



Clean Cell Free DNA Kit

Gebrauchsanweisung

V. 2 FEBRUAR 2024



REF CCF-D0384



CleanNA, Coenecoop 75, 2741 PH, Waddinxveen, Niederlande

Zur Verwendung in der In-vitro-Diagnostik vorgesehen.

Die Informationen in diesem Dokument können ohne vorherige Ankündigung geändert werden. Besuchen Sie regelmäßig www.cleanna.com/download-ccf, um nach Aktualisierungen in diesem Dokument zu suchen.

Haftungsausschluss

CleanNA lehnt jegliche ausdrückliche oder stillschweigende Gewährleistung in Bezug auf dieses Dokument ab, insbesondere die Gewährleistung der Marktgängigkeit oder Eignung für einen bestimmten Zweck. Im gesetzlich zulässigen Rahmen haftet CleanNA in keinem Fall, sei es vertraglich, aufgrund unerlaubter Handlung, Gewährleistung oder eines Gesetzes oder auf einer anderen Grundlage für besondere, zufällige, indirekte, strafbare, mehrfache oder Folgeschäden, die im Zusammenhang mit oder aus diesem Dokument entstehen, insbesondere nicht für dessen Verwendung, unabhängig davon, ob vorhersehbar oder nicht und ob CleanNA auf die Möglichkeit solcher Schäden hingewiesen wurde oder nicht.

Handelsmarken

Die hier genannten Handelsmarken sind Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.

Kontakt

Coenecoop 75 | 2741 PH Waddinxveen | Niederlande | Tel.: +31 (0) 182 22 33 50
Fax: +31 (0) 182 22 33 98 | info@cleanna.com | www.cleanna.com

Inhalt

| | |
|--|----|
| Bestimmungsgemäße Verwendung | 4 |
| Vorgesehene Anwender | 4 |
| Einführung und Funktionsweise | 4 |
| Schematische Übersicht..... | 5 |
| Zur Verfügung gestellte Materialien | 6 |
| Versand, Lagerung und Handhabung von Reagenzien..... | 6 |
| Warnhinweise | 7 |
| Vorsichtsmaßnahmen | 8 |
| Qualitätskontrolle | 10 |
| Einschränkungen | 10 |
| Sammlung und Lagerung von Proben | 11 |
| Vom Anwender bereitzustellende Materialien und Ausrüstung..... | 12 |
| Vorbereitung der Reagenzien | 13 |
| Clean Cell Free DNA Kit – Einzelröhrchen-Protokoll | 14 |
| Clean Cell Free DNA Kit – 48-Well-Plattenprotokoll..... | 17 |
| Anleitung zur Fehlerbehebung..... | 21 |
| Symbole | 23 |
| Bestellinformationen..... | 24 |
| Änderungsverlauf des Dokuments..... | 24 |
| Hinweise..... | 25 |

Bestimmungsgemäße Verwendung

Die bestimmungsgemäße Verwendung des Geräts besteht darin, zirkulierende zellfreie DNA (cfDNA) aus menschlichem Plasma in ausreichender Reinheit zu extrahieren, um in nachgeschalteten Nachweisverfahren verwendet zu werden, die auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basieren.

Vorgesehene Anwender

Die vorgesehenen Anwender sind professionelle Labormitarbeiter, die in molekularbiologischen Techniken geschult sind.

Einführung und Funktionsweise

Das Clean Cell Free DNA Kit ist für die Isolierung zellfreier DNA von menschlichem Plasma konzipiert. Das gesamte Verfahren ermöglicht sowohl eine manuelle als auch eine automatisierte Probenverarbeitung.

Durch die Kombination unseres proprietären Puffersystems mit dem Komfort unserer magnetischen CleanNA CCF-Partikel entfällt die Notwendigkeit von Vakuumstufen oder Trichtern während des gesamten Verfahrens. Daher bietet das Clean Cell Free DNA Kit einen einfachen 4-stufigen Prozess: Lyse, Binden, Waschen und Eluieren.

Unsere CleanNA Particles CCF bieten eine hohe Bindungskapazität und zielen in Kombination mit dem Puffersystem auf kleinere DNA-Fragmente (120–400 bp) ab. Diese Kombination minimiert das Risiko einer Kontamination der genomischen DNA. Die hohe Bindungskapazität der CleanNA Particles CCF verringert die Menge an Partikeln, die während der Bindungsschritte benötigt werden, und reduziert dadurch das Elutionsvolumen. Dadurch kann isolierte zellfreie DNA aus 1 ml Plasma in nur 30–60 µl eluiert werden.

Die isolierte zellfreie DNA ist für den Einsatz in der (q)PCR als nachgelagerte Anwendung bereit.

Schematische Übersicht

Der einzigartig formulierte Lysepuffer befreit die zirkulierende DNA von an die DNA gebundenen Proteinen und Vesikeln, während DNasen inaktiviert werden. Die DNA wird in einem Schritt aus dem Lysat isoliert, indem sie an die Oberfläche der magnetischen Partikel bindet. Die magnetischen Partikel von CleanNA werden dann mithilfe eines magnetischen Abscheidungsgeräts vom Lysat abgetrennt. Nach einigen schnellen Waschschrritten zur Entfernung von Spuren von Verunreinigungen wird die aufgereinigte DNA mithilfe eines Elution Buffer von den CleanNA-Partikeln eluiert.

