



Clean Cell Free DNA Kit

Istruzioni per l'uso

V. 2 FEBBRAIO 2024



REF CCF-D0384



CleanNA, Coenecoop 75, 2741 PH, Waddinxveen, Paesi Bassi

Destinato all'uso diagnostico in vitro.

Le informazioni contenute nel presente documento sono soggette a modifiche senza preavviso. Consultare regolarmente il sito www.cleanna.com/download-ccf per verificare la presenza di aggiornamenti del documento.

Esclusione di responsabilità

CleanNA declina tutte le garanzie relative al presente documento, espresse o implicite, incluse, ma non limitate a, quelle di commerciabilità o idoneità per scopi particolari. Nella misura massima consentita dalla legge, in nessun caso CleanNA sarà responsabile, per contratto, atto illecito, garanzia o in base a qualsivoglia statuto o su qualsiasi altra base, per danni speciali, incidentali, indiretti, punitivi, multipli o conseguenti in relazione a o derivanti dal presente documento, incluso, ma non limitato all'uso dello stesso, che siano o meno prevedibili e che CleanNA sia stata avvisata o meno della possibilità di tali danni.

Marchi registrati

I marchi registrati citati nel presente documento sono di proprietà dei rispettivi titolari.

Informazioni di contatto

Coenecoop 75 | 2741 PH Waddinxveen | Paesi Bassi | T: +31 (0) 182 22 33 50
F: +31 (0) 182 22 33 98 | info@cleanna.com | www.cleanna.com

Indice

Scopo previsto.....	4
Utilizzatori previsti.....	4
Introduzione e principio.....	4
Panoramica schematica.....	5
Materiali in dotazione.....	6
Spedizione, conservazione e manipolazione dei reagenti.....	6
Avvertenze	7
Precauzioni	8
Controllo qualità	10
Limitazioni	10
Raccolta e conservazione dei campioni	11
Materiali e apparecchiature a cura dell'utilizzatore	12
Preparazione dei reagenti	13
Kit Clean Cell Free DNA - Protocollo a provetta singola.....	14
Clean Cell Free DNA Kit - Protocollo con piastra a 48 pozzetti.....	17
Guida alla risoluzione dei problemi.....	21
Simboli	23
Informazioni per l'ordine	24
Cronologia delle revisioni del documento.....	24
Note.....	25

Scopo previsto

Il dispositivo è destinato all'estrazione di DNA libero circolante (cfDNA) dal plasma umano in una purezza sufficiente per essere utilizzato nelle procedure di rilevamento a valle basate sul principio della reazione a catena della polimerasi (PCR).

Utilizzatori previsti

Il dispositivo è destinato all'uso da parte di operatori di laboratorio professionisti esperti nelle tecniche di biologia molecolare.

Introduzione e principio

Il kit Clean Cell Free DNA è progettato per l'isolamento del DNA liberato dalle cellule nel plasma umano. L'intera procedura consente di analizzare i campioni sia manualmente che automaticamente.

Grazie alla combinazione del nostro sistema tampone proprietario con la comodità delle particelle magnetiche CleanNA CCF, si elimina la necessità di passaggi sottovuoto o imbuti per tutta la procedura. Di conseguenza, Clean Cell Free DNA Kit prevede un semplice processo in 4 fasi: lisi, legame, lavaggio ed eluizione.

Le nostre particelle CCF CleanNA offrono un'elevata capacità di legame e, in combinazione con il sistema tampone, mirano a frammenti di DNA più piccoli (120-400 bp). Questa combinazione riduce al minimo il rischio di contaminazione del DNA genomico. L'elevata capacità di legame delle particelle CleanNA CCF riduce la quantità di particelle necessarie durante le fasi di legame, riducendo così il volume di eluizione. Ciò consente di eluire il DNA isolato liberato da cellule ricavato da 1 ml di plasma in soli 30-60 µl.

Il DNA isolato liberato dalle cellule è pronto per essere utilizzato nella procedura (q)PCR come applicazione a valle.

Panoramica schematica

Il tampone di lisi, caratterizzato da una formulazione unica, libera il DNA circolante dalle proteine e dalle vescicole legate al DNA con la contemporanea inattivazione delle DNasi. L'isolamento del DNA dal lisato avviene in un unico passaggio legandosi alla superficie delle particelle magnetiche. Le particelle magnetiche CleanNA vengono quindi separate dal lisato con l'ausilio di un dispositivo di separazione magnetica. Dopo alcune rapide fasi di lavaggio per rimuovere tracce di contaminanti, il DNA purificato viene eluito dalle particelle CleanNA utilizzando un tampone di eluizione.

