



---

# MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit

---

 **Version 06**

Letzte Aktualisierung des Inhalts: August 2021

Vorgefüllte Reagenzien für den Gebrauch mit dem MagNA Pure 24 Instrument (Bestell-Nr. 07 290 519 001) zur Isolierung von genomischer DNA und viralen Nukleinsäuren aus bis zu 1.000 µl Vollblut, Plasma oder Serum, aus bis zu 5 mg frisch gefrorenem Gewebe, aus bis zu 6 mm<sup>3</sup> Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe oder aus bis zu 1 × 10<sup>6</sup> Zellen in Kultur sowie zur Isolierung von Nukleinsäuren bakteriellen, fungalen oder viralen Ursprungs aus bis zu 1.000 µl humanem Probenmaterial oder von humanen zellfreien Nukleinsäuren aus bis zu 4.000 µl Plasma.

**REF 07 658 036 001**

Kit für bis zu 96 Isolierungen (200 µl)



**Bei +15 bis +25 °C lagern**

-  Kit lichtgeschützt aufbewahren.
-  Kit von Magneten fernhalten.

# Inhaltsverzeichnis

---

|            |                                                         |           |
|------------|---------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b>  | <b>VERWENDUNGSZWECK .....</b>                           | <b>3</b>  |
| <b>2.</b>  | <b>ZUSAMMENFASSUNG UND BESCHREIBUNG DES KITS .....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>3.</b>  | <b>FUNKTIONSPRINZIP .....</b>                           | <b>4</b>  |
| <b>4.</b>  | <b>REAGENZIEN .....</b>                                 | <b>5</b>  |
| 4.1        | Anzahl der Isolierungen                                 | 5         |
| 4.2        | Mitgelieferte Materialien                               | 5         |
| <b>5.</b>  | <b>VORSICHTSMASSNAHMEN UND HANDHABUNG .....</b>         | <b>7</b>  |
| 5.1        | Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen                     | 7         |
| 5.2        | Handhabung der Reagenzien                               | 7         |
| 5.3        | Gute Laborpraxis                                        | 8         |
| 5.4        | Umgang mit Abfall                                       | 8         |
| <b>6.</b>  | <b>LAGERUNG UND HALTBARKEIT .....</b>                   | <b>9</b>  |
| 6.1        | Kit und Reagenzien                                      | 9         |
| 6.2        | Probenentnahme und Lagerung von Probenmaterial          | 10        |
| 6.3        | Lagerung aufgereinigter Nukleinsäuren und Eluate        | 10        |
| <b>7.</b>  | <b>MATERIALIEN .....</b>                                | <b>11</b> |
| 7.1        | Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte             | 11        |
| 7.2        | Optionale Materialien                                   | 12        |
| <b>8.</b>  | <b>VERFAHREN .....</b>                                  | <b>13</b> |
| 8.1        | Aufreinigungsprotokolle                                 | 13        |
| 8.2        | Probenmaterialien und Vorbehandlungsverfahren           | 17        |
| 8.3        | Isolierung                                              | 26        |
| 8.4        | Beenden eines Laufs                                     | 27        |
| 8.5        | Qualitätskontrolle                                      | 28        |
| <b>9.</b>  | <b>GRENZEN DER METHODE UND STÖREINFLÜSSE .....</b>      | <b>29</b> |
| <b>10.</b> | <b>ZUSATZINFORMATIONEN .....</b>                        | <b>30</b> |
| 10.1       | Symbole                                                 | 30        |
| 10.2       | Änderungen gegenüber der Vorversion                     | 30        |
| <b>11.</b> | <b>MARKEN .....</b>                                     | <b>31</b> |
| <b>12.</b> | <b>REGULATORISCHER HINWEIS/HAFTUNGSAUSSCHLUSS .....</b> | <b>31</b> |
| <b>13.</b> | <b>LITERATUR .....</b>                                  | <b>31</b> |

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Das MagNA Pure 24 System ist ein automatisches System zur Aufreinigung von Nukleinsäuren, das aus dem MagNA Pure 24 Instrument, der Software, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien besteht. Das MagNA Pure 24 System ist für die Verwendung im professionellen Bereich ausgelegt und dient zur Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Proben biologischen Ursprungs im Rahmen der *In-vitro*-Diagnostik.

Das MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit ist für den Gebrauch mit dem MagNA Pure 24 System vorgesehen.

## 2. ZUSAMMENFASSUNG UND BESCHREIBUNG DES KITS

Das MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit ist für die Isolierung von Nukleinsäuren aus verschiedenen Probenmaterialien und unterschiedlichen Probenmengen (siehe folgende Tabelle) vorgesehen.

| Zielsubstanz                                                | Probenmaterial                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Genomische DNA                                              | <ul style="list-style-type: none"><li>▪ 200, 500 oder 1000 µl Vollblut</li><li>▪ bis zu <math>1 \times 10^6</math> Zellen in Kultur</li><li>▪ bis zu 5 mg frisch gefrorenes Gewebe</li><li>▪ bis zu 6 mm<sup>3</sup> Formalin-fixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe (FFPE-Gewebe)</li></ul> |
| Nukleinsäuren bakteriellen, fungalen oder viralen Ursprungs | 200, 500 oder 1000 µl Plasma, Serum, Vollblut, bronchoalveoläre Lavage (BAL), Nasen-/Nasen-Rachen-Abstriche, Stuhl oder Urin.                                                                                                                                                                     |
| Zellfreie Nukleinsäure menschlichen Ursprungs               | 2.000 oder 4.000 µl Plasma                                                                                                                                                                                                                                                                        |

Die isolierten und aufgereinigten Nukleinsäuren erfüllen die Qualitätsanforderungen für hochempfindliche quantitative PCR-/RT-PCR-Analysen und Hochdurchsatz-Sequenzierung.

