard fornito con l'analisi della qPCR.

I grafici in questa sezione rappresentano i valori C_q di ciascun replicato che è stato purificato per ogni tipo di campione. Ogni puntino dei grafici rappresenta una singola misurazione sulla sinistra, mentre la media con la deviazione standard si trova sulla destra. Ciascun set di dati include un totale di 12 replicati, quattro purificati utilizzando il Maxwell® CSC Instrument e otto purificati con il Maxwell® CSC 48 Instrument.

Le tabelle sotto le legende delle figure descrivono le informazioni sui campioni per ciascun set di campioni mostrato nei grafici associati.

8.D. Amplificabilità (continua)

Sangue intero

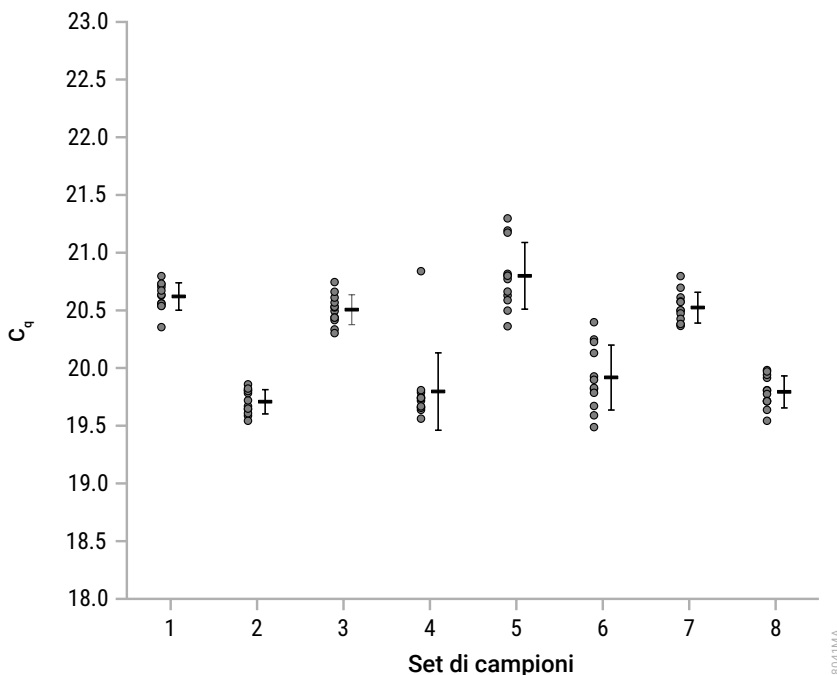


Figura 14. Amplificazione del DNA del sangue intero. Per i campioni di sangue intero freschi e congelati raccolti in provette con EDTA, l'intervallo dei valori C_q è stato di 19,54–20,80 cicli, e tutti sono risultati notevolmente inferiori al valore C_q medio per il DNA 0,0032 ng/µl standard (33,11 cicli). Per i campioni di sangue intero congelati raccolti in provette con citrato ed eparina, l'intervallo dei valori C_q è stato di 19,49–21,30 cicli, e tutti sono risultati notevolmente inferiori al valore C_q medio per il DNA 0,0032 ng/µl standard (32,88 cicli).

Set di campioni	Anticoagulante	Conservazione	Volume immesso (µl)	Volume di eluizione (µl)
1	EDTA	Congelato	50	50
2	EDTA	Congelato	300	200
3	EDTA	Fresco	50	50
4	EDTA	Fresco	300	200
5	Citrato	Congelato	50	50
6	Citrato	Congelato	300	200
7	Eparina	Congelato	50	50
8	Eparina	Congelato	300	200

Buffy coat

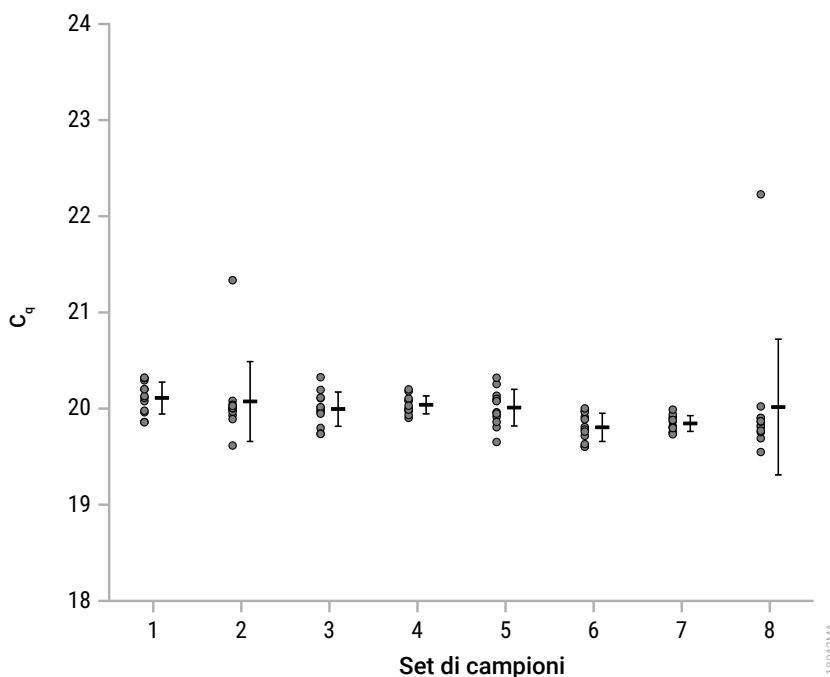


Figura 15. Amplificazione del DNA dei buffy coat. Per i campioni di buffy coat freschi e congelati generati da sangue intero raccolto in provette con EDTA, l'intervallo dei valori C_q è stato di 19,62–21,34 cicli e tutti sono risultati notevolmente inferiori al valore C_q medio per il DNA 0,0032 ng/ μ l standard (33,09 cicli). Per i campioni di buffy coat congelati generati da sangue intero raccolto in provette con citrato ed eparina, l'intervallo dei valori C_q è stato di 19,55–22,23 cicli e tutti sono risultati notevolmente inferiori al valore C_q medio per il DNA 0,0032 ng/ μ l standard (32,86 cicli).