Aggiunta di microsferi

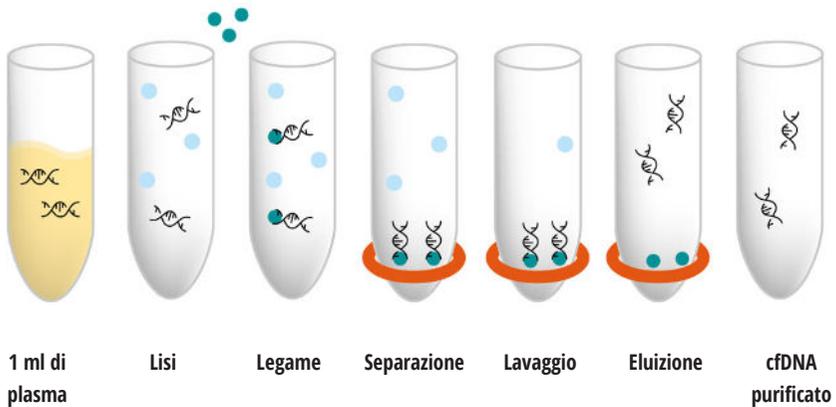


Figura 1: Schema della procedura utilizzata da Clean Cell Free DNA Kit .

Materiali in dotazione

Contenuto del kit:

Componente	Volume CCF-D0384
CCF Lysis	30 ml
CCF Binding	430 ml
CCF Wash 1	2 x 225 ml
CCF Wash 2	2 x 45 ml
Tampone di eluizione	100 ml
Soluzione di proteinasi K	6,5 ml
CleanNA Particles CCF	4,3 ml

Spedizione, conservazione e manipolazione dei reagenti

Per la spedizione, Clean Cell Free DNA Kit deve essere conservato a temperatura ambiente (15-25 °C). Non congelare i componenti di Clean Cell Free DNA Kit.

Componente	Conservazione
CCF Lysis*	Temperatura ambiente (15-25 °C)
CCF Binding	Temperatura ambiente (15-25 °C)
CCF Wash 1	Temperatura ambiente (15-25 °C)
CCF Wash 2	Temperatura ambiente (15-25 °C)
Tampone di eluizione	Temperatura ambiente (15-25 °C)
Soluzione di proteinasi K	Temperatura ambiente (15-25 °C) (per la conservazione > 12 mesi, conservare a 2-8 °C)
CleanNA Particles CCF	2-8 °C

* Nel caso in cui il tampone di lisi presenti un precipitato bianco all'interno del flacone, preriscaldare il tampone a 37 °C per sciogliere il precipitato.

Stabilità aperto: Dopo l'apertura, Clean Cell Free DNA Kit deve essere utilizzato entro un periodo massimo di 19 giorni.

Non utilizzare Clean Cell Free DNA Kit dopo la data di scadenza riportata sull'etichetta esterna della confezione.

Avvertenze

Leggere attentamente le istruzioni prima di utilizzare il kit.

Non mescolare i numeri di LOTTO dei kit.

Assicurarsi che i flaconi del kit non siano danneggiati e che non siano presenti perdite di liquido. Non utilizzare un kit danneggiato.

Il numero di lotto sulla confezione di CleanNA Particles CCF è diverso dal numero di lotto sul flacone di CleanNA Particles CCF. Il numero di LOTTO sulla scatola corrisponde al numero di LOTTO dell'intero kit e quello sui flaconi è specifico per le particelle. Poiché le CleanNA Particles CCF sono conservate a una temperatura diversa, prima dell'uso assicurarsi che il numero di LOTTO sulla confezione delle particelle corrisponda al numero di LOTTO del kit.

Qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui è ha sede l'utilizzatore e/o il paziente.

Precauzioni

Per tutte le informazioni sulla sicurezza, consultare la scheda di sicurezza (SDS). Richiedi il tuo SDS tramite cleanna.com/sds-request.

CCF Binding



Liquido e vapori infiammabili. Provoca gravi danni agli occhi. Nocivo se ingerito. Provoca irritazione cutanea. Nocivo per la vita acquatica con effetti di lunga durata. Il contatto con gli acidi libera gas tossici.



Tenere lontano da calore, superfici calde, scintille, fiamme libere e altre fonti di accensione. Non fumare. Conservare il contenitore ben chiuso. Indossare guanti protettivi, indumenti di protezione, protezione per occhi e viso. Collocare a terra e legare i contenitori e le apparecchiature di ricezione. Utilizzare apparecchiature elettriche/di ventilazione/di illuminazione/di sicurezza intrinseca a prova di esplosione. Utilizzare strumenti antiscintilla. Adottare misure per prevenire le scariche elettrostatiche. Dopo la manipolazione, lavare accuratamente le aree del corpo esposte. Non mangiare, bere o fumare durante l'uso del prodotto. Evitare il rilascio nell'ambiente.



IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare con cautela con acqua per alcuni minuti. Rimuovere le lenti a contatto, se presenti e se è possibile farlo facilmente. Continuare a risciacquare.

Chiamare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico/la guardia medica/il pronto soccorso.

In caso di incendio: Utilizzare schiuma resistente all'alcol o normale schiuma proteica per estinguere.

IN CASO DI INGESTIONE: In caso di malessere, chiamare un CENTRO ANTIVELENI/un medico/la guardia medica/il pronto soccorso.

IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare con abbondante acqua e sapone.

IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o capelli): Togliersi immediatamente gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle con acqua [o fare la doccia].

Sciacquare la bocca.

In caso di irritazione cutanea: Consultare un medico.

Togliere gli indumenti contaminati e lavarli prima di riutilizzarli.

CCF Lysis



Nocivo per la vita acquatica. Provoca gravi danni agli occhi. Provoca irritazione cutanea.

Indossare guanti protettivi/indumenti di protezione/protezione per occhi/protezione per il viso. Evitare il rilascio nell'ambiente.

IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare con cautela con acqua per alcuni minuti. Rimuovere le lenti a contatto, se presenti e se è possibile farlo facilmente. Continuare a risciacquare.

Chiamare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

Togliere gli indumenti contaminati e lavarli prima di riutilizzarli.

IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare con abbondante acqua e sapone.

In caso di irritazione cutanea: Consultare un medico.

CCF Wash 1



Nocivo se ingerito. Provoca gravi ustioni alla pelle e danni agli occhi. Nocivo per la vita acquatica con effetti di lunga durata. Il contatto con gli acidi libera gas tossici.



Non respirare la nebbia/i vapori/lo spray. Dopo la manipolazione, lavare accuratamente le aree del corpo esposte. Indossare guanti protettivi, indumenti di protezione, protezione per occhi e viso. Non mangiare, bere o fumare durante l'uso del prodotto. Evitare il rilascio nell'ambiente.

SE INGERITO: Sciacquare la bocca. NON indurre il vomito.

IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o capelli): Togliersi immediatamente gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle con acqua [o fare la doccia].

IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare con cautela con acqua per alcuni minuti. Rimuovere le lenti a contatto, se presenti e se è possibile farlo facilmente. Continuare a risciacquare.

Chiamare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico/la guardia medica/il pronto soccorso.

Lavare gli indumenti contaminati prima di riutilizzarli.

IN CASO DI INGESTIONE: In caso di malessere, chiamare un CENTRO ANTIVELENI/un medico/la guardia medica/il pronto soccorso.

IN CASO DI INALAZIONE: Portare la persona all'aria aperta e tenerla in condizioni confortevoli per agevolarne la respirazione.

Soluzione di proteinasi K



Può causare sintomi di allergia o asma o difficoltà respiratorie se inalato.

Non respirare la nebbia/i vapori/lo spray. In caso di ventilazione insufficiente, indossare una protezione per le vie respiratorie.

IN CASO DI INALAZIONE: Portare l'infortunato all'aria aperta e tenerlo a riposo in una posizione comoda agevolarne la respirazione per la respirazione.

In caso di sintomi respiratori: Chiamare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

Nota: Per uno smaltimento sicuro, consultare le norme locali in materia di rifiuti.

Controllo qualità

CleanNA produce ogni lotto del kit Clean Cell Free DNA in base a protocolli predefiniti e convalidati nel Sistema di gestione della qualità (QMS). Inoltre, dopo la produzione di ogni lotto, viene eseguito un controllo per garantire una qualità costante del prodotto. Il QMS di CleanNA è certificato EN-ISO 13485.

Limitazioni

Le prestazioni del kit Clean Cell Free DNA sono state misurate con plasma umano conservato nei seguenti anti-coagulanti:

- EDTA
- Citrato-fosfato-destrosio (CPD)
- Sodio citrato

Nella valutazione delle prestazioni è stata inclusa una serie di singoli donatori di plasma. Le prestazioni del kit Clean Cell Free DNA non sono state testate con plasma emolizzato.

È responsabilità dell'utilizzatore convalidare le prestazioni del materiale campione non utilizzato per la valutazione delle prestazioni.

Si consiglia l'uso di un controllo interno di estrazione per ogni campione per identificare eventuali risultati falsi negativi nei metodi di rilevazione a valle, causati da agenti inibitori potenzialmente sconosciuti nei campioni di plasma dei singoli pazienti.

Le prestazioni del kit sono state stabilite con metodi di rilevazione a valle basati sulla reazione a catena della polimerasi. È responsabilità dell'utilizzatore convalidare le prestazioni del dispositivo se utilizzato con altri metodi di rilevamento a valle.

I risultati diagnostici ottenuti con il kit Clean Cell Free DNA devono essere interpretati insieme ad altri risultati clinici o di laboratorio.