Kügelchen hinzufügen

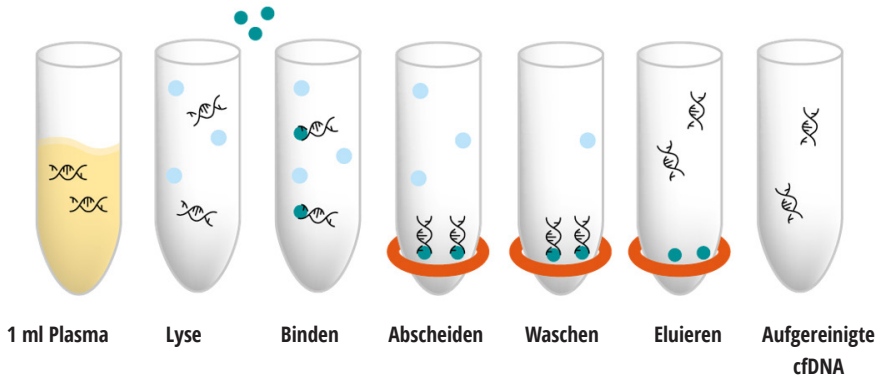


Abbildung 1: Schematische Übersicht über das Clean Cell Free DNA Kit-Verfahren.

Zur Verfügung gestellte Materialien

Inhalt des Kit:

| Bestandteil | Volumen CCF-D0384 |
|-----------------------|-------------------|
| CCF Lysis | 30 ml |
| CCF Binding | 430 ml |
| CCF Wash 1 | 2 x 225 ml |
| CCF Wash 2 | 2 x 45 ml |
| Elution Buffer | 100 ml |
| Proteinase K Solution | 6,5 ml |
| CleanNA Particles CCF | 4,3 ml |

Versand, Lagerung und Handhabung von Reagenzien

Der Versand des Clean Cell Free DNA Kit sollte bei Raumtemperatur (15–25 °C) erfolgen. Die Bestandteile des Clean Cell Free DNA Kit nicht einfrieren.

| Bestandteil | Lagerung |
|-----------------------|---|
| CCF Lysis* | Raumtemperatur (15–25 °C) |
| CCF Binding | Raumtemperatur (15–25 °C) |
| CCF Wash 1 | Raumtemperatur (15–25 °C) |
| CCF Wash 2 | Raumtemperatur (15–25 °C) |
| Elution Buffer | Raumtemperatur (15–25 °C) |
| Proteinase K Solution | Raumtemperatur (15–25 °C) (bei einer Lagerung von mehr als 12 Monaten bei 2–8 °C lagern) |
| CleanNA Particles CCF | 2–8 °C |

* Falls der Lysepuffer einen weißen Niederschlag in der Flasche aufweist, den Puffer auf 37 °C vorerwärmen, um den Niederschlag aufzulösen.

Stabilität im Gebrauch: Nach dem Öffnen des Clean Cell Free DNA Kit kann das Produkt 19 Tage lang sicher verwendet werden.

Das Clean Cell Free DNA Kit nicht nach dem auf dem Etikett der Außenverpackung angegebenen Verfallsdatum verwenden.

Warnhinweise

Vor Gebrauch des Kits die Anweisungen sorgfältig durchlesen.

Verschiedene Kit-Losnummern nicht miteinander mischen.

Sicherstellen, dass die Kit-Flaschen nicht beschädigt sind und keine Flüssigkeit aus den Flaschen austritt. Kein beschädigtes Kit verwenden.

Die Losnummer auf der Verpackung des CleanNA Particles CCF-Kartons unterscheidet sich von der Losnummer auf der CleanNA Particles CCF-Flasche. Die Losnummer auf dem Karton stimmt mit der Losnummer des gesamten Kits überein und die auf den Flaschen gilt speziell für die Partikel. Da CleanNA Particles CCF bei einer anderen Temperatur gelagert wird, vor dem Gebrauch sicherstellen, dass die Losnummer auf der Kartonverpackung der Partikel mit der Losnummer des Kits übereinstimmt.

Jeder schwerwiegende Vorfall, der im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten ist, ist dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats zu melden, in dem der Anwender und/oder der Patient ansässig ist.

Vorsichtsmaßnahmen

Alle Sicherheitsinformationen sind im Sicherheitsdatenblatt (SDB) enthalten. Beantragen Sie Ihr SDS über cleanna.com/sds-request.

CCF Binding



Flüssigkeit und Dampf entzündbar. Verursacht schwere Augenschäden. Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. Verursacht Hautreizungen. Schädlich für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung. Bei Kontakt mit Säuren werden sehr giftige Gase freigesetzt.



Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen und anderen Zündquellen fernhalten. Rauchen verboten. Behälter dicht geschlossen halten. Schutzhandschuhe, Schutzkleidung, Augenschutz und Gesichtsschutz tragen. Behälter und Empfangsgeräte erden und verkleben. Explosionsgeschützte Elektro-/Lüftungs-/Beleuchtungsgeräte/eigensichere Geräte verwenden. Funkenfreies Werkzeug verwenden. Maßnahmen ergreifen, um statische Entladungen zu verhindern. Alle exponierten äußeren Körperbereiche nach der Handhabung gründlich waschen. Nicht Essen, Trinken oder Rauchen, wenn dieses Produkt verwendet wird. Freisetzung in die Umwelt vermeiden.



BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang vorsichtig mit Wasser spülen. Kontaktlinsen entfernen, sofern vorhanden und einfach möglich. Weiterspülen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/Ersthelfer anrufen.

Im Brandfall: Zum Löschen alkoholbeständigen Schaum oder normalen Proteinschaum verwenden.

BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/Arzt/Ersthelfer anrufen.

BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.

BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen. Haut mit Wasser abspülen [oder duschen]. Mund spülen.

Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat/ärztliche Hilfe einholen.

Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

CCF Lysis



Schädlich für Wasserlebewesen. Verursacht schwere Augenschäden. Verursacht Hautreizungen.

Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang vorsichtig mit Wasser spülen. Kontaktlinsen entfernen, sofern vorhanden und einfach möglich. Weiterspülen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.

Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat/ärztliche Hilfe einholen.

CCF Wash 1



Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. Verursacht schwere Hautverbrennungen und Augenschäden. Schädlich für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung. Bei Kontakt mit Säuren werden sehr giftige Gase freigesetzt.



Nebel/Dämpfe/Aerosol nicht einatmen. Alle exponierten äußeren Körperbereiche nach der Handhabung gründlich waschen. Schutzhandschuhe, Schutzkleidung, Augenschutz und Gesichtsschutz tragen. Nicht Essen, Trinken oder Rauchen, wenn dieses Produkt verwendet wird. Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

BEI VERSCHLUCKEN: Mund spülen. KEIN Erbrechen herbeiführen.

BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen. Haut mit Wasser abspülen [oder duschen].

BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang vorsichtig mit Wasser spülen. Kontaktlinsen entfernen, sofern vorhanden und einfach möglich. Weiterspülen.

Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/Ersthelfer anrufen.

Kontaminierte Kleidung vor Wiederverwendung waschen.

BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/Arzt/Ersthelfer anrufen.

BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für eine ungehinderte Atmung sorgen.

Proteinase K Solution



Kann bei Einatmen Allergie- oder Asthmasymptome oder Atembeschwerden verursachen.

Nebel/Dämpfe/Aerosol vermeiden. Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen.

BEI EINATMEN: Betroffenen an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.

Bei Atemwegsbeschwerden: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

Hinweis: Für eine sichere Entsorgung bitte die örtlichen Abfallvorschriften beachten.

Qualitätskontrolle

CleanNA produziert jede Charge des Clean Cell Free DNA Kit nach vorgegebenen und validierten Protokollen im Qualitätsmanagementsystem (QMS). Zusätzlich wird nach der Produktion jeder Charge eine Qualitätskontrolle durchgeführt, um eine gleichbleibende Produktqualität sicherzustellen. Das QMS von CleanNA ist nach EN-ISO 13485 zertifiziert.

Einschränkungen

Die Leistung des Clean Cell Free DNA Kit wurde mit menschlichem Plasma nachgewiesen, das in den folgenden Antikoagulanzen konserviert wurde:

- EDTA
- Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD)
- Natriumcitrat

In die Leistungsbewertung wurden eine Reihe einzelner Plasmaspender einbezogen. Die Leistung des Clean Cell Free DNA Kit wurde nicht mit hämolysiertem Plasma getestet.

Es liegt in der Verantwortung des Benutzers, die Leistung des Probenmaterials zu validieren, das nicht in der Leistungsbewertung verwendet wird.

Wir empfehlen die Verwendung einer internen Extraktionskontrolle pro Probe, um ein falsch negatives Ergebnis in nachgeschalteten Nachweismethoden zu identifizieren, das durch potenziell unbekannte Hemmstoffe in einzelnen Patientenplasmaproben verursacht wird.


Die Leistung des Kits wurde mit nachgeschalteten Nachweismethoden basierend auf der Polymerase-Kettenreaktion nachgewiesen. Es liegt in der Verantwortung des Benutzers, die Leistung des Diagnosegeräts bei Verwendung mit anderen nachgeschalteten Erkennungsmethoden zu validieren.

Diagnoseergebnisse, die nach der Verwendung des Clean Cell Free DNA Kit generiert wurden, müssen in Verbindung mit anderen klinischen oder Laborbefunden interpretiert werden.

Sammlung und Lagerung von Proben

Plasma

Das Nukleinsäure-Isolierungsverfahren sollte unmittelbar nach der Blutspende und Plasmatrennung beginnen*. Falls dies nicht möglich ist, kann das Plasma zur Kurzzeitlagerung bis zu 24 Stunden bei 2–8 °C gelagert werden, bei längerer Lagerung kann das Plasma bis zu 4 Wochen bei –20 °C oder –80 °C gelagert werden °C. Die Plasmaproben bei Raumtemperatur auftauen, bevor das Plasma für die zellfreie DNA-Extraktion verwendet wird.