Set di campioni	Anticoagulante	Conservazione	Volume immesso (μ l)	Volume di eluizione (μ l)
1	EDTA	Congelato	50	50
2	EDTA	Congelato	300	200
3	EDTA	Fresco	50	50
4	EDTA	Fresco	300	200
5	Citrato	Congelato	50	50
6	Citrato	Congelato	300	200
7	Eparina	Congelato	50	50
8	Eparina	Congelato	300	200

8.D. Amplificabilità (continua)

Tampone orale

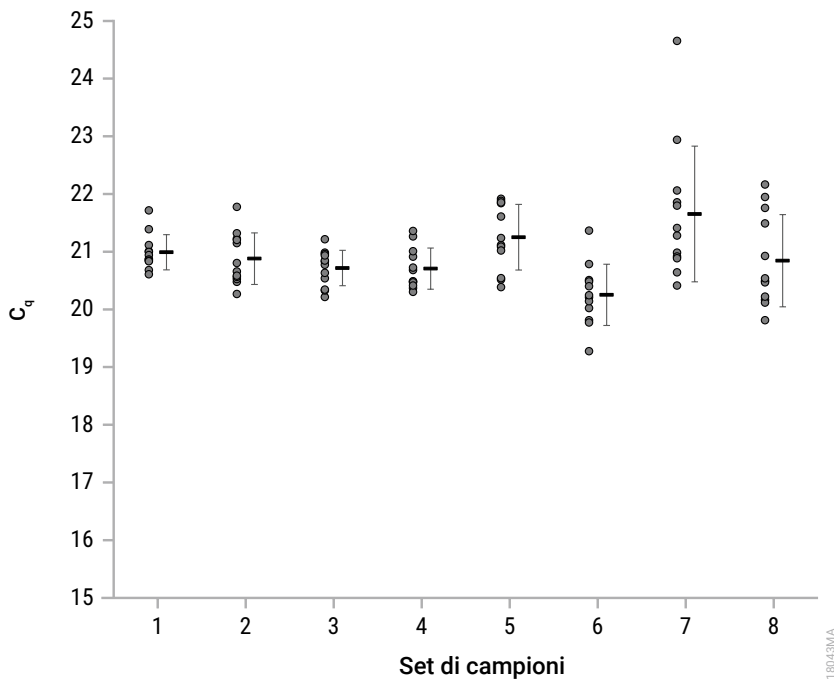


Figura 16. Amplificazione del DNA dei tamponi orali. Per uno e due tamponi orali immessi, pre-elaborati con una colonna di purificazione, l'intervallo dei valori C_q è stato di 20,22–21,78 cicli, e tutti sono risultati notevolmente inferiori al C_q medio per il DNA 0,0032 ng/µl standard (32,45 cicli). Per uno e due tamponi orali immessi, pre-elaborati senza una colonna di purificazione, l'intervallo dei valori C_q è stato di 19,28–24,65 cicli, e tutti sono risultati notevolmente inferiori al valore C_q medio per il DNA 0,0032 ng/µl standard (32,54 cicli).

Set di campioni	Numero di tamponi	Pre-elaborazione	Volume di eluizione (µl)
1	1 tampone	Con colonna di purificazione	50
2	1 tampone	Con colonna di purificazione	200
3	2 tamponi	Con colonna di purificazione	50
4	2 tamponi	Con colonna di purificazione	200
5	1 tampone	Senza colonna di purificazione	50
6	1 tampone	Senza colonna di purificazione	200
7	2 tamponi	Senza colonna di purificazione	50
8	2 tamponi	Senza colonna di purificazione	200

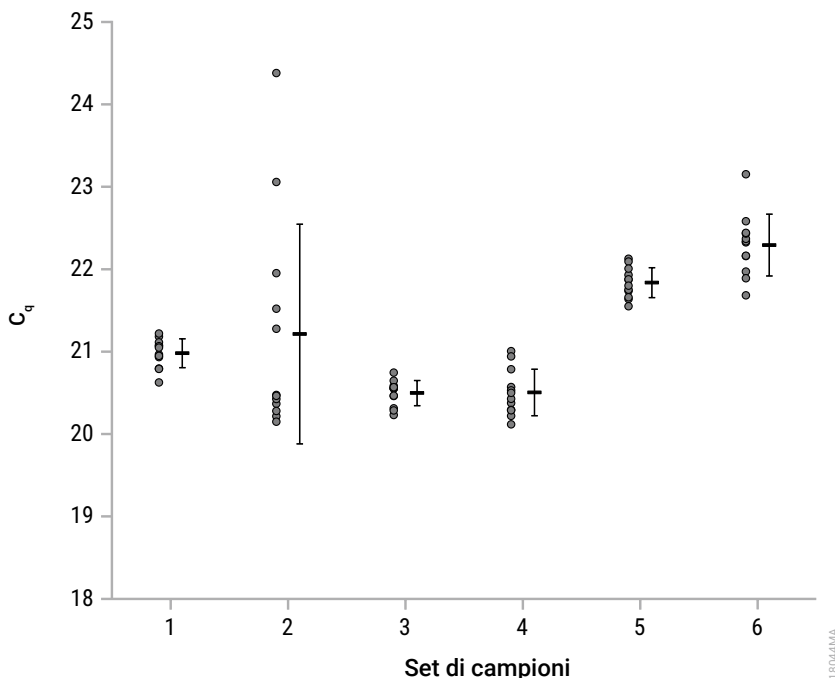
Tessuto


Figura 17. Amplificazione del DNA dei tessuti. Per i tessuti cardiaco e pancreatico, l'intervallo dei valori C_q è stato di 20,12–24,38 cicli, e tutti sono risultati notevolmente inferiori al valore C_q medio per il DNA 0,0032 ng/ μ l standard (32,98 cicli). Per il tessuto cerebrale, l'intervallo dei valori C_q è stato di 21,55–23,15 cicli, e tutti sono risultati notevolmente inferiori al valore C_q medio per il DNA 0,0032 ng/ μ l standard (33,68 cicli).