Raccolta e conservazione dei campioni

Plasma

La procedura di isolamento degli acidi nucleici deve iniziare immediatamente dopo la donazione di sangue e la separazione del plasma*. Nel caso in cui ciò non sia possibile, il plasma può essere conservato fino a 24 ore a 2-8 °C per la conservazione a breve termine e, nel caso di una conservazione più lunga, può essere conservato fino a 4 settimane a -20 °C o -80 °C. Scongelare i campioni di plasma a temperatura ambiente prima di utilizzare il plasma per l'estrazione del DNA libero circolante.

⚠ Nota: I campioni di origine umana sono potenzialmente infettivi. Adottare misure appropriate durante la manipolazione.

* Per la preparazione del plasma prima di isolare gli acidi nucleici privi di cellule dai campioni di sangue, seguire la procedura descritta di seguito:

1. Centrifugare le provette di sangue intero per 10 minuti a 3.000 giri/minuto (1.900 x g) a 4 °C.
2. Aspirare con cura il surnatante del plasma, tralasciando i globuli.
3. Trasferire il surnatante del plasma in una nuova provetta da centrifuga.
4. Per assicurarsi che il plasma sia privo di cellule ematiche nucleate, ripetere i passaggi da 1 a 3 per una seconda separazione.
5. In questa fase il plasma può essere utilizzato per l'estrazione dei nuclei.

Eeguire i passaggi da 6 a 9 per rimuovere dal plasma anche la cromatina intatta delle cellule ematiche rotte. Si noti che questa operazione può essere eseguita anche per la rimozione di una quantità bassa di cfDNA presente in veicoli extracellulari più grandi. In caso contrario, proseguire al punto 10.

6. Centrifugare i campioni di plasma a 16.000 x g a 4 °C utilizzando un rotore ad angolo fisso.
7. Rimuovere con cura il surnatante del plasma, assicurandosi di non toccare il pellet.
8. Trasferire il plasma in una provetta nuova.
9. Il plasma ora può essere utilizzato per l'estrazione dei nuclei.
10. Conservare il plasma secondo le istruzioni sopra riportate.

Materiali e apparecchiature a cura dell'utilizzatore

Per l'isolamento in provette singole

Materiali e reagenti necessari all'utilizzatore per l'esecuzione del protocollo in provetta per un massimo di 1 ml di campione in ingresso:

- Etanolo fresco assoluto
- Dispositivo di separazione magnetica per provette da 1,5/2,0 ml
- Vortex
- Agitatore o oscillatore
- Incubatore con impostazione a 60 °C
- Provetta/e da microcentrifuga da 1,5 ml
- Provetta/e da centrifuga da 1,5 ml

Per l'isolamento con formato di piastra a 48 pozzetti

Materiali e reagenti necessari all'utilizzatore per l'esecuzione del protocollo con piastra per un massimo di 1 ml di campione in ingresso:

- Etanolo fresco assoluto
- Piastra magnetica a 48 pozzetti, ad esempio Alpaqua CatNo# A000530
- Vortex
- Agitatore o oscillatore
- Incubatore con impostazione a 60 °C
- Piastra/e da 48 pozzetti profondi, 3,5 ml; ad esempio Wuxi NEST Biotechnology CatNo# 504102
- Piastra/e a 96 pozzetti o piastra/e PCR a 96 pozzetti

Preparazione dei reagenti

CCF Wash 2

Diluire CCF Wash 2 con etanolo assoluto fresco secondo le indicazioni e conservare a temperatura ambiente.

Kit	Quantità di etanolo assoluto da aggiungere
CCF-D0384	180 ml

Kit Clean Cell Free DNA - Protocollo a provetta singola

Prima di iniziare:

- Regolare l'incubatore a 60 °C.
- Assicurarsi che CCF Lysis sia completamente disciolta. In caso contrario, preriscaldare a 37 °C.
- Agitare o vortexare CleanNA Particles CCF per risospendere in modo completo le particelle prima dell'uso.
- Preparare CCF Wash 2 secondo le istruzioni riportate nella sezione Preparazione dei reagenti a pagina 13.

Protocollo:

1. Aggiungere fino a 1 ml di campione di plasma in una provetta da centrifuga da 15 ml (non in dotazione).

⚠ Nota: Non superare il volume massimo del campione per non ridurre l'efficienza della procedura di estrazione.

2. Se il volume è inferiore a 1 ml, raggiungere un volume di 1 ml aggiungendo tampone di eluizione (in dotazione con il kit).
3. Aggiungere 15 µl di soluzione di proteinasi K.
4. Aggiungere 67 µl di CCF Lysis.
5. Vortexare alla velocità massima o pipettare verso l'alto e verso il basso per una miscelazione accurata.
6. Incubare a 60 °C per 20 minuti. Mescolare capovolgendo o agitando ogni 10 minuti.
7. Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti.