### 3. FUNKTIONSPRINZIP

Die Nukleinsäure-Isolierung basiert auf der bewährten MagNA Pure Technologie der magnetischen Glaspartikel (MGP).

Diese Isolierung läuft in den folgenden Schritten ab:

1. Das Probenmaterial wird lysiert, die Nukleinsäuren werden freigesetzt und die Nukleasen werden denaturiert.
2. Die Nukleinsäuren binden aufgrund der Eigenschaften des chaotropen Salzes und der hohen Ionenstärke des Lyse-/Bindungspuffers an die Kieselgloberfläche der zugegebenen magnetischen Glaspartikel.
3. Die magnetischen Glaspartikel mit den daran gebundenen Nukleinsäuren werden durch magnetische Anziehung vom Rest der lysierten Probe getrennt.
4. Ungebundene Substanzen, wie z. B. Proteine, Zelltrümmer und PCR-Inhibitoren, werden in mehreren Waschschrinen entfernt.
5. Die aufgereinigten Nukleinsäuren werden von den magnetischen Glaspartikeln eluiert.

## 4. REAGENZNIEN

Das Kit ist je nach bearbeitetem Probenvolumen für bis zu 96 Isolierungen vorgesehen.

### 4.1 Anzahl der Isolierungen

| Anzahl der Isolierungen | Probenmaterial                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3 × 32 Isolierungen     | <b>Kleines Volumen:</b><br>Bis zu 200 µl Plasma, Serum, Vollblut, bronchoalveoläre Lavage (BAL), Nasen-/Nasen-Rachen-Abstriche, Stuhl oder Urin, bis zu $5 \times 10^5$ Zellen in Kultur und bis zu 5 mg frisch gefrorenes Gewebe.                                                                                                         |
| 3 × 24 Isolierungen     | <b>Großes Volumen:</b><br>500 oder 1.000 µl Plasma, Serum, Vollblut, bronchoalveoläre Lavage (BAL), Nasen-/Nasen-Rachen-Abstriche, Stuhl oder Urin und bis zu $1 \times 10^6$ Zellen in Kultur.<br>Bis zu 6 mm <sup>3</sup> Formalin-fixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe, entspricht 6 FFPE-Gewebeschnitten von 4 oder 5 µm Dicke. |
| 3 × 24 Isolierungen     | <b>Extra-großes Volumen:</b><br>2.000 oder 4.000 µl Plasma.<br>ⓘ Zur Bearbeitung extra-großer Probenvolumina werden zusätzliche Reagenzien benötigt.                                                                                                                                                                                       |

### 4.2 Mitgelieferte Materialien

Das Kit besteht aus 3 Reagenzkassetten (mit jeweils 6 Reagenzbehältern) und 12 MGP-Röhrchen. Alle Komponenten des Kits sind gebrauchsfertig.

| 3 Reagenz-kassetten | Inhalt/Funktion                                                                                                             | Zusammensetzung                                |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Reagenzbehälter 1   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Waschpuffer I</li> <li>▪ zur Entfernung von Ver-</li> <li>unreinigungen</li> </ul> | 70 ml<br>Guanidinchlorid, Ethanol,<br>Tris-HCl |
| Reagenzbehälter 2   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Proteinase K</li> <li>▪ für den Proteinverdau</li> </ul>                           | 12 ml<br>Proteinase K, Glycerin                |

|                        |                                                                                                                                                    |                                           |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Reagenzbehälter 3      | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Lysis Buffer 30 ml</li> <li>▪ zur Lyse von Zellen und Pathogenen und Bindung der Nukleinsäuren</li> </ul> | Guanidinthiozyanat, Polidocanol, Tris-HCl |
| Reagenzbehälter 4      | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Waschpuffer II 34 ml</li> <li>▪ zur Entfernung von Verunreinigungen</li> </ul>                            | Ver-Ethanol, Natriumacetat                |
| Reagenzbehälter 5      | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Elutionspuffer 15 ml</li> <li>▪ zum Eluieren von Nukleinsäuren</li> </ul>                                 | Tris-HCl                                  |
| Reagenzbehälter 6      | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Waschpuffer III 60 ml</li> <li>▪ zur Entfernung von Verunreinigungen</li> </ul>                           | Natriumacetat                             |
| <b>12 MGP-Röhrchen</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ magnetische Glaspartikel 1,8 ml</li> <li>▪ zur Bindung der Nukleinsäuren</li> </ul>                       | magnetische Glaspartikel, Isopropanol     |

⚠ Die einzelnen Reagenzbehälter dürfen nicht aus den Reagenzkassetten entnommen werden. Sicherheitssymbole und Warnhinweise finden Sie in den zugehörigen Sicherheitsdatenblättern (SDS).