Set di campioni	Tipo di tessuto	Quantità immessa (mg)	Volume di eluizione (μ l)
1	Cardiaco	5	50
2	Cardiaco	50	200
3	Pancreatico	5	50
4	Pancreatico	50	200
5	Cerebrale	5	50
6	Cerebrale	50	200

8.D. Amplificabilità (continua)

Cellule

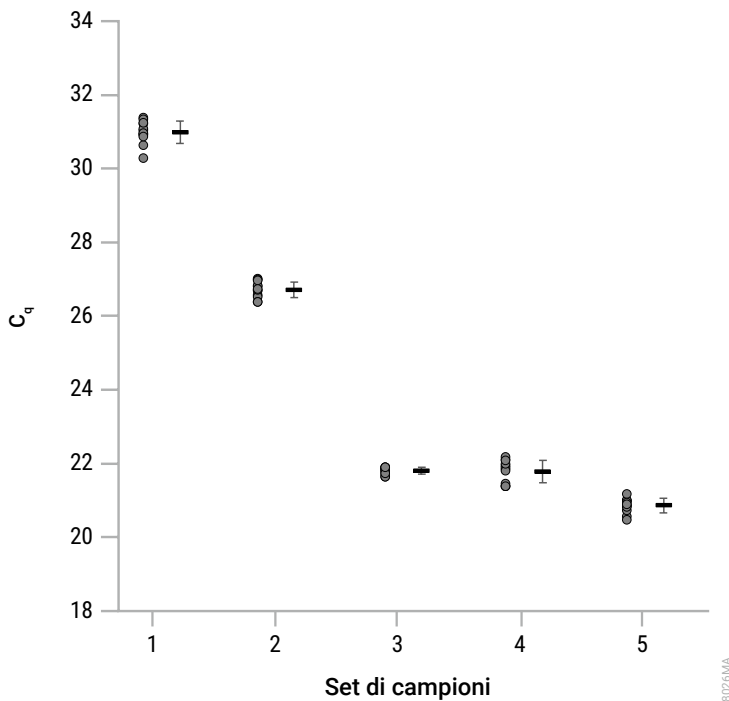


Figura 18. Amplificazione del DNA delle cellule da coltura tissutale. Per la diluizione seriale delle cellule HEK293 da coltura tissutale l'intervallo dei valori C_t è stato di 20,48–31,38 cicli, e tutti sono risultati inferiori al valore C_t medio per il DNA 0,0032 ng/ μ l standard (33,04 cicli).

Set di campioni	Tipo di cellula	Numero di cellule	Volume di eluizione (μ l)
1	Cellule HEK293 da coltura tissutale	5×10^2	50
2	Cellule HEK293 da coltura tissutale	5×10^3	50
3	Cellule HEK293 da coltura tissutale	5×10^4	50
4	Cellule HEK293 da coltura tissutale	5×10^5	200
5	Cellule HEK293 da coltura tissutale	5×10^6	200

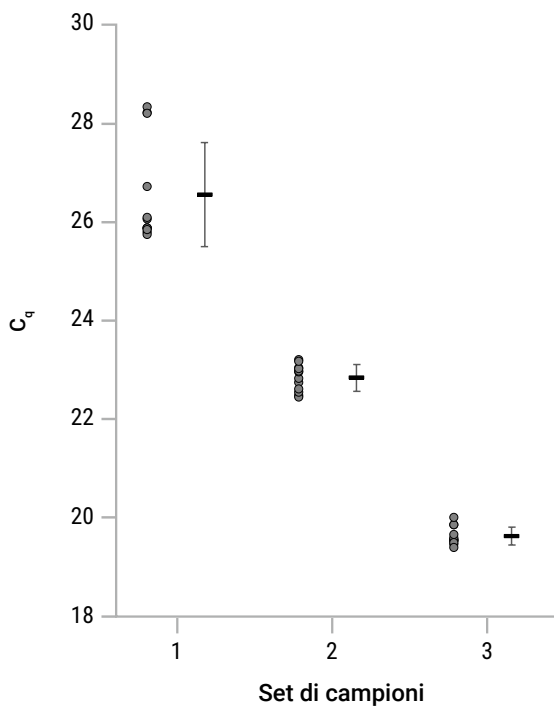


Figura 19. Amplificazione del DNA delle PBMC. Per la diluizione seriale delle PBMC l'intervallo dei valori C_q è stato di 19,40–28,33 cicli, e tutti sono risultati inferiori al valore C_q medio per il DNA 0,0032 ng/ μ l standard (32,80 cicli).

Set di campioni	Tipo di cellula	Numero di cellule	Volume di eluizione (μ l)
1	PBMC	5×10^4	50
2	PBMC	5×10^5	100
3	PBMC	5×10^6	200

8.D. Amplificabilità (continua)

Cellule (continua)

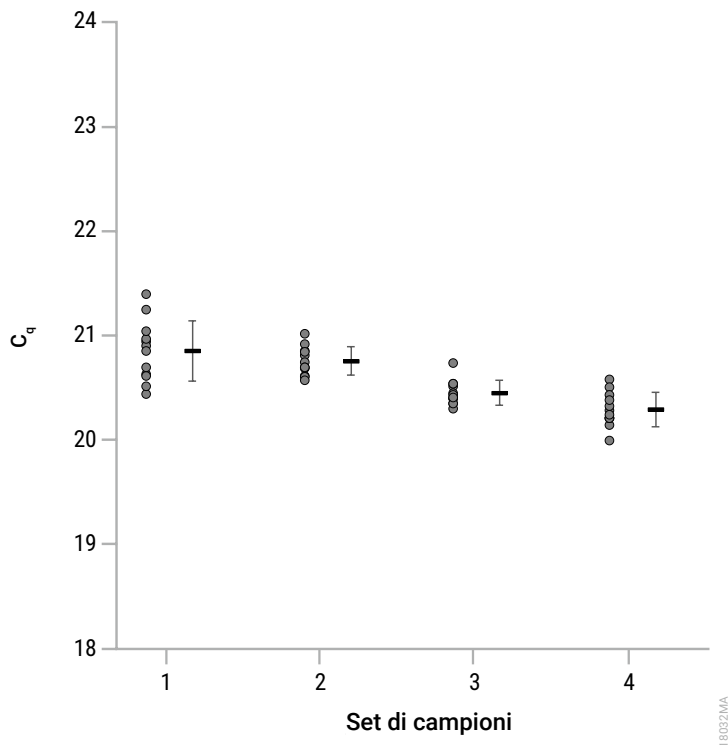


Figura 20. Amplificazione del DNA dell'urina e del liquido amniotico. Per le cellule ottenute da campioni di urina e liquido amniotico l'intervallo di valori C_q è stato di 20,00–21,40 cicli, e tutti sono risultati notevolmente inferiori al valore C_q medio per il DNA 0,0032 ng/ μ l standard (32,71 cicli).