⚠ Nota: Questa fase di incubazione è fondamentale per far scendere la temperatura del campione e ottenere un legame più efficace del DNA con CleanNA Particles CCF.

8. Aggiungere 1 ml di CCF Binding. Vortexare alla velocità massima per 30 secondi o pipettare verso l'alto e verso il basso per una miscelazione accurata.
9. Aggiungere 10 µl di CleanNA Particles CCF. Capovolgere il campione 10 volte o pipettare verso l'alto e verso il basso per miscelare.

⚠ Nota: Agitare o vortexare CleanNA Particles CCF per risospendere in modo completo le particelle prima dell'uso.

10. Incubare per 10 minuti a temperatura ambiente mescolando continuamente. Il campione deve essere mescolato per tutto il periodo di incubazione di 10 minuti con agitazione o oscillazione.

⚠ Nota: Non vortexare ad alta velocità per evitare la formazione di schiuma, con conseguente riduzione della resa. La velocità di miscelazione deve essere impostata in modo da mantenere continuamente CleanNA Particles CCF in sospensione nella soluzione.

11. Trasferire 1 ml di miscela in una provetta da microcentrifuga da 1,5 ml (non in dotazione).
12. Collocare la provetta su un dispositivo di separazione magnetica per magnetizzare CleanNA Particles CCF.
13. Incubare a temperatura ambiente fino a quando la soluzione non è stata completamente privata di CleanNA CCF Particles.

 **Nota:** Assicurarsi di incubare fino a quando tutte le particelle sono state rimosse dalla soluzione; la perdita di microsferi può causare una resa inferiore.

14. Aspirare ed eliminare il surnatante ripulito.

 **Nota:** Non toccare o pipettare CleanNA Particles CCF. In caso contrario, vi può essere riduzione della resa.

15. Trasferire la miscela rimanente dal passaggio 11 alla provetta per microcentrifuga da 1,5 ml utilizzata nei passaggi precedenti.
16. Collocare la provetta su un dispositivo di separazione magnetica per magnetizzare CleanNA Particles CCF.
17. Incubare a temperatura ambiente fino a quando la soluzione non è stata completamente privata di CleanNA CCF Particles.

 **Nota:** Assicurarsi di incubare fino a quando tutte le particelle sono state rimosse dalla soluzione; la perdita di microsferi può causare una resa inferiore.

18. Aspirare ed eliminare il surnatante ripulito.

 **Nota:** Non toccare o pipettare CleanNA Particles CCF. In caso contrario, vi può essere riduzione della resa.

19. Rimuovere la provetta contenente CleanNA Particles CCF dal dispositivo di separazione magnetica.
20. Aggiungere 500 μ di CCF Wash 1.
21. Risospendere CleanNA Particles CCF vortexando per 2 minuti o pipettando su e giù per 20 volte.

 **Nota:** Per ottenere una buona purezza, è fondamentale la risospensione completa di CleanNA Particles CCF.

22. Collocare la provetta sul dispositivo di separazione magnetica per magnetizzare CleanNA Particles CCF.
23. Incubare a temperatura ambiente fino a quando la soluzione non è stata completamente privata di CleanNA CCF Particles.

 **Nota:** Assicurarsi di incubare fino a quando tutte le particelle sono state rimosse dalla soluzione; la perdita di microsferi può causare una resa inferiore.

24. Aspirare ed eliminare il surnatante ripulito.

 **Nota:** Non toccare o pipettare CleanNA Particles CCF. In caso contrario, vi può essere riduzione della resa.

25. Ripetere i passaggi 19-24 per una seconda fase di lavaggio "CCF Wash 1".
26. Rimuovere la provetta contenente CleanNA Particles CCF dal dispositivo di separazione magnetica.
27. Aggiungere 500 μ l di CCF Wash 2.

⚠ Nota: Diluire CCF Wash 2 con etanolo assoluto prima dell'uso. Per le istruzioni, vedere pagina 13.

28. Risospendere CleanNA Particles CCF vortexando per 2 minuti o pipettando su e giù per 20 volte.
29. Collocare la provetta sul dispositivo di separazione magnetica per magnetizzare CleanNA Particles CCF.
30. Incubare a temperatura ambiente fino a quando la soluzione non è stata completamente privata di CleanNA CCF Particles.

⚠ Nota: Assicurarsi di incubare fino a quando tutte le particelle sono state rimosse dalla soluzione; la perdita di microsfere può causare una resa inferiore.

31. Aspirare ed eliminare il surnatante ripulito.

⚠ Nota: Non toccare o pipettare CleanNA Particles CCF. In caso contrario, vi può essere riduzione della resa.