 **Hinweis:** Proben menschlichen Ursprungs sind potenziell infektiös. Beim Umgang damit geeignete Maßnahmen ergreifen.

* Für die Plasmapräparation vor der Isolierung zellfreier Nukleinsäuren aus Blutproben empfehlen wir folgende Vorgehensweise:

1. Die Vollblutröhrchen zentrifugieren, indem die Röhrchen 10 Minuten lang bei 3.000 U/min (1.900 x g) und 4 °C zentrifugiert werden.
2. Den Plasmaüberstand vorsichtig absaugen, ohne die Blutzellen zu stören.
3. Den Plasmaüberstand in ein frisches Zentrifugenröhrchen übertragen.
4. Um sicherzustellen, dass das Plasma frei von kernhaltigen Blutzellen ist, die Schritte 1 bis 3 für eine zweite Trennung wiederholen.
5. Das Plasma kann in dieser Phase zur Nukleinsäureextraktion verwendet werden.

Die folgenden Schritte 6–9 durchführen, um auch intaktes Chromatin aus aufgebrochenen Blutzellen aus dem Plasma zu entfernen. Beachten, dass dadurch auch eine geringe Menge an cfDNA entfernt werden kann, die in größeren extrazellulären Vehikeln vorhanden ist. Andernfalls mit Schritt 10 fortfahren.

6. Die Plasmaproben bei 16.000 x g und 4 °C mit einem Festwinkelrotor zentrifugieren.
7. Den Plasmaüberstand vorsichtig entfernen und darauf achten, das Pellet nicht zu stören.
8. Das Plasma in ein frisches Röhrchen übertragen.
9. Das Plasma kann nun zur Nukleinsäureextraktion verwendet werden.
10. Das Plasma gemäß den obigen Anweisungen lagern.

Vom Anwender bereitzustellende Materialien und Ausrüstung

Zur Isolierung in einzelnen Röhrcchen

Vom Anwender bereitzustellende Materialien und Reagenzien für das Röhrcchenprotokoll für bis zu 1 ml Probeneingabe:

- Frisches, reines Ethanol
- Magnetisches Abscheidungsgerät für 1,5/2,0-ml-Röhrcchen
- Vortexer
- Schüttler oder Wippe
- Auf 60 °C einstellbarer Inkubator
- 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrcchen
- 15-ml-Zentrifugenröhrcchen

Zur Isolierung im 48-Well-Plattenformat

Vom Anwender bereitzustellende Materialien und Reagenzien für das Plattenprotokoll für bis zu 1 ml Probeneingabe:

- Frisches, reines Ethanol
- 48-Well-Magnetplatte, z. B. Alpaqua CatNo# A000530
- Vortexer
- Schüttler oder Wippe
- Auf 60 °C einstellbarer Inkubator
- 48-Deep-Well-Platte(n), 3,5 ml; z. B. Wuxi NEST Biotechnology CatNo# 504102
- 96-Deep-Well-Platte(n) oder 96-Well-PCR-Platte(n)

Vorbereitung der Reagenzien

CCF Wash 2

CCF Wash 2 mit frischem absolutem Ethanol wie folgt verdünnen und bei Raumtemperatur lagern.

| Kit | Reines Ethanol muss hinzugefügt werden |
|-----------|--|
| CCF-D0384 | 180 ml |

Clean Cell Free DNA Kit – Einzelröhrchen-Protokoll

Vor Beginn:

- Inkubator auf 60 °C einstellen.
- Sicherstellen, dass CCF Lysis vollständig aufgelöst ist. Falls nicht, auf 37 °C vorerwärmen.
- CleanNA Particles CCF schütteln oder vortexen, um die Partikel vor der Verwendung vollständig zu resuspendieren.
- CCF Wash 2 gemäß den Anweisungen im Abschnitt „Vorbereitung der Reagenzien“ auf Seite 13 vorbereiten.

Protokoll:

1. Bis zu 1 ml Plasmaprobe in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen (nicht im Lieferumfang enthalten) geben.

⚠ Hinweis: Nicht das maximale Probenvolumen überschreiten, da dies die Effizienz des Extraktionsverfahrens beeinträchtigt.

2. Wenn das Probenvolumen weniger als 1 ml beträgt, das Probenvolumen mit Elutionspuffer (im Lieferumfang dieses Kits enthalten) auf 1 ml erhöhen.
3. 15 µl Proteinase K Solution hinzufügen.
4. 67 µl CCF Lysis hinzufügen.
5. Zum gründlichen Mischen mit maximaler Drehzahl vortexen oder auf- und abpipettieren.
6. 20 Minuten bei 60 °C inkubieren. Alle 10 Minuten durch Umdrehen oder Schütteln mischen.
7. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

⚠ Hinweis: Dieser Inkubationsschritt ist entscheidend, damit die Probentemperatur sinkt und die effizienteste DNA-Bindung an CleanNA Particles CCF erreicht wird.

8. 1 ml CCF Binding hinzufügen. Zum gründlichen Mischen für 30 Sekunden mit maximaler Drehzahl vortexen oder auf- und abpipettieren.
9. 10 µl CleanNA Particles CCF hinzufügen. Die Probe 10 Mal umdrehen oder zum Mischen auf- und abpipettieren.

⚠ Hinweis: CleanNA Particles CCF schütteln oder vortexen, um die Partikel vor der Verwendung vollständig zu resuspendieren.