Set di campioni	Tipo di cellula	Volume immesso (ml)	Volume di eluizione (μ l)
1	Urina	15	50
2	Urina	50	50
3	Liquido amniotico	1	50
4	Liquido amniotico	5	50

Midollo osseo

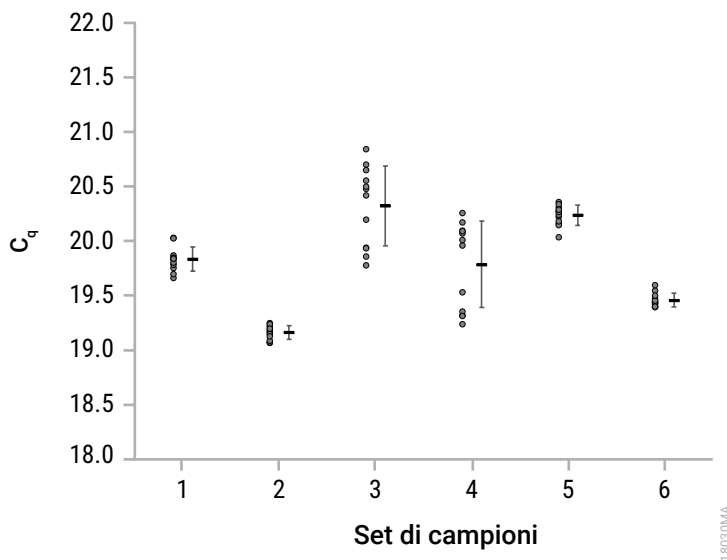


Figura 21. Amplificazione del DNA del midollo osseo. Per gli aspirati di midollo osseo congelati raccolti in provette con EDTA e citrato, l'intervallo dei valori C_q è stato di 19,07–20,84 cicli, e tutti sono risultati notevolmente inferiori al valore C_q medio per il DNA 0,0032 ng/µl standard (32,42 cicli). Per gli aspirati di midollo osseo raccolti in provette con eparina, l'intervallo dei valori C_q è stato di 19,40–20,36 cicli, e tutti sono risultati notevolmente inferiori al valore C_q medio per il DNA 0,0032 ng/µl standard (32,82 cicli).

Set di campioni	Anticoagulante	Volume immesso (µl)	Volume di eluizione (µl)
1	EDTA	50	50
2	EDTA	300	200
3	Citrato	50	50
4	Citrato	300	200
5	Eparina	50	50
6	Eparina	300	200

8.E. Inibizione (sostanze interferenti)

L'inibizione dell'amplificazione è stata valutata utilizzando il DNA purificato da sangue intero fresco e congelato raccolto in provette con EDTA; da sangue intero congelato raccolto in provette con citrato ed eparina; da campioni di buffy coat freschi e congelati generati da sangue intero raccolto in provette con EDTA; da campioni di buffy coat congelati generati da sangue intero raccolto in provette con citrato ed eparina; da uno e due campioni orali con e senza pre-elaborazione con una colonna di purificazione; da tessuto cardiaco, pancreatico e cerebrale; da cellule da coltura tissutale; da liquido amniotico, urina e PBMC; e da aspirati di midollo osseo congelati raccolti in provette con EDTA, citrato ed eparina con il Maxwell® CSC Genomic DNA Kit.

Le purificazioni di DNA sono state eseguite per ciascun tipo di campione. Per questa analisi sono state valutate le quantità di volume immesse e i volume di eluizione in cui sarebbe necessaria la quantità minima di eluizione per i campioni da utilizzare nella qPCR.

Il DNA è stato quantificato e diluito a una concentrazione all'interno della curva standard della qPCR e un'aliquota di ciascun DNA è stata quindi diluita per altre otto volte. Le diluizioni iniziali del DNA e le successive otto sono state amplificate utilizzando un'analisi della qPCR. È stata riportata la differenza nei valori C_q ($|\Delta C_q|$) per la sequenza target 300 bp. Un $|\Delta C_q|$ di 3 ± 1 cicli corrisponde a nessuna inibizione dell'amplificazione del DNA dovuta a sostanze endogene ed esogene che possono essere presenti nei campioni.

I grafici in questa sezione rappresentano i $|\Delta C_q|$ di ciascun replicato che è stato purificato per ogni tipo di campione. Ogni puntino dei grafici rappresenta una singola misurazione sulla sinistra, mentre la media con la deviazione standard si trova sulla destra. Ciascun set di dati include un totale di 12 replicati, quattro purificati utilizzando il Maxwell® CSC Instrument e otto purificati con il Maxwell® CSC 48 Instrument.

Le tabelle sotto le legende delle figure descrivono le informazioni sui campioni per ciascun set di campioni mostrato nei grafici associati.

Sangue intero

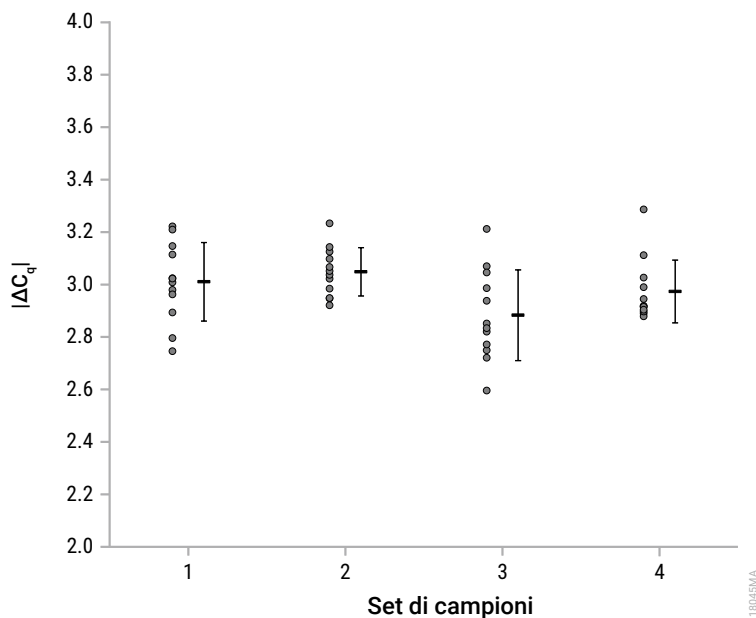


Figura 22. Test per l'inibizione nell'amplificazione del DNA del sangue intero. Per i campioni di sangue intero freschi e congelati raccolti in provette con EDTA, l'intervallo dei valori $|\Delta C_q|$ è rientrato tra un minimo di 2,75 e un massimo di 3,23 cicli. Per i campioni di sangue intero congelati raccolti in provette con citrato ed eparina, l'intervallo dei valori $|\Delta C_q|$ è rientrato tra un minimo di 2,60 e un massimo di 3,29 cicli.