**Abb. 1: Beispielhafte Produktabbildung – Reagenzkassette mit den Reagenzbehältern 1 bis 6**

## 5. VORSICHTSMASSNAHMEN UND HANDHABUNG

### 5.1 Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Alle Materialien menschlichen Ursprungs und alle daraus entstehenden Abfälle müssen gemäß der Guten Laborpraxis (wie in „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“ und in CLSI-Dokument M29-A4<sup>1)</sup> 2) beschrieben) als potenziell infektiöses Material behandelt werden.
- Die in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren dürfen nur von Personen durchgeführt werden, die in der Handhabung biologisch gefährlicher Materialien und dem Gebrauch des MagNA Pure 24 Systems geschult sind.
- Da die Sensitivität und der Titer von potenziellen Erregern im Probenmaterial unterschiedlich sein kann, muss der Benutzer für eine optimale Inaktivierung von Erregern sorgen und geeignete Maßnahmen gemäß den örtlichen Sicherheitsvorschriften treffen.
- Die vorgegebenen Verfahren und Richtlinien müssen genau befolgt werden, um sicherzustellen, dass die Isolierung und Aufreinigung der Nukleinsäuren korrekt durchgeführt werden. Abweichungen von den Verfahren und Richtlinien können die Aufreinigungsleistung beeinträchtigen.
- Es dürfen nur die in diesem Kit bereitgestellten Reagenzien und die in dieser Gebrauchsanweisung empfohlenen Puffer verwendet werden. Durch die Verwendung anderer Produkte können RNasen eingeschleppt werden.
- Es dürfen nur die mitgelieferten oder angegebenen Verbrauchsmaterialien verwendet werden, um eine optimale Isolierung und Aufreinigung der Nukleinsäuren zu gewährleisten.

### 5.2 Handhabung der Reagenzien

- Mehrere Puffer im MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit enthalten gefährliche oder schädliche Substanzen. Die Reagenzien dürfen nicht mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten in Berührung kommen. Falls es doch zu einem Kontakt kommt, waschen Sie die betroffene Stelle sofort mit reichlich Wasser ab. Verschüttete Reagenzien müssen mit Wasser verdünnt werden, bevor sie aufgewischt werden.
- Reagenzien, die Guanidinthiozyanat (Lysis Buffer) enthalten, dürfen nicht mit Natriumhypochloritlösung (Bleichlösung) oder Säuren in Kontakt kommen, da bei diesen Gemischen hochgradig giftige Gase entstehen können. Diese Vorsichtsmaßnahme muss besonders bei der Reinigung des Adapters für die Probenbearbeitungsstation, des Einsatzes für Flüssigabfall, des Pipettierspitzenabfallbehälters und der Reagenzpipettierspitzen-Abstellvorrichtung beachtet werden. Weitere Informationen zur Reinigung und Wartung finden Sie in der MagNA Pure 24 Benutzerunterstützung.
- Unterziehen Sie die Reagenzkassetten vor dem Gebrauch einer Sichtprüfung, um sicherzustellen, dass sie keine Anzeichen einer Undichtigkeit aufweisen. Wenn Anzeichen einer Undichtigkeit vorliegen, darf das entsprechende Material nicht für die Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren verwendet werden.
- Achten Sie darauf, dass die Reagenzien nach dem Öffnen nicht mit Mikroorganismen oder Nukleasen kontaminiert werden.
- Verschließen Sie alle Reagenzflaschen, die auf demselben Gerät weiterverwendet werden sollen, sofort nach der Verwendung mit den zugehörigen Verschlüssen und lagern Sie sie gemäß den Angaben in der Gebrauchsanweisung.

### 5.3 Gute Laborpraxis

- Tragen Sie beim Umgang mit Proben und Reagenzien Einweg-Schutzhandschuhe, einen Laborkittel und einen Augenschutz. Die Handschuhe müssen zwischen der Handhabung von Proben und Reagenzien gewechselt werden, um eine Kontamination zu vermeiden.
- Wenn bei der Handhabung und Bearbeitung von Proben eine mögliche Verschleppung von Proben nicht ausreichend kontrolliert wird, können falsch-positive Ergebnisse auftreten.
- Im Laborbereich ist Essen, Trinken und Rauchen nicht gestattet.
- Pipettieren mit dem Mund ist nicht zulässig.
- Waschen Sie sich nach der Arbeit mit Proben und Reagenzien und nach dem Ausziehen der Handschuhe gründlich die Hände.

Mit RNase kontaminierte Reagenzien und Reaktionsgefäße führen zur Zersetzung der Template-RNA. Gehen Sie nach den folgenden Anweisungen vor, um das Risiko einer Kontamination auf ein Minimum zu reduzieren:

- Berühren Sie keine Oberflächen oder Materialien, die mit RNase verunreinigt sein könnten, um eine Verschleppung zu vermeiden.
- Entsorgen Sie Pipettierspitzen in geschlossenen Behältern, um Verunreinigungen durch die Luft zu vermeiden.
- Reinigen, desinfizieren und dekontaminieren Sie alle Arbeitsbereiche und Geräte, einschließlich der Pipetten, mit geeigneten handelsüblichen Reagenzien.
- Arbeiten Sie in einer speziell für RNA-Anwendungen vorgesehenen Umgebung. Verwenden Sie möglichst Reaktionsgefäße und Pipettoren, die ausschließlich für die Arbeit mit Template-RNA vorgesehen sind.
- Wenn im Gerät Flüssigkeiten verschüttet werden, befolgen Sie die Reinigungsanweisungen in der MagNA Pure 24 Benutzerunterstützung.