10. 10 Minuten lang bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Mischen inkubieren. Die Probe muss während der 10-minütigen Inkubationszeit durch Schütteln oder Wippen gemischt werden.

⚠ Hinweis: Nicht bei hohen Geschwindigkeiten vortexen, da dies zu Schaumbildung und damit zu einer geringeren Ausbeute führt. Die Mischdrehzahl sollte so eingestellt werden, dass CleanNA Particles CCF kontinuierlich in Lösung bleibt.

11. 1 ml der Mischung in ein 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (nicht im Lieferumfang enthalten) übertragen.
12. Das Röhrchen auf ein magnetisches Abscheidungsgerät stellen, um CleanNA Particles CCF zu magnetisieren.
13. Bei Raumtemperatur inkubieren, bis CleanNA Particles CCF vollständig aus der Lösung entfernt ist.

⚠ Hinweis: Unbedingt so lange inkubieren, bis alle Partikel aus der Lösung entfernt sind. Der Verlust von Kügelchen kann zu einer geringeren Ausbeute führen.

14. Den geklärten Überstand absaugen und entsorgen.

⚠ Hinweis: CleanNA Particles CCF nicht stören oder mit einer Pipette auf nehmen. Dies kann zu einer geringeren Ausbeute führen.

15. Die verbleibende Mischung aus Schritt 11 in das 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen übertragen, das in den vorherigen Schritten verwendet wurde.
16. Das Röhrchen auf ein magnetisches Abscheidungsgerät stellen, um CleanNA Particles CCF zu magnetisieren.
17. Bei Raumtemperatur inkubieren, bis CleanNA Particles CCF vollständig aus der Lösung entfernt ist.

⚠ Hinweis: Unbedingt so lange inkubieren, bis alle Partikel aus der Lösung entfernt sind. Der Verlust von Kügelchen kann zu einer geringeren Ausbeute führen.

18. Den geklärten Überstand absaugen und entsorgen.

⚠ Hinweis: CleanNA Particles CCF nicht stören oder mit einer Pipette auf nehmen. Dies kann zu einer geringeren Ausbeute führen.

19. Das Röhrchen mit CleanNA Particles CCF aus dem magnetischen Abscheidungsgerät entfernen.
20. 500 µl CCF Wash 1 hinzufügen.
21. CleanNA Particles CCF durch 2-minütiges Vortexen oder 20-maliges Auf- und Abpipettieren resuspendieren.

⚠ Hinweis: Um eine gute Reinheit zu erreichen, ist die vollständige Resuspension von CleanNA Particles CCF von entscheidender Bedeutung.

22. Das Röhrchen auf das magnetische Abscheidungsgerät stellen, um CleanNA Particles CCF zu magnetisieren.
23. Bei Raumtemperatur inkubieren, bis CleanNA Particles CCF vollständig aus der Lösung entfernt ist.

⚠ Hinweis: Unbedingt so lange inkubieren, bis alle Partikel aus der Lösung entfernt sind. Der Verlust von Kügelchen kann zu einer geringeren Ausbeute führen.

24. Den geklärten Überstand absaugen und entsorgen.

⚠ Hinweis: CleanNA Particles CCF nicht stören oder mit einer Pipette auf nehmen. Dies kann zu einer geringeren Ausbeute führen.

25. Die Schritte 19–24 einen zweiten „CCF Wash 1“-Waschschritt wiederholen.
26. Das Röhrchen mit CleanNA Particles CCF aus dem magnetischen Abscheidungsgerät entfernen.
27. 500 µl CCF Wash 2 hinzufügen.

⚠ Hinweis: CCF Wash 2 muss vor der Verwendung mit reinem Ethanol verdünnt werden. Siehe die Anweisungen auf Seite 13.

28. CleanNA Particles CCF durch 2-minütiges Vortexen oder 20-maliges Auf- und Abpipettieren resuspendieren.
29. Das Röhrchen auf das magnetische Abscheidungsgerät stellen, um CleanNA Particles CCF zu magnetisieren.
30. Bei Raumtemperatur inkubieren, bis CleanNA Particles CCF vollständig aus der Lösung entfernt ist.

⚠ Hinweis: Unbedingt so lange inkubieren, bis alle Partikel aus der Lösung entfernt sind. Der Verlust von Kügelchen kann zu einer geringeren Ausbeute führen.

31. Den geklärten Überstand absaugen und entsorgen.

⚠ Hinweis: CleanNA Particles CCF nicht stören oder mit einer Pipette auf nehmen. Dies kann zu einer geringeren Ausbeute führen.

32. Die Schritte 26–31 einen zweiten „CCF Wash 2“-Waschschritt wiederholen.
33. Das Röhrchen etwa 30 Sekunden lang aus dem magnetischen Abscheidungsgerät nehmen.
34. Das Röhrchen auf das magnetische Abscheidungsgerät stellen, um CleanNA Particles CCF zu magnetisieren.

⚠ Hinweis: Unbedingt so lange inkubieren, bis alle Partikel aus der Lösung entfernt sind. Der Verlust von Kügelchen kann zu einer geringeren Ausbeute führen.

35. Das restliche CCF Wash 2 absaugen und entsorgen.

⚠ Hinweis: CleanNA Particles CCF nicht stören oder mit einer Pipette auf nehmen. Dies kann zu einer geringeren Ausbeute führen.