Set di campioni	Anticoagulante	Conservazione	Volume immesso (μl)	Volume di eluizione (μl)
1	EDTA	Congelato	50	50
2	EDTA	Fresco	50	50
3	Citrato	Congelato	50	50
4	Eparina	Congelato	50	50

8.E. Inibizione (sostanze interferenti; continua)

Buffy coat

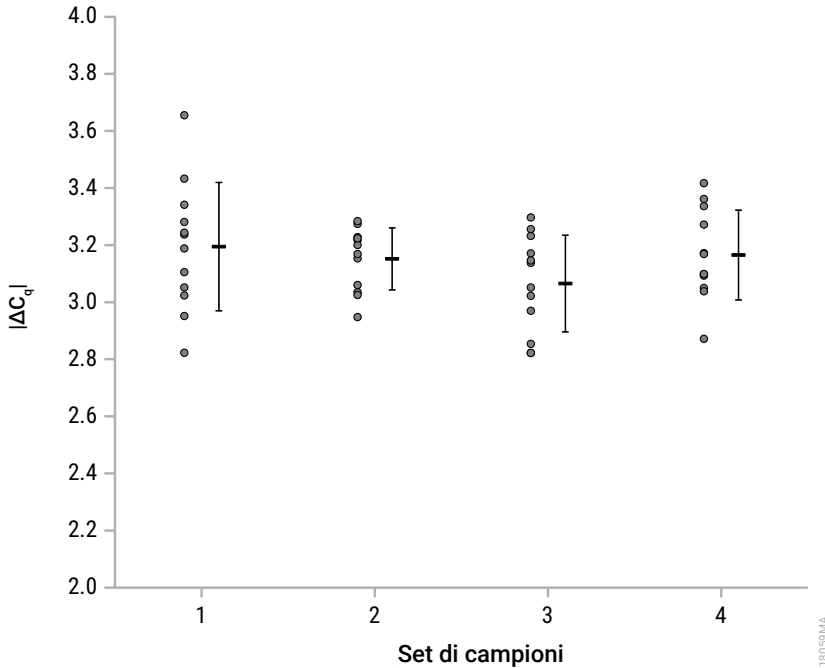


Figura 23. Test per l'inibizione nell'amplificazione del DNA dei buffy coat. Per i campioni di buffy coat freschi e congelati generati da sangue intero raccolti in provette con EDTA, l'intervallo dei valori $|\Delta C_q|$ è rientrato tra un minimo di 2,82 e un massimo di 3,65 cicli. Per i campioni di buffy coat congelati generati da sangue intero raccolto in provette con citrato ed eparina, l'intervallo dei valori $|\Delta C_q|$ è rientrato tra un minimo di 2,82 e un massimo di 3,42 cicli.

Set di campioni	Anticoagulante	Conservazione	Volume immesso (μl)	Volume di eluizione (μl)
1	EDTA	Congelato	50	50
2	EDTA	Fresco	50	50
3	Citrato	Congelato	50	50
4	Eparina	Congelato	50	50

Tampone orale

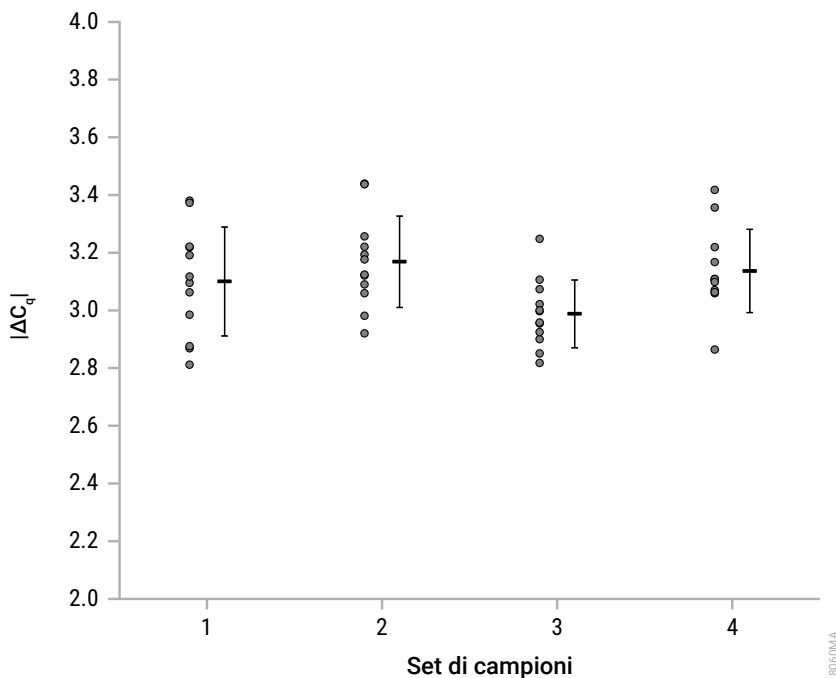


Figura 24. Test per l'inibizione nell'amplificazione del DNA dei tamponi orali. Per uno e due tamponi orali immessi, pre-elaborati con una colonna di purificazione, l'intervallo dei valori $|\Delta C_q|$ è rientrato tra un minimo di 2,81 e un massimo di 3,44 cicli. Per uno e due tamponi orali immessi, pre-elaborati senza una colonna di purificazione, l'intervallo dei valori $|\Delta C_q|$ è rientrato tra un minimo di 2,82 e un massimo di 3,42 cicli.