### 5.4 Umgang mit Abfall

- Sicherheitsdatenblätter (Safety Data Sheets, SDS) sind online unter [www.dialog.roche.com](http://www.dialog.roche.com) oder auf Anfrage bei Ihrer Roche Vertretung vor Ort erhältlich.
- Alle Materialien, die mit Proben und Reagenzien in Kontakt gekommen sind, müssen gemäß den nationalen und örtlichen Bestimmungen entsorgt werden.
- Tragen Sie beim Entsorgen von Proben und Kitreagenzien Einweg-Schutzhandschuhe, einen Laborkittel und einen Augenschutz.
- Gehen Sie zur Entsorgung der Reagenzien aus den Behältern wie folgt vor:
  1. Durchstechen Sie die Folie in der Ecke eines Reagenzbehälters der Reagenzkassette mit Hilfe eines stabilen Verbrauchsartikels aus Kunststoff, wie z. B. einer serologischen Pipette.
  2. Schlagen Sie die Folie um und entsorgen Sie die Flüssigkeit in einem geeigneten Abfallbehälter.
  3. Wiederholen Sie die Schritte 1 und 2, bis alle Behälter leer sind.

## 6. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

### 6.1 Kit und Reagenzien

- Der Versand des Kits erfolgt bei Umgebungstemperatur.
- Halten Sie das Kit von Magneten fern und bewahren Sie es lichtgeschützt auf.

#### Reagenzkassetten

- Bei Lagerung zwischen +15 bis +25 °C ist die ungeöffnete Reagenzkassette bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum stabil.
- Haltbarkeit im Gerät: Die Reagenzkassetten können nach dem ersten Einstecken bei +15 bis +25 °C bis zu 12 Stunden auf der Geräteplattform verwendet werden.
- Eine Reagenzkassette kann innerhalb von 28 Tagen für bis zu 6 einzelne Läufe auf demselben Gerät verwendet werden. Die Reagenzkassetten sind für die Lagerung mit MagNA Pure Sealing Foil zu versiegeln. Neu versiegelte Reagenzkassetten können bei +2 bis +8 °C in aufrechter Stellung aufbewahrt werden. Lassen Sie die Reagenzkassetten vor dem weiteren Gebrauch 60 Minuten lang auf +15 bis +25 °C äquilibrieren.
- ⚠ Angebrochene Reagenzkassetten können nur auf demselben Gerät wiederverwendet werden. Mit der Software wird das Inventar für jedes Gerät mit Hilfe der Reagenzbarcodes überwacht. Dabei werden angebrochene Reagenzkassetten erkannt, um im nächsten Lauf eine optimale Handhabung zu gewährleisten.
- ⚠ Wenn die Reagenzkassetten nicht korrekt versiegelt sind oder länger als 28 Tage aufbewahrt werden, kann die Leistung der Isolierung und Aufreinigung durch Verdunstungseffekte beeinträchtigt werden.
- ⚠ Bei der Aufbewahrung oder Mitführung zuvor geöffneter Reagenzkassetten ist ein Kippen der Kassetten zu vermeiden, weil ansonsten Flüssigkeiten austreten können.

#### MGP-Röhrchen

- Bei Lagerung zwischen +15 bis +25 °C sind MGP-Röhrchen bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum stabil. MGP-Röhrchen sind **ausgeschlossen für den Einmalgebrauch** vorgesehen.
- MGP-Röhrchen können nach dem gründlichen Mischen bis zu 1 Stunde lang geöffnet auf der Geräteplattform aufbewahrt werden, bevor der Lauf gestartet wird.

## 6.2 Probenentnahme und Lagerung von Probenmaterial

Zur Gewährleistung eines empfindlichen Nukleinsäurenachweises müssen die Proben adäquat gelagert werden. Die Probenstabilität wird bei erhöhten Temperaturen beeinträchtigt. Tauen Sie die gefrorenen Proben unter leichten Schüttelbewegungen auf, z. B. mit Hilfe eines Rotationsmischers.

- ⚠ Die Lagerungsbedingungen (*d.h.* Temperatur, Zeit) müssen für ein bestimmtes Probenmaterial hinsichtlich der einzelnen IVD-Parameter validiert werden.
- ⚠ Probenmaterial darf nicht in versiegelten Probenbearbeitungsplatten aufbewahrt werden.
- ⚠ Plasma oder Blut, das Heparin enthält, darf nicht verwendet werden, da es sich negativ auf die Leistung der Downstream-Applikation auswirkt.

## 6.3 Lagerung aufgereinigter Nukleinsäuren und Eluate

Zur Gewährleistung optimaler Ergebnisse fahren Sie sofort mit der Downstream-Applikation fort.

- ⚠ Die Eluate dürfen nicht auf der Geräteplattform aufbewahrt werden.
- ⚠ Die Lagerungsbedingungen (*d.h.* Temperatur, Zeit) für Eluate müssen hinsichtlich der einzelnen IVD-Parameter validiert werden.
- ⚠ Wenn Eluate in 8er-Tubestreifen aufbewahrt werden, gehen Sie beim Herausnehmen von 8er-Capstreifen vorsichtig vor, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Wenn 8er-Tubestreifen neu versiegelt werden müssen, verwenden Sie aus dem gleichen Grund stets einen neuen 8er-Capstreifen.