32. Ripetere i passaggi 26-31 per una seconda fase di lavaggio "CCF Wash 2".
33. Rimuovere la provetta dal dispositivo di separazione magnetica per circa 30 secondi.
34. Collocare la provetta sul dispositivo di separazione magnetica per magnetizzare CleanNA Particles CCF.

⚠ Nota: Assicurarsi di incubare fino a quando tutte le particelle sono state rimosse dalla soluzione; la perdita di microsfere può causare una resa inferiore.

35. Aspirare ed eliminare il CCF Wash 2 residuo.

⚠ Nota: Non toccare o pipettare CleanNA Particles CCF. In caso contrario, vi può essere riduzione della resa.

36. Lasciare la provetta aperta sul dispositivo di separazione magnetica per 25 minuti per far asciugare CleanNA Particles CCF.
37. Rimuovere la provetta contenente CleanNA Particles CCF dal dispositivo di separazione magnetica.
38. Aggiungere 30-60 µl di tampone di eluizione. Risospendere CleanNA Particles CCF vortexando o pipettando su e giù per 20 volte.

⚠ Nota: Assicurarsi che il tampone di eluizione copra CleanNA Particles CCF. Volumi di eluizione troppo bassi possono causare una resa inferiore. Volumi troppo alti causano una minore concentrazione di DNA nell'eluato.

39. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti vortexando continuamente.
40. Collocare la provetta sul dispositivo di separazione magnetica per magnetizzare CleanNA Particles CCF.
41. Incubare a temperatura ambiente fino a quando la soluzione non è stata completamente privata di CleanNA CCF Particles.

⚠ Nota: Continuare l'incubazione fino a quando tutte le particelle sono state rimosse dalla soluzione; il trascinarsi delle microsfere può causare inibizione nel corso della PCR a valle.

42. Trasferire il surnatante pulito contenente il DNA purificato in una provetta pulita da 1,5 ml per microcentrifuga (non in dotazione).
43. Conservare gli acidi nucleici estratti privi di cellule a -20 °C.

Clean Cell Free DNA Kit - Protocollo con piastra a 48 pozzetti

Prima di iniziare:

- Regolare l'incubatore a 60 °C.
- Assicurarsi che CCF Lysis sia completamente disciolta. In caso contrario, preriscaldare a 37 °C.
- Agitare o vortexare CleanNA Particles CCF per risospendere in modo completo le particelle prima dell'uso.
- Preparare CCF Wash 2 secondo le istruzioni riportate nella sezione Preparazione dei reagenti a pagina 13.

Protocollo:

1. Aggiungere fino a 1 ml di campioni di plasma/siero in una piastra a 48 pozzetti profondi (non in dotazione).

Nota: Non superare il volume massimo del campione per non ridurre l'efficienza della procedura di estrazione.

2. Se il volume è inferiore a 1 ml, raggiungere un volume di 1 ml aggiungendo tampone di eluizione (in dotazione con il kit).
3. Aggiungere 15 µl di soluzione di proteinasi K.
4. Aggiungere 67 µl di CCF Lysis e sigillare la piastra.
5. Vortexare alla velocità massima o pipettare verso l'alto e verso il basso per una miscelazione accurata.
6. Incubare a 60 °C per 20 minuti. Mescolare capovolgendo o agitando ogni 10 minuti.
7. Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti.

Nota: Questa fase di incubazione è fondamentale per far scendere la temperatura del campione e ottenere il legame più efficace del DNA con CleanNA Particles CCF.

8. Aggiungere 1 ml di CCF Binding. Vortexare alla velocità massima per 30 secondi o pipettare verso l'alto e verso il basso per una miscelazione accurata.
9. Aggiungere 10 µl di CleanNA Particles CCF. Capovolgere i campioni 10 volte o pipettare verso l'alto e verso il basso per miscelare.

Nota: Agitare o vortexare CleanNA Particles CCF per risospendere in modo completo le particelle prima dell'uso.

10. Incubare per 10 minuti a temperatura ambiente mescolando continuamente. I campioni devono essere mescolati per tutto il periodo di incubazione di 10 minuti con agitazione o oscillazione.

Nota: Non vortexare ad alta velocità per evitare la formazione di schiuma, con conseguente riduzione della resa. La velocità di miscelazione deve essere impostata in modo da mantenere continuamente CleanNA Particles CCF in sospensione nella soluzione.

11. Collocare la piastra a 48 pozzetti profondi sulla piastra magnetica a 48 pozzetti per magnetizzare CCF CleanNA Particles. Le particelle di ciascun pozzetto vengono raccolte dai magneti sul posizionati sul fondo.
12. Incubare a temperatura ambiente fino a quando la soluzione non è stata completamente privata di CleanNA CCF Particles.