Set di campioni	Numero di tamponi	Pre-elaborazione	Volume di eluizione (µl)
1	1 tamponi	Con colonna di purificazione	50
2	2 tamponi	Con colonna di purificazione	50
3	1 tamponi	Senza colonna di purificazione	50
4	2 tamponi	Senza colonna di purificazione	50

8.E. Inibizione (sostanze interferenti; continua)

Tessuto

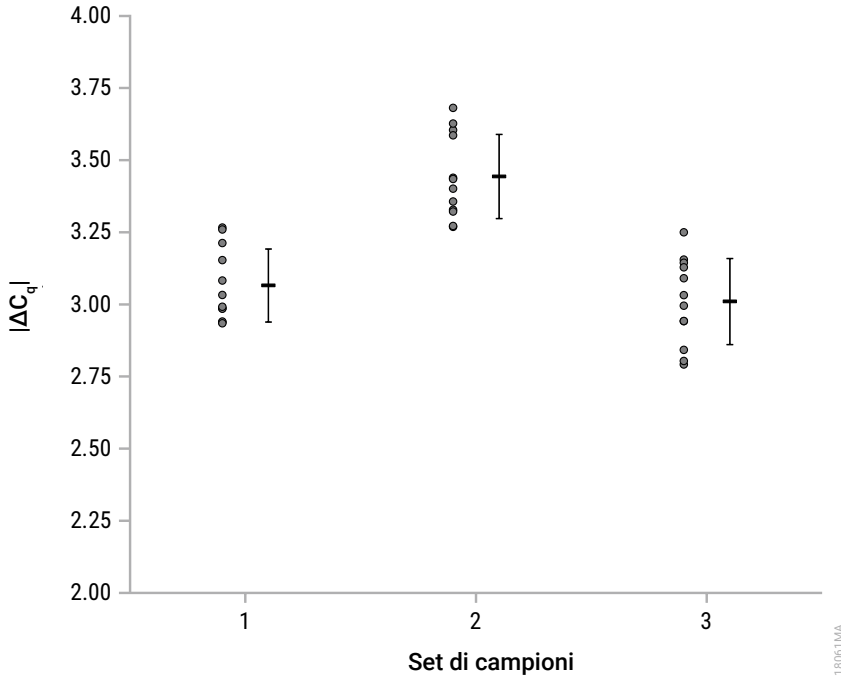


Figura 25. Test per l'inibizione nell'amplificazione del DNA dei tessuti. Per i tessuti cardiaco e pancreatico di 5 mg, l'intervallo dei valori $|\Delta C_q|$ è rientrato tra un minimo di 2,93 e un massimo di 3,68 cicli. Per il tessuto cerebrale di 5 mg, l'intervallo dei valori $|\Delta C_q|$ è rientrato tra un minimo di 2,79 e un massimo di 3,25 cicli. Per tutti i campioni è stato utilizzato un volume di eluizione di 50 μ l. Nel grafico, il set di campioni 1 si riferisce al tessuto cardiaco, il set di campioni 2 al tessuto pancreatico e il set di campioni 3 al tessuto cerebrale.

Cellule

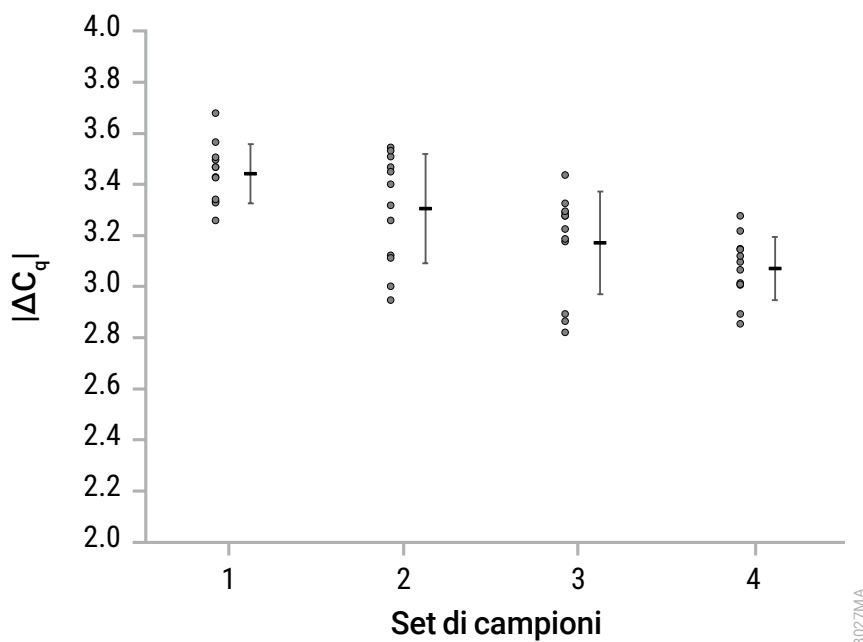


Figura 26. Test per l'inibizione nell'amplificazione del DNA delle cellule. Per 5×10^4 cellule HEK293 da coltura tissutale con un volume di eluizione di 50 μ l, l'intervallo dei valori $|\Delta C_q|$ è rientrato tra un minimo di 3,26 e un massimo di 3,68 cicli. Per 5×10^5 PBMC con un volume di eluizione di 100 μ l, l'intervallo dei valori $|\Delta C_q|$ è rientrato tra un minimo di 2,95 e un massimo di 3,55 cicli. Per le cellule ottenute da campioni di urina di 50 ml e di liquido amniotico di 5 ml con un volume di eluizione di 50 μ l, l'intervallo dei valori $|\Delta C_q|$ è rientrato tra un minimo di 2,82 e un massimo di 3,44 cicli.

Set di campioni	Tipo di cellula	Quantità immessa	Volume di eluizione (μ l)
1	Cellule HEK293 da coltura tissutale	5×10^4 cellule	50
2	PBMC	5×10^5 cellule	100
3	Urina	50 ml	50
4	Liquido amniotico	5 ml	50

8.E. Inibizione (sostanze interferenti; continua)