Wenn die Eluate im Gefrierschrank gelagert wurden, mischen Sie sie nach dem Auftauen durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren, bevor Sie Downstream-Schritte, wie z. B. PCR/RT-PCR oder OD-Messungen, durchführen. Das Mischvolumen sollte mindestens die Hälfte des Eluatvolumens betragen. Wenn die Nukleinsäuren nicht vorgemischt werden und in der Lösung nicht gleichmäßig/homogen verteilt sind, sind die Ergebnisse in nachfolgenden Applikationen u. U. nicht reproduzierbar.

## 7. MATERIALIEN

### 7.1 Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

| Material                                          | Bezeichnung                                           | Bestellnummer  |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------|
| MagNA Pure 24 Instrument                          | Gerät                                                 | 07 290 519 001 |
| MagNA Pure 24 Processing Cartridge                | Probenbearbeitungsplatte                              | 07 345 577 001 |
| MagNA Pure 24 Processing Tip Park / Piercing Tool | Einsatz für Probenbearbeitungsspitzen / Piercing Tool | 07 345 585 001 |
| MagNA Pure 24 Piercing Tool                       | Piercing Tool                                         | 07 534 205 001 |
| MagNA Pure Tip 1.000 µL                           | 1.000-µl-Pipettierspitze                              | 06 241 620 001 |
| MagNA Pure Tip Waste Tray                         | Pipettierspitzenabfall-Tray                           | 08 185 492 001 |
| MagNA Pure Tube 2.0 mL                            | 2,0-ml-Röhrchen                                       | 07 857 551 001 |
| MagNA Pure Sealing Foil                           | Versiegelungsfolie                                    | 06 241 638 001 |
| FrameStrip® with flat caps-Low Profile            | 8er-Tubestreifen (niedrig)<br>8er-Capstreifen         | 07 345 593 001 |
| FrameStrip® with flat caps-High Profile           | 8er-Tubestreifen (hoch)<br>8er-Capstreifen            | 07 652 275 001 |

- Standardlaborausrüstung: Pipetten und nukleasefreie, aerosolbeständige Pipettierspitzen.

## 7.2 Optionale Materialien

| Material                                                  | Zweck                                                                                              | Bestellnummer                                                                                    |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MagNA Pure 24 MGP Set                                     | Für zusätzliche Isolierungen von Nukleinsäuren aus kleinen, großen und extra-großen Probenolumina. | 07 806 361 001                                                                                   |
| MagNA Pure cfNA Buffer Set                                | Für die Isolierung zellfreier Nukleinsäuren aus Plasmaproben.                                      | 07 794 398 001                                                                                   |
| MagNA Pure External Lysis Buffer                          | Für externe Lyseprotokolle                                                                         | 06 374 913 001                                                                                   |
| MagNA Pure Bacterial Lysis Buffer                         | Für die Isolierung von Nukleinsäuren bakteriellen, fungalen oder viralen Ursprungs                 | 06 374 921 001                                                                                   |
| MagNA Pure DNA Tissue Lysis Buffer                        | Für die Isolierung von Nukleinsäuren aus frisch gefrorenem Gewebe                                  | 06 640 702 001                                                                                   |
| MagNA Pure FFPET Buffer Set                               | Für die Entparaffinierung und Lyse von Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe        | 08 447 144 001                                                                                   |
| Proteinase K, PCR-Qualität, Aktivität (+37 °C) ≥ 0,6 U/μl | Für die Zersetzung von Proteinen                                                                   | 03 115 828 001<br>03 115 844 001                                                                 |
| S.T.A.R. buffer (Stool Transport and Recovery Buffer)     | Für die Stabilisierung, den Transport und die Gewinnung von Nukleinsäuren aus Stuhlproben          | 03 335 208 001                                                                                   |
| MagNA Lyser Instrument                                    | Für die Homogenisierung von Gewebe                                                                 | 03 358 968 001<br>ab Serien-Nr.<br>SN 40467540<br>03 358 976 001<br>ab Serien-Nr.<br>SN 40405218 |
| MagNA Lyser Green Beads                                   | Für die Homogenisierung von Gewebe                                                                 | 03 358 941 001                                                                                   |

- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) zum Verdünnen des Probenmaterials und zur Vorbehandlung der Proben.

## 8. VERFAHREN

### 8.1 Aufreinigungsprotokolle

Die Nukleinsäuren werden mit unterschiedlichen Protokollen isoliert, die für die verschiedenen Probenmaterialien optimiert sind.

Ein bestimmtes Protokoll darf nur mit den dafür vorgesehenen Probenmaterialien ausgeführt werden. Die Isolierung von Nukleinsäuren aus anderen Probenmaterialien kann zu suboptimalen Ergebnissen führen. Ein unsachgemäßer Gebrauch kann zur Verklumpung und zum Verlust von magnetischen Glasparkeln, zur Kreuzkontamination der Proben oder sogar zur Beschädigung des Gerätes führen. Unterschiedliche Probenmaterialien dürfen nur in demselben Lauf verwendet werden, wenn dies in der Gebrauchsanweisung angegeben ist. Befolgen Sie stets die empfohlenen Verfahren für die Vorbehandlung.