36. Das offene Röhrchen 25 Minuten lang auf dem magnetischen Abscheidungsgerät lassen, um CleanNA Particles CCF zu trocknen.
37. Das Röhrchen mit CleanNA Particles CCF aus dem magnetischen Abscheidungsgerät entfernen.
38. 30–60 µl Elution Buffer hinzufügen. CleanNA Particles CCF durch Vortexen oder 20-maliges Auf- und Abpipettieren resuspendieren.

⚠ Hinweis: Sicherstellen, dass der Elution Buffer die CleanNA Particles CCF bedeckt. Zu geringe Elutionsvolumina können zu einer geringeren Ausbeute führen. Zu hohe Volumina führen zu einer geringeren DNA-Konzentration im Eluat.

39. Unter ständigem Vortexen 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
40. Das Röhrchen auf das magnetische Abscheidungsgerät stellen, um CleanNA Particles CCF zu magnetisieren.
41. Bei Raumtemperatur inkubieren, bis CleanNA Particles CCF vollständig aus der Lösung entfernt ist.

⚠ Hinweis: Unbedingt so lange inkubieren, bis alle Partikel aus der Lösung entfernt sind. Die Verschleppung von Kügelchen kann zu einer Hemmung während der nachfolgenden PCR führen.

42. Den geklärten Überstand, der die gereinigte DNA enthält, in ein sauberes 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (nicht im Lieferumfang enthalten) übertragen.
43. Die extrahierten zellfreien Nukleinsäuren bei -20 °C lagern.

Clean Cell Free DNA Kit – 48-Well-Plattenprotokoll

Vor Beginn:

- Inkubator auf 60 °C einstellen.
- Sicherstellen, dass CCF Lysis vollständig aufgelöst ist. Falls nicht, auf 37 °C vorerwärmen.
- CleanNA Particles CCF schütteln oder vortexen, um die Partikel vor der Verwendung vollständig zu resuspendieren.
- CCF Wash 2 gemäß den Anweisungen im Abschnitt „Vorbereitung der Reagenzien“ auf Seite 13 vorbereiten.

Protokoll:

1. Bis zu 1 ml Plasma-/Serumproben in eine 48-Well-Platte (nicht im Lieferumfang enthalten) geben.

⚠ Hinweis: Nicht das maximale Probenvolumen überschreiten, da dies die Effizienz des Extraktionsverfahrens beeinträchtigt.

2. Wenn das Probenvolumen weniger als 1 ml beträgt, das Probenvolumen mit Elutionspuffer (im Lieferumfang dieses Kits enthalten) auf 1 ml erhöhen.
3. 15 µl Proteinase K Solution hinzufügen.
4. 67 µl CCF Lysis hinzufügen und die Platte verschließen.
5. Zum gründlichen Mischen mit maximaler Drehzahl vortexen oder auf- und abpipettieren.
6. 20 Minuten bei 60 °C inkubieren. Alle 10 Minuten durch Umdrehen oder Schütteln mischen.
7. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

⚠ Hinweis: Dieser Inkubationsschritt ist entscheidend, damit die Probentemperatur sinkt und die effizienteste DNA-Bindung an CleanNA Particles CCF erreicht wird.

8. 1 ml CCF Binding hinzufügen. Zum gründlichen Mischen für 30 Sekunden mit maximaler Drehzahl vortexen oder auf- und abpipettieren.
9. 10 µl CleanNA Particles CCF hinzufügen. Die Proben 10 Mal umdrehen oder zum Mischen auf- und abpipettieren.

⚠ Hinweis: CleanNA Particles CCF schütteln oder vortexen, um die Partikel vor der Verwendung vollständig zu resuspendieren.

10. 10 Minuten lang bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Mischen inkubieren. Die Proben müssen während der 10-minütigen Inkubationszeit durch Schütteln oder Wippen gemischt werden.

⚠ Hinweis: Nicht bei hohen Geschwindigkeiten vortexen, da dies zu Schaumbildung und damit zu einer geringeren Ausbeute führt. Die Mischdrehzahl sollte so eingestellt werden, dass CleanNA Particles CCF kontinuierlich in Lösung bleibt.

11. Die 48-Well-Platte auf der 48-Well-Magnetplatte platzieren, um CleanNA Particles CCF zu magnetisieren. Die Partikel aus jedem Well werden von den Magneten am Boden gesammelt.
12. Bei Raumtemperatur inkubieren, bis CleanNA Particles CCF vollständig aus der Lösung entfernt ist.

⚠ Hinweis: Unbedingt so lange inkubieren, bis alle Partikel aus der Lösung entfernt sind. Der Verlust von Kügelchen kann zu einer geringeren Ausbeute führen.

13. Den geklärten Überstand absaugen und entsorgen.

⚠ Hinweis: CleanNA Particles CCF nicht stören oder mit einer Pipette auf nehmen. Dies kann zu einer geringeren Ausbeute führen.

14. Die 48-Well-Platte mit CleanNA Particles CCF aus dem magnetischen Abscheidungsgerät entfernen.
15. 500 µl CCF Wash 1 hinzufügen.
16. CleanNA Particles CCF durch 2-minütiges Vortexen oder 20-maliges Auf- und Abpipettieren resuspendieren.