Midollo osseo

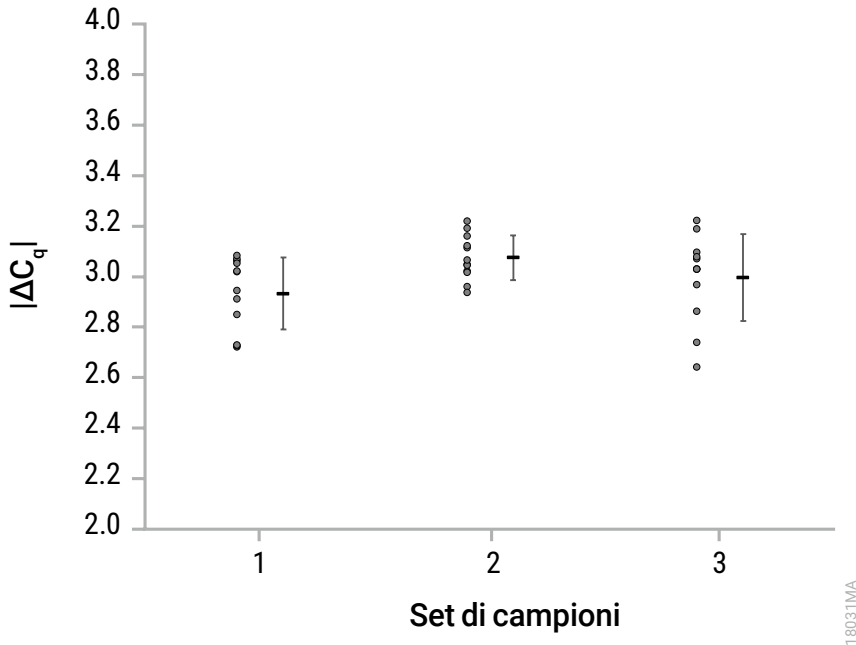


Figura 27. Test per l'inibizione nell'amplificazione del DNA del midollo osseo. Per gli aspirati di midollo osseo di 50 µl raccolti in provette con EDTA e citrato, l'intervallo dei valori $|\Delta C_q|$ è rientrato tra un minimo di 2,72 e un massimo di 3,22 cicli. Per gli aspirati di midollo di 50 µl raccolti in provette con eparina, l'intervallo dei valori $|\Delta C_q|$ è rientrato tra un minimo di 2,64 e un massimo di 3,22 cicli. Per tutti i campioni è stato utilizzato un volume di eluizione di 50 µl. Nel grafico, il set di campioni 1 fa riferimento agli aspirati di midollo osseo raccolti in provette con EDTA, il set di campioni 2 fa riferimento agli aspirati di midollo osseo raccolti in provette con citrato e il set di campioni 3 fa riferimento agli aspirati di midollo osseo raccolti in provette con eparina.

8.F. Contaminazione crociata

I campioni di buffy coat di maschi (300 µl) e femmine (50 µl) sono stati elaborati in posizioni dei vassoi alternate negli strumenti Maxwell® e i campioni di DNA femminili purificati risultanti sono stati amplificati utilizzando un target di DNA del cromosoma Y con un'analisi della qPCR. La presenza di questo target del cromosoma Y nei campioni femminili è stata utilizzata per identificare la potenziale contaminazione crociata dai campioni vicini. Quando i campioni di buffy coat femminili sono stati elaborati in posizioni del vassoio adiacenti ai campioni di buffy coat maschili, nessun campione di DNA femminile ha mostrato un valore C_q per il target di DNA del cromosoma Y.

9. Valutazione delle prestazioni cliniche

La valutazione delle prestazioni cliniche è stata eseguita con campioni umani con il Maxwell® CSC Genomic DNA Kit e il Maxwell® CSC 48 Instrument.

Sangue intero

Due tester di un laboratorio esterno hanno purificato il DNA proveniente da campioni di sangue umano intero di 200 µl con un volume di eluizione di 100 µl provenienti da 12 donatori con il sistema di purificazione Maxwell® CSC oltre che con un metodo di estrazione di riferimento del laboratorio. Gli eluiti risultanti sono stati analizzati mediante l'amplificazione del gene costitutivo HCP5 del controllo positivo nell'esame per HLA-B27. Tutti e 12 i campioni di DNA purificati con il Maxwell® CSC Genomic DNA Kit hanno mostrato concordanza tra i due tester e con il metodo di estrazione di riferimento del laboratorio.

Tampone orale

Un tester di un laboratorio esterno ha purificato il DNA proveniente da un campione di tampone orale umano pre-elaborato con una colonna di purificazione e un volume di eluizione di 100 µl proveniente da 12 donatori con il sistema di purificazione Maxwell® CSC oltre che con un metodo di estrazione di riferimento del laboratorio. Gli eluiti risultanti sono stati analizzati mediante l'amplificazione del gene costitutivo HCP5 del controllo positivo nell'esame per HLA-B27. Tutti e 12 i campioni di DNA purificati con il Maxwell® CSC Genomic DNA Kit hanno mostrato concordanza con il metodo di estrazione di riferimento del laboratorio.

Tessuto

Un tester di un laboratorio esterno ha purificato il DNA proveniente da campioni di tessuto umano di 10–25 mg con un volume di eluizione di 200 µl di 12 donatori con il sistema di purificazione Maxwell® CSC oltre che con un metodo di estrazione di riferimento del laboratorio. Gli eluiti risultanti sono stati analizzati mediante l'amplificazione del gene costitutivo HCP5 del controllo positivo nell'esame per HLA-B27. Tutti e 12 i campioni di DNA purificati con il Maxwell® CSC Genomic DNA Kit hanno mostrato concordanza con il metodo di estrazione di riferimento del laboratorio.

10. Risoluzione dei problemi

Per domande non specificamente trattate nel presente manuale, rivolgersi alla filiale o al distributore Promega locale. Le informazioni relative ai contatti sono disponibili all'indirizzo: **www.promega.com**.

e-mail: **techserv@promega.com**

Problema	Cause e commenti
Concentrazione di DNA inferiore alle attese	I campioni che sono stati sottoposti a più cicli di congelamento-scongelo possono contenere DNA degradato. Per ogni tipo di campione specifico sono elencate le linee guida di esempio.
	Il campione conteneva una ridotta quantità di DNA genomico. La resa del DNA genomico dipende dalla quantità di campione elaborato e dal contenuto di DNA di quel campione.
	La soluzione di proteinasi K non è stata aggiunta, è stata aggiunta in volume insufficiente o la proteinasi K non è stata miscelata efficacemente con il campione. Lisi e resa dipendono dall'estrazione completa con la proteinasi K.
	Il campione immesso non è stato mescolato prima dell'elaborazione. Accertarsi di miscelare i campioni prima dell'elaborazione.
	Il volume di eluizione utilizzato per l'estrazione è risultato eccessivo per il campione da trattare. Per aumentare la concentrazione di DNA eluito, ridurre il volume iniziale del tampone di eluizione.
	È stata elaborata una quantità eccessiva di campione o il campione elaborato conteneva troppo DNA genomico. Un'eccessiva quantità di campione o di DNA genomico possono causare problemi nella chimica di estrazione e di conseguenza una concentrazione di eluito non correlata alla quantità di campione elaborato.
	Il lisato non è stato mescolato con la soluzione di legame nella camera n.1 aspirando ed erogando per 5–10 volte dopo il trasferimento per creare una miscela omogenea. Se non si riesce a creare una miscela omogenea di campione di lisi e soluzione di legame nella camera n.1, la resa e la purezza dell'eluito finale possono ridursi.