| Protokollname                               | Zielsequenz                                                | Probenmaterial <sup>1)</sup>                                                                                                                                            | Elutionsvolumen [µl] <sup>2)</sup> |
|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Protokolle für kleine Probenvolumina</b> |                                                            |                                                                                                                                                                         |                                    |
| Pathogen 200 <sup>3)</sup>                  | Nukleinsäuren bakteriellen, fungalen und viralen Ursprungs | 200 µl Plasma, Serum, Vollblut, bronchoalveoläre Lavage (BAL), Nasen-/ Nasen-Rachen-Abstriche, Stuhl oder Urin. Bei einem Probenvolumen unter 200 µl mit PBS verdünnen. | 50, 100                            |
| Fast Pathogen 200 <sup>3), 5)</sup>         | Nukleinsäuren bakteriellen, fungalen und viralen Ursprungs | 200 µl Plasma, Serum, Vollblut, bronchoalveoläre Lavage (BAL), Nasen-/ Nasen-Rachen-Abstriche, Stuhl oder Urin. Bei einem Probenvolumen unter 200 µl mit PBS verdünnen. | 50, 100                            |
| External Lysis Pathogen 200                 | Nukleinsäuren bakteriellen, fungalen und viralen Ursprungs | 450 µl Lysat aus 200 µl Plasma, Serum oder Vollblut. Bei einem Probenvolumen unter 200 µl mit PBS verdünnen.                                                            | 50, 100                            |

| Protokollname                              | Ziel-sequenz                                               | Probenmaterial <sup>1)</sup>                                                                                                                                                                 | Elutionsvolumen [µl] <sup>2)</sup>                                   |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| hgDNA 200                                  | Genomische DNA                                             | 200 µl Vollblut (2 × 10 <sup>6</sup> Leukozyten), bis zu 5 × 10 <sup>5</sup> Zellen in Kultur, bis zu 5 mg frisch gefrorenes Gewebe. Bei einem Probenvolumen unter 200 µl mit PBS verdünnen. | 50, 100                                                              |
| hgDNA ds 200                               | Genomische DNA                                             | 200 µl Vollblut (2 × 10 <sup>6</sup> Leukozyten), bis zu 5 × 10 <sup>5</sup> Zellen in Kultur. Bei einem Probenvolumen unter 200 µl mit PBS verdünnen.                                       | 50, 100<br>③ Wird empfohlen, wenn doppelsträngige DNA benötigt wird. |
| Fast hgDNA 200 <sup>5)</sup>               | Genomische DNA                                             | 200 µl Vollblut (2 × 10 <sup>6</sup> Leukozyten), bis zu 5 × 10 <sup>5</sup> Zellen in Kultur. Bei einem Probenvolumen unter 200 µl mit PBS verdünnen.                                       | 50, 100                                                              |
| <b>Protokoll für FFPE-Gewebeproben</b>     |                                                            |                                                                                                                                                                                              |                                                                      |
| DNA FFPET 1000                             | Genomische DNA                                             | Bis zu 6 FFPE-Gewebeschnitte (je 4 oder 5 µm Dicke)                                                                                                                                          | 50, 100                                                              |
| <b>Protokolle für große Probenvolumina</b> |                                                            |                                                                                                                                                                                              |                                                                      |
| Pathogen 1000 <sup>3)</sup>                | Nukleinsäuren bakteriellen, fungalen und viralen Ursprungs | 500 oder 1.000 µl Plasma, Serum, Vollblut, bronchoalveoläre Lavage (BAL), Nasen-/ Nasen-Rachen-Abstriche, Stuhl oder Urin.                                                                   | 50, 100                                                              |
| External Lysis Pathogen 500                | Nukleinsäuren bakteriellen, fungalen und viralen Ursprungs | 1.450 µl Lysat aus 500 µl Plasma, Serum oder Vollblut. Bei einem Probenvolumen unter 500 µl mit PBS verdünnen.                                                                               | 50, 100                                                              |

| Protokollname                                    | Ziel-sequenz                                             | Probenmaterial <sup>1)</sup>                                                                                                                           | Elutionsvolumen [µl] <sup>2)</sup>                                                                                                     |
|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| hgDNA 1000                                       | Genomische DNA                                           | 500 µl Vollblut (5 × 10 <sup>6</sup> Leukozyten) oder 1.000 µl Vollblut (1 × 10 <sup>7</sup> Leukozyten), bis zu 1 × 10 <sup>6</sup> Zellen in Kultur. | 100, 200<br>③ Bei hohen Leistungsanforderungen oder bei Verwendung von Zellen in Kultur mit einem hohen DNA-Gehalt in 200 µl eluieren. |
| <b>Protokolle für extra-große Probenvolumina</b> |                                                          |                                                                                                                                                        |                                                                                                                                        |
| cfNA ss 2000                                     | Zellfreie Nukleinsäure, überwiegend einzelsträngige DNA. | 2000 µl Plasma <sup>4)</sup>                                                                                                                           | 50, 100                                                                                                                                |
| cfNA ss 4000                                     | Zellfreie Nukleinsäure, überwiegend einzelsträngige DNA. | 4.000 µl Plasma <sup>4)</sup>                                                                                                                          | 50, 100                                                                                                                                |
| cfNA ds 2000                                     | Zellfreie Nukleinsäure, überwiegend doppelsträngige DNA. | 2000 µl Plasma <sup>4)</sup>                                                                                                                           | 100, 150, 200<br>Für die Elution überwiegend doppelsträngiger DNA.                                                                     |
| cfNA ds 4000                                     | Zellfreie Nukleinsäure, überwiegend doppelsträngige DNA. | 4.000 µl Plasma <sup>4)</sup>                                                                                                                          | 100, 150, 200<br>③ Für die Elution überwiegend doppelsträngiger DNA.                                                                   |