⚠ Hinweis: Um eine gute Reinheit zu erreichen, ist die vollständige Resuspension von CleanNA Particles CCF von entscheidender Bedeutung.

17. Resuspendiertes CleanNA Particles CCF auf eine neue 48-Deep-Well-Platte (nicht im Lieferumfang enthalten) übertragen.

⚠ Hinweis: Für den verbleibenden Vorgang weiterhin im 48-Well-Format bleiben.

18. Die 48-Well-Platte auf der 48-Well-Magnetplatte platzieren, um CleanNA Particles CCF zu magnetisieren.
19. Bei Raumtemperatur inkubieren, bis CleanNA Particles CCF vollständig aus der Lösung entfernt ist.

⚠ Hinweis: Unbedingt so lange inkubieren, bis alle Partikel aus der Lösung entfernt sind. Der Verlust von Kügelchen kann zu einer geringeren Ausbeute führen.

20. Den geklärten Überstand absaugen und entsorgen.

⚠ Hinweis: CleanNA Particles CCF nicht stören oder mit einer Pipette auf nehmen. Dies kann zu einer geringeren Ausbeute führen.

21. Die 48-Well-Platte mit CleanNA Particles CCF aus dem magnetischen Abscheidungsgerät entfernen.
22. 500 µl CCF Wash 1 hinzufügen.
23. CleanNA Particles CCF durch 2-minütiges Vortexen oder 20-maliges Auf- und Abpipettieren resuspendieren.

⚠ Hinweis: Um eine gute Reinheit zu erreichen, ist die vollständige Resuspension von CleanNA Particles CCF von entscheidender Bedeutung.

24. Die 48-Well-Platte auf der 48-Well-Magnetplatte platzieren, um CleanNA Particles CCF zu magnetisieren.
25. Bei Raumtemperatur inkubieren, bis CleanNA Particles CCF vollständig aus der Lösung entfernt ist.

⚠ Hinweis: Unbedingt so lange inkubieren, bis alle Partikel aus der Lösung entfernt sind. Der Verlust von Kügelchen kann zu einer geringeren Ausbeute führen.

26. Den geklärten Überstand absaugen und entsorgen.

⚠ Hinweis: CleanNA Particles CCF nicht stören oder mit einer Pipette auf nehmen. Dies kann zu einer geringeren Ausbeute führen.

27. Die 48-Well-Platte mit CleanNA Particles CCF aus dem magnetischen Abscheidungsgerät entfernen.

28. 500 µl CCF Wash 2 hinzufügen.

⚠ Hinweis: CCF Wash 2 muss vor der Verwendung mit reinem Ethanol verdünnt werden. Siehe die Anweisungen auf Seite 13.

29. CleanNA Particles CCF durch 2-minütiges Vortexen oder 20-maliges Auf- und Abpipettieren resuspendieren.

30. Die 48-Well-Platte auf der 48-Well-Magnetplatte platzieren, um CleanNA Particles CCF zu magnetisieren.

31. Bei Raumtemperatur inkubieren, bis CleanNA Particles CCF vollständig aus der Lösung entfernt ist.

⚠ Hinweis: Unbedingt so lange inkubieren, bis alle Partikel aus der Lösung entfernt sind. Der Verlust von Kügelchen kann zu einer geringeren Ausbeute führen.

32. Den geklärten Überstand absaugen und entsorgen.

⚠ Hinweis: CleanNA Particles CCF nicht stören oder mit einer Pipette auf nehmen. Dies kann zu einer geringeren Ausbeute führen.

33. Die Schritte 28–32 einen zweiten „CCF Wash 2“-Waschschritt wiederholen.

34. Die 48-Well-Platte mit CleanNA Particles CCF aus dem magnetischen Abscheidungsgerät entfernen.

35. Die 48-Well-Platte auf der 48-Well-Magnetplatte platzieren, um CleanNA Particles CCF zu magnetisieren.

⚠ Hinweis: Unbedingt so lange inkubieren, bis alle Partikel aus der Lösung entfernt sind. Der Verlust von Kügelchen kann zu einer geringeren Ausbeute führen.

36. Das restliche CCF Wash 2 absaugen und entsorgen.

⚠ Hinweis: CleanNA Particles CCF nicht stören oder mit einer Pipette auf nehmen. Dies kann zu einer geringeren Ausbeute führen.

37. Das Röhrchen 25 Minuten lang auf dem magnetischen Abscheidungsgerät lassen, um CleanNA Particles CCF zu trocknen.

38. Die 48-Well-Platte mit CleanNA Particles CCF aus dem magnetischen Abscheidungsgerät entfernen.


39. 30–60 µl Elution Buffer hinzufügen. CleanNA Particles CCF durch Vortexen oder 20-maliges Auf- und Abpipettieren resuspendieren.

⚠ Hinweis: Sicherstellen, dass der Elution Buffer die CleanNA Particles CCF bedeckt. Zu geringe Elutionsvolumina können zu einer geringeren Ausbeute führen. Zu hohe Volumina führen zu einer geringeren DNA-Konzentration im Eluat.

40. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren und dabei ständig durch Pipettieren, Schütteln oder Vortexen mischen.