Problema**Cause e commenti**

Concentrazione di DNA inferiore alle attese (continua)

I campioni non sono stati mescolati in modo appropriato o nelle fasi corrette durante l'elaborazione. Se reagenti e campioni non vengono mescolati in modo adeguato nella provetta di incubazione, le prestazioni possono essere compromesse.

Tampone di lisi e Lytic Enhancer (LE2) sono stati utilizzati in modo intercambiabile, in una fase non corretta o in volume errato. Elaborare nuovamente i campioni, utilizzando in modo corretto il tampone di lisi e il Lytic Enhancer (LE2), come indicato.

Purezza inferiore alle attese

La soluzione di proteinasi K non è stata aggiunta, è stata aggiunta in volume insufficiente o la proteinasi K non è stata miscelata efficacemente con il campione. Lisi e resa dipendono dall'estrazione completa con la proteinasi K.

Il lisato non è stato mescolato con la soluzione di legame nella camera n.1 aspirando ed erogando per 5–10 volte dopo il trasferimento per creare una miscela omogenea. Se non si riesce a creare una miscela omogenea di campione di lisi e soluzione di legame nella camera n.1, la resa e la purezza dell'eluato finale possono ridursi.

I campioni che sono stati sottoposti a più cicli di congelamento-scongelo possono contenere DNA degradato. Usare campioni prelevati e conservati secondo le linee guida elencate per ogni tipo di campione specifico.

Per i campioni di sangue intero, buffy coat e midollo osseo, il trasferimento di materiale coagulante o grasso nella provetta da incubazione può causare una lisi del campione insufficiente. Trasferire solo i campioni liquidi per la purificazione.

Tampone di lisi e Lytic Enhancer (LE2) sono stati utilizzati in modo intercambiabile, in una fase non corretta o in volume errato. Elaborare nuovamente i campioni, utilizzando in modo corretto il tampone di lisi e il Lytic Enhancer (LE2), come indicato.

Alcuni tessuti possono produrre valori di purezza inferiori alle attese. Se si desiderano valori di purezza più alti, ridurre la quantità immessa di tessuto elaborato.

10. Risoluzione dei problemi (continua)

Problema	Cause e commenti
Purezza inferiore alle attese (continua)	<p>I campioni non sono stati mescolati in modo appropriato o nelle fasi corrette durante l'elaborazione. Se reagenti e campioni non vengono mescolati in modo adeguato nella provetta di incubazione, le prestazioni possono essere compromesse.</p> <p>Il trasferimento di materiale solido nella camera n.1 della cartuccia può dar luogo alla purificazione simultanea di materiale solido e contaminanti. Rimuovere il materiale solido prima di trasferire il campione lisato nella cartuccia.</p>
Contaminazione con RNA	<p>La soluzione RNasi A non è stata aggiunta alla camera n.3 della cartuccia oppure è stato aggiunto un volume incompleto di Soluzione RNasi A. Elaborare nuovamente il campione con una Soluzione RNasi A o trattare il campione di gDNA estratto con RNasi A.</p>
Carryover della resina	<p>I campioni non sono stati miscelati in modo appropriato o durante fasi corrette nel corso dell'elaborazione. Se i reagenti e i campioni non vengono miscelati insieme in modo adeguato nella provetta da incubazione o nella camera n.1, il carryover della resina nella cartuccia e nella provetta di eluizione può risultare compromesso.</p> <p>È stata elaborata una quantità eccessiva di campione o il campione elaborato conteneva troppo DNA genomico. Un'eccessiva quantità di campione può causare un eccesso di carryover della resina nella cartuccia e nella provetta di eluizione.</p> <p>Un parziale carryover della resina è normale e non influisce sulla resa downstream. Se necessario, utilizzare un magnete di eluizione ([Cat.# AS4017, Cat.# AS4018 o entrambi]; disponibili separatamente) per trasferire l'eluato in una nuova provetta. Vedere la Sezione 11, Prodotti correlati.</p>

11. Prodotti correlati

Strumenti e accessori

Prodotto	Quantità	Cat.#
Maxwell® CSC 48 Instrument*	1 cadauno	AS8000
Maxwell® CSC Instrument*	1 cadauno	AS6000
Vassoio Maxwell® RSC/CSC	1 cadauno	SP6019
Vassoio frontale Maxwell® RSC/CSC 48	1 cadauno	AS8401
Vassoio posteriore Maxwell® RSC/CSC 48	1 cadauno	AS8402
Stantuffi RSC/CSC	50/confezione	AS1331
Provette di eluizione (0,5 ml)	50/confezione	AS6201
Magnete di eluizione, 16 posizioni	1 cadauno	AS4017
Magnete di eluizione, 24 posizioni	1 cadauno	AS4018
Colonne di purificazione	50 ciascuna	Z3871
Soluzione RNasi A	1 ml	A7973
	5 ml	A7974
Soluzione Proteinasi K (PK)	4 ml	MC5005
Nuclease-Free Water	25 ml	MC1191

*Per uso diagnostico in vitro. Questo prodotto è disponibile solo in alcuni Paesi.

Kit di reagenti Maxwell® CSC

Visitare www.promega.com per l'elenco dei kit di purificazione Maxwell® CSC disponibili.

^(a)Brevetti USA n. 7.329.488 e brevetto Sud Corea n. 100483684.

© 2022 Promega Corporation. Tutti i diritti riservati.

Maxwell è un marchio registrato di Promega Corporation.

I prodotti possono essere coperti da brevetti già rilasciati o in corso di rilascio o possono essere soggetti a determinate limitazioni. Per ulteriori informazioni visitare il nostro sito Web.

Specifiche e prezzi sono soggetti a modifica senza preavviso.

Le descrizioni dei prodotti sono soggette a modifica. Per informazioni aggiornate sui prodotti Promega rivolgersi al Promega Technical Services oppure consultare il catalogo Promega online.