| Protokollname   | Ziel-sequenz                                             | Probenmaterial <sup>1)</sup>  | Elutionsvolumen [µl] <sup>2)</sup>                                                                                                                                                                                                                                    |
|-----------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| cfNA ds 4000 hp | Zellfreie Nukleinsäure, überwiegend doppelsträngige DNA. | 4.000 µl Plasma <sup>4)</sup> | 60, 150<br> Für die Elution überwiegend doppelsträngiger DNA. Wird empfohlen, wenn höhere Anforderungen an die Leistung bestehen, z. B. hinsichtlich der Ausbeute und/oder Reinheit. |

<sup>1)</sup>Das manuell in die Probenbearbeitungsplatten pipettierte Proben-/Lysatvolumen muss genau mit dem in den globalen Laufeinstellungen festgelegten Probenvolumen übereinstimmen.

<sup>2)</sup>Die Konzentration der Nukleinsäure im Eluat und somit die Sensitivität der Downstream-Applikationen kann durch die Wahl eines niedrigen Elutionsvolumens erhöht werden. Die Wirksamkeit der Elution und die Nukleinsäure-Gesamtausbeute ist in diesem Fall jedoch u. U. niedriger als bei der Verwendung eines höheren Elutionsvolumens.

<sup>3)</sup>Pathogen-Protokolle dienen zur Isolierung von bakteriellen, fungalen und viralen Nukleinsäuren aus verschiedenen Probenmaterialien menschlichen Ursprungs. Diese Protokolle können direkt für die angegebenen Probenvolumina verwendet werden oder die angegebenen Volumina können das Lysat beinhalten.

<sup>4)</sup>Plasma aus Cell-free DNA, K2-EDTA oder Streck Cell Free DNA BCT Blutentnahmeröhrchen von Roche. Es muss eine Vorbehandlung mit dem MagNA Pure cfNA Buffer Set durchgeführt werden.

<sup>5)</sup>Die Fast-Protokolle sind ausschließlich für die Isolierung von Nukleinsäuren aus 8 Proben vorgesehen.

 Ein Prüfprotokoll des Gerätes steht für Fehlerbehebungsmaßnahmen zur Verfügung. Weitere Informationen hierzu erhalten Sie beim Kundendienst von Roche Diagnostics.

## 8.2 Probenmaterialien und Vorbehandlungsverfahren

Die Proben dürfen nicht in einem größerem Volumen verarbeitet werden als dem, für das das ausgewählte Aufreinigungsprotokoll vorgesehen ist, um bei Downstream-Applikationen optimale Ergebnisse zu erzielen, insbesondere bei Real-Time-PCR-Tests, z.B. unter Verwendung des LightCycler® Analysesystems. Ansonsten wird der Isolierungs- und Aufreinigungsprozess beeinträchtigt oder es kann zu Verklumpungen oder Verlusten von magnetischen Glaspartikeln, zur Kreuzkontamination der Proben oder sogar zur Beschädigung des Gerätes kommen.

### I. Vollblut

Verwenden Sie frisches oder gefrorenes Vollblut ohne Vorbehandlung. Das Probenmaterial muss vollständig homogenisiert werden.

- ⚠ Wenn die Leukozytenzahl über  $1 \times 10^7$  Blutzellen/ml liegt, verdünnen Sie das Vollblut vor dem Gebrauch mit PBS, um eine Verklumpung der magnetischen Glaspartikel zu vermeiden.
- ⚠ Stellen Sie sicher, dass sich in den antikoagulierten Vollblutproben keine Gerinnsel gebildet haben.

### II. Plasma/Serum

Verwenden Sie frisches oder gefrorenes Plasma oder Serum ohne Vorbehandlung. Eine Ausnahme bilden nur die cfNA-Protokolle.

- ⚠ Wenn sich Präzipitate gebildet haben, zentrifugieren Sie 5 bis 10 Minuten lang bei  $1.900 \times g$ . Dieser Zentrifugierungsschritt wird für cfNA-Protokolle empfohlen. Verwenden Sie als Probe nur den Überstand.

### III. Lysate für externe Lyseprotokolle

Vollblut, Plasma oder Serum in einer Mischung mit MagNA Pure External Lysis Buffer.

- Ⓢ Vor der Verwendung muss der Lyse-/Bindungspuffer auf eine Temperatur von +15 bis +25 °C gebracht werden.

Geben Sie 200 oder 500 µl Vollblut, Plasma oder Serum zu 250 oder 950 µl MagNA Pure External Lysis Buffer zu.

| Protokoll                 | External Lysis Pathogen 200 | External Lysis Pathogen 500 |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Probe [µl]                | 200                         | 500                         |
| Lysis/Binding Buffer [µl] | 250                         | 950                         |
| Gesamtlysat-volumen [µl]  | 450                         | 1.450                       |

Überführen Sie das gesamte Lysatvolumen in die Probenbearbeitungsplatte.

#### IV. Verschiedene Probenmaterialien und Lysate für Pathogen-Protokolle

Eine Lyse der Pathogene kann in vielen verschiedenen Probenmaterialien menschlichen Ursprungs durchgeführt werden.