41. Die 48-Well-Platte auf der 48-Well-Magnetplatte platzieren, um CleanNA Particles CCF zu magnetisieren.

42. Bei Raumtemperatur inkubieren, bis CleanNA Particles CCF vollständig aus der Lösung entfernt ist.

 **Hinweis:** Unbedingt so lange inkubieren, bis alle Partikel aus der Lösung entfernt sind. Die Verschleppung von Kügelchen kann zu einer Hemmung während der nachfolgenden PCR führen.

43. Den geklärten Überstand, der die gereinigte DNA enthält, in eine saubere 96-Well-Platte oder in saubere Einzelröhrchen (nicht im Lieferumfang enthalten) übertragen.

44. Die extrahierten zellfreien Nukleinsäuren bei -20 °C lagern.

Anleitung zur Fehlerbehebung





Diese Anleitung verwenden, um eventuell auftretende Probleme zu beheben. Für weitere Unterstützung wenden Sie sich bitte an Ihren örtlichen Händler.

Mögliche Probleme und Lösungsvorschläge

| Problem | Ursache | Lösungsvorschlag |
|---|--|--|
| Geringe DNA-Ausbeute | Unvollständige Resuspension von CleanNA Particles CCF. | CleanNA Particles CCF vor der Verwendung durch kräftiges Vortexen resuspendieren. |
| | Ineffiziente Bindung der DNA an CleanNA Particles CCF. | Die Probe vor der Zugabe von CCF Binding 10 Minuten lang bei Raumtemperatur abkühlen lassen. |
| | | Sicherstellen, dass jede Probe während der Bindung/sinkubation kontinuierlich gemischt wird. |
| | Verlust von CleanNA Particles CCF während des Vorgangs. | Eine Störung von CleanNA Particles CCF während des Absaugens vermeiden. |
| | DNA bleibt an CleanNA Particles CCF gebunden. | CCF Wash 2 vor der Verwendung durch Zugabe einer entsprechenden Menge reinem Ethanol verdünnen (siehe Anweisungen auf Seite 13). |
| | | Sicherstellen, dass der Elution Buffer alle CleanNA Particles CCF bedeckt. |
| Ethanolverschleppung. | CleanNA Particles CCF vor der Elution 25 Minuten lang bei Raumtemperatur trocknen. | |
| CleanNA Particles CCF klärt sich nicht vollständig aus der Lösung | Zu kurze Magnetisierungszeit. | Sammelzeit am magnetischen Abscheidungsgerät verlängern. |
| Co-Reinigung mit hohem Molekulargewicht | Es müssen zwei CCF Wash 1-Schritte durchgeführt werden. | Zwei CCF Wash 1-Schritte gemäß den Anweisungen in der Gebrauchsanweisung durchführen. Bei Bedarf das Volumen des Waschpuffers erhöhen. |
| Probleme in nachgelagerten Anwendungen | Salzverschleppung. | CCF Wash 2 muss Raumtemperatur haben. |

| | | |
|--------------------------------------|---|---|
| Abnormale Daten des Bioanalysegeräts | Das Bioanalysegerät zeigt während der Analyse mehrere scharfe Peaks an. | Sicherstellen, nach jedem Waschschrift alle Spuren des geklärten Überstands entfernt wurden. Sicherstellen, dass das Röhrchen/die Platte 25 Minuten lang inkubiert wird, um CleanNA Particles CCF zu trocknen. |
| | Das Bioanalysegerät zeigt gegen Ende eine ansteigende Baseline an. | Den Bioanalysegerät-Chip auf Luftblasen prüfen. Proben auf einen neuen, frisch vorbereiteten Chip laden. |
| | Das Bioanalysegerät zeigt zu Beginn der Kurve einen hohen Blob-Wert an. | Sicherstellen, dass die gereinigte Probe keine Spuren von CleanNA Particles CCF enthält. |

Symbole

| | |
|---|--|
|  | In-vitro-Diagnostik |
|  | CE-Kennzeichen. Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen für CE-IVD-Geräte gemäß der EU-Verordnung für In-vitro-Diagnostika (2017/746) |
|  | Bestellnummer |
|  | Hersteller |
|  | Vorsicht |
|  | Temperaturgrenze |
|  | Verfallsdatum |
|  | Losnummer |

Bestellinformationen

Wenden Sie sich zur Bestellung an Ihren örtlichen Händler.

| Produkt | Teilenummer |
|--|-------------|
| Clean Cell Free DNA Kit (384 Präparate) | CCF-D0384 |

Änderungsverlauf des Dokuments

| Version des Handbuchs | Datum der Änderung | Geändertes Kapitel | Erläuterung der Änderung |
|-----------------------|--------------------|--|---|
| 1 | 2023/OKT/02 | k. A. | Erstversion |
| 2 | 2024/FEB/08 | Erste Seite und schematische Übersicht | Aktualisierung des Links zur Website und schematischen Übersicht. |

Hinweise

Hinweise

Hinweise

Kontakt

Coenecoop 75 | 2741 PH Waddinxveen | Niederlande

Tel.: +31 (0) 182 22 33 50 | Fax: +31 (0) 182 22 33 98 | info@cleanna.com

www.cleanna.com