 **Nota:** Assicurarsi di incubare fino a quando tutte le particelle sono state rimosse dalla soluzione; la perdita di microsfele può causare una resa inferiore.

13. Aspirare ed eliminare il surnatante ripulito.

 **Nota:** Non toccare o pipettare CleanNA Particles CCF. In caso contrario, vi può essere riduzione della resa.

14. Rimuovere la piastra a 48 pozzetti contenente CleanNA Particles CCF dal dispositivo di separazione magnetica.
15. Aggiungere 500 µ di CCF Wash 1.
16. Risospendere CleanNA Particles CCF vortexando per 2 minuti o pipettando su e giù per 20 volte.

 **Nota:** Per ottenere una buona purezza, è fondamentale la risospensione completa di CleanNA Particles CCF.

17. Trasferire CleanNA Particles CCF risospeso in una nuova piastra a 48 pozzetti profondi (non in dotazione).

 **Nota:** Continuare nel formato a 48 pozzetti per la procedura rimanente.

18. Collocare la piastra a 48 pozzetti profondi sulla piastra magnetica a 48 pozzetti per magnetizzare CCF CleanNA Particles.
19. Incubare a temperatura ambiente fino a quando la soluzione non è stata completamente privata di CleanNA CCF Particles.

 **Nota:** Assicurarsi di incubare fino a quando tutte le particelle sono state rimosse dalla soluzione; la perdita di microsfele può causare una resa inferiore.

20. Aspirare ed eliminare il surnatante ripulito.

 **Nota:** Non toccare o pipettare CleanNA Particles CCF. In caso contrario, vi può essere riduzione della resa.

21. Rimuovere la piastra a 48 pozzetti contenente CleanNA Particles CCF dal dispositivo di separazione magnetica.
22. Aggiungere 500 µ di CCF Wash 1.
23. Risospendere CleanNA Particles CCF vortexando per 2 minuti o pipettando su e giù per 20 volte.

 **Nota:** Per ottenere una buona purezza, è fondamentale la risospensione completa di CleanNA Particles CCF.

24. Collocare la piastra a 48 pozzetti profondi sulla piastra magnetica a 48 pozzetti per magnetizzare CCF CleanNA Particles.
25. Incubare a temperatura ambiente fino a quando la soluzione non è stata completamente privata di CleanNA CCF Particles.

 **Nota:** Assicurarsi di incubare fino a quando tutte le particelle sono state rimosse dalla soluzione; la perdita di microsfele può causare una resa inferiore.

26. Aspirare ed eliminare il surnatante ripulito.

⚠ Nota: Non toccare o pipettare CleanNA Particles CCF. In caso contrario, vi può essere riduzione della resa.

27. Rimuovere la piastra a 48 pozzetti contenente CleanNA Particles CCF dal dispositivo di separazione magnetica.

28. Aggiungere 500 µl di CCF Wash 2.

⚠ Nota: Diluire CCF Wash 2 con etanolo assoluto prima dell'uso. Per le istruzioni, vedere pagina 13.

29. Risospendere CleanNA Particles CCF vortexando per 2 minuti o pipettando su e giù per 20 volte.

30. Collocare la piastra a 48 pozzetti profondi sulla piastra magnetica a 48 pozzetti per magnetizzare CCF CleanNA Particles.

31. Incubare a temperatura ambiente fino a quando la soluzione non è stata completamente privata di CleanNA CCF Particles.

⚠ Nota: Assicurarsi di incubare fino a quando tutte le particelle sono state rimosse dalla soluzione; la perdita di microsferi può causare una resa inferiore.

32. Aspirare ed eliminare il surnatante ripulito.

⚠ Nota: Non toccare o pipettare CleanNA Particles CCF. In caso contrario, vi può essere riduzione della resa.

33. Ripetere i passaggi 28-32 per una seconda fase di lavaggio "CCF Wash 2".

34. Rimuovere la piastra a 48 pozzetti contenente CleanNA Particles CCF dal dispositivo di separazione magnetica.

35. Collocare la piastra a 48 pozzetti profondi sulla piastra magnetica a 48 pozzetti per magnetizzare CCF CleanNA Particles.

⚠ Nota: Assicurarsi di incubare fino a quando tutte le particelle sono state rimosse dalla soluzione; la perdita di microsferi può causare una resa inferiore.

36. Aspirare ed eliminare il CCF Wash 2 residuo.

⚠ Nota: Non toccare o pipettare CleanNA Particles CCF. In caso contrario, vi può essere riduzione della resa.

37. Lasciare la provetta sul dispositivo di separazione magnetica per 25 minuti per far asciugare CleanNA Particles CCF.

38. Rimuovere la piastra a 48 pozzetti contenente CleanNA Particles CCF dal dispositivo di separazione magnetica.

39. Aggiungere 30-60 µl di tampone di eluizione. Risospendere CleanNA Particles CCF vortexando o pipettando su e giù per 20 volte.

⚠ Nota: Assicurarsi che il tampone di eluizione copra CleanNA Particles CCF. Volumi di eluizione troppo bassi possono causare una resa inferiore. Volumi troppo alti causano una minore concentrazione di DNA nell'eluato.

40. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti, mescolando costantemente servendosi di pipette o tramite agitazione o vortex.

41. Collocare la piastra a 48 pozzetti profondi sulla piastra magnetica a 48 pozzetti per magnetizzare CCF CleanNA Particles.

42. Incubare a temperatura ambiente fino a quando la soluzione non è stata completamente privata di CleanNA CCF Particles.

 **Nota:** Continuare l'incubazione fino a quando tutte le particelle sono state rimosse dalla soluzione; il trascinarsi delle microsfeere può causare inibizione nel corso della PCR a valle.

43. Trasferire il surnatante pulito contenente il DNA purificato in una piastra a 96 pozzetti pulita o in provette individuali pulite (non in dotazione).

44. Conservare gli acidi nucleici estratti privi di cellule a -20 °C.

Guida alla risoluzione dei problemi

Utilizzare questa guida per risolvere eventuali problemi. Per ulteriore assistenza, contattare il distributore locale.

Possibili problemi e suggerimenti

Problema	Causa	Suggerimento
Bassa resa di DNA	Risospensione incompleta di CleanNA Particles CCF.	Risospendere CleanNA Particles CCF agitando vigorosamente con un vortex prima dell'uso.
	Legame inefficace del DNA a CleanNA Particles CCF.	Assicurarsi di lasciare raffreddare il campione a temperatura ambiente per 10 minuti prima di aggiungere CCF Binding.
		Assicurarsi di mescolare in modo continuo ogni campione durante l'incubazione del legame.
	Perdita di CleanNA Particles CCF durante il funzionamento.	Evitare di toccare CleanNA Particles CCF durante l'aspirazione.
	Il DNA rimane legato a CleanNA Particles CCF.	Diluire CCF Wash 2 aggiungendo un volume appropriato di etanolo assoluto prima dell'uso (per le istruzioni, vedere pagina 13).
		Assicurarsi che il tampone di eluizione copra completamente CleanNA Particles CCF.
Trascinamento di etanolo.	Asciugare CleanNA Particles CCF a temperatura ambiente per 25 minuti prima dell'eluizione.	
CleanNA Particles CCF non viene eliminato completamente dalla soluzione	Tempo di magnetizzazione troppo breve.	Aumentare il tempo di raccolta sul dispositivo di separazione magnetica.
Copurificazione ad alto peso molecolare	È necessario eseguire due fasi di CCF Wash 1.	Eseguire due fasi di CCF Wash 1 come indicato nelle Istruzioni per l'uso. Se necessario, aumentare il volume del tampone di lavaggio.
Problemi nelle applicazioni a valle	Trascinamento di sali.	CCF Wash 2 deve essere a temperatura ambiente.

Dati anomali del bioanalizzatore	Il bioanalizzatore mostra più picchi acuti durante l'analisi.	Assicurarsi di rimuovere ogni traccia di surnatante dopo ogni fase di lavaggio.
		Assicurarsi di incubare la provetta/piastra per 25 minuti per asciugare CleanNA Particles CCF.
	Il bioanalizzatore mostra una linea di base in salita verso l'estremità.	Controllare che il chip del bioanalizzatore non contenga bolle d'aria. Caricare i campioni su un nuovo chip appena preparato.
	Il bioanalizzatore mostra un blob elevato all'inizio della traccia.	Assicurarsi che il campione purificato non contenga tracce di CleanNA particles CCF.

Simboli

	Diagnostica in vitro
	Marchio CE. Questo prodotto soddisfa i requisiti del dispositivo CE-IVD ai sensi del Regolamento UE per i dispositivi medici diagnostici in vitro (2017/746)
	Numero d'ordine
	Produttore
	Attenzione
	Limite di temperatura
	Data di scadenza
	Numero di lotto

Informazioni per l'ordine

Contattare il distributore locale.

Prodotto	Codice articolo
Kit Clean Cell Free DNA Kit (384 preparatori)	CCF-D0384

Cronologia delle revisioni del documento

Versione del manuale	Data della revisione	Capitolo rivisto	Spiegazione della revisione
1	2023/OCT/02	N/A	Versione iniziale
2	2024/FEB/08	Prima pagina e panoramica schematica.	Aggiornamento nel collegamento al sito web e panoramica schematica.

Note

Note

Note

Informazioni di contatto

Coenecoop 75 | 2741 PH Waddinxveen | Paesi Bassi

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

www.cleanna.com