Die folgenden Probenmaterialien sind u. U. für die Protokolle Pathogen 200, Fast Pathogen 200 und Pathogen 1000 geeignet:

Urin, bronchoalveoläre Lavage (BAL), Abstriche, Stuhl, Vollblut, Plasma, Serum und Bakterienkulturen.

- ⚠️ Aufgrund der großen Vielfalt der möglichen Probenmaterialien existiert kein universell anwendbares Verfahren. Die Vorbehandlung von zähflüssigen Proben (BAL, Stuhl usw.) für die Nukleinsäure-Isolierung richtet sich nach der Art des Probenmaterials, der Viskosität der Probe sowie nach Art und Gehalt der Partikel.
- ⚠️ Alle Probenmaterialien, für die dieses Probenvorbereitungsverfahren in Verbindung mit einem *in-vitro*-diagnostischen Downstream-Nukleinsäuretest zum Einsatz kommt, sind im Hinblick auf die einzelnen IVD-Parameter zu evaluieren.
- ⚠️ Für sehr viskose, zellreiche Proben wie Stuhl darf kein Probenaufgabevolumen von 1.000 µl verwendet werden.
- 🔍 Je nach Viskosität der Probe, Partikelart und -gehalt können die Proben ohne Vorbehandlung verwendet werden.

#### Lyseprotokoll unter Verwendung von MagNA Pure Bacterial Lysis Buffer (BLB)

##### ① Verflüssigung

- 🔍 Eine Verflüssigung wird für sehr viskose Probenmaterialien empfohlen und ist für die Isolierung von Nukleinsäuren aus bronchoalveolärer Lavage obligatorisch.
  - Setzen Sie eine frische DTT (Dithiothreitol)-Stammlösung an (z.B. 5-fache Konz. = 0,75 %).
  - Stellen Sie die endgültige DTT-Konzentration der Probe auf 0,15 % ein, indem Sie DTT-Stammlösung zugeben.
  - Inkubieren Sie die Probe und schütteln Sie sie dabei 30 Minuten lang bei +37 °C und 850 U/Min., bis sie sich leicht pipettieren lässt.

##### ② Zugabe von Bacterial Lysis Buffer (BLB)

Überführen Sie ein geeignetes Probenvolumen in ein frisches 1,5-ml-Röhrchen.

| Protokoll          | Pathogen 200 | Pathogen 1000 |
|--------------------|--------------|---------------|
| Probenvolumen [µl] | 100          | 250           |
|                    |              | 500           |

- ③ Vermischen Sie geeignete BLB- und Proteinase K-Volumina:

| Protokoll                                 | Pathogen 200 | Pathogen 1000 |            |
|-------------------------------------------|--------------|---------------|------------|
| BLB [ $\mu$ l]                            | 100          | 250           | 500        |
| Proteinase K [ $\mu$ l]                   | 20           | 50            | 100        |
| <b>BLB/PK-Gemisch [<math>\mu</math>l]</b> | <b>120</b>   | <b>300</b>    | <b>600</b> |

- Geben Sie dieses Gemisch in das 1,5-ml-Röhrchen mit der Probe und mischen Sie es gründlich auf einem Vortexer.
- Führen Sie die Inkubation durch, während das Gemisch 10 Minuten lang bei 450 U/Min. und +65 °C geschüttelt wird.

- ④ **Inkubation bei +95 °C (bei komplexen Probenmaterialien)**

Inkubieren Sie die Probe bei +95 °C, um pathogene Organismen zu inaktivieren und die Zell-Lyse für einige Bakterienarten in komplexen Probenmaterialien, wie z. B. Stuhlproben, zu verbessern. Um ein Aus-treten von Flüssigkeiten zu vermeiden, verschließen Sie die Röhrchen mit Schraubverschlüssen.

- Inkubieren Sie die Proben 10 Minuten lang bei +95 °C.
- ⌚ Bei der Isolierung von RNA wird die Inkubation bei +95 °C ausge-lassen, da diese die Integrität der RNA beeinträchtigen könnte.
- Kühlen Sie die Proben auf Eis. Zentrifugieren Sie kurz, damit sich das gesamte Probenvolumen unten im Röhrchen absetzt.

- ⑤ Überführen Sie das angegebene Lysatvolumen in die Probenbearbei-tungsplatte.

| Protokoll                                                      | Pathogen 200 | Pathogen 1000 |       |
|----------------------------------------------------------------|--------------|---------------|-------|
| In die Probenbearbei-tungsplatte pipettiertes Lysat [ $\mu$ l] | 200          | 500           | 1.000 |

### Vorbehandlung von Stuhlproben

- ① Suspendieren Sie eine erbsengroße Menge der Stuhlprobe in 550  $\mu$ l PBS.
- ⌚ Zentrifugieren Sie 5 Sekunden lang bei 500  $\times g$ , um eine Verstop-fung der Pipettierspitzen mit festen Partikeln zu vermeiden.
  - ⌚ Für die Isolierung viraler RNA können Sie zur Suspendierung der Stuhlproben alternativ auch eine 1:1-Mischung aus PBS und STAR-Puffer verwenden. Dadurch kann eine mögliche Inhibition in Downstream-Applikationen vermieden werden.

- ② Überführen Sie ein geeignetes Volumen Überstand in ein frisches 1,5-ml-Röhrchen.

| Protokoll      | Pathogen 200 | Pathogen 1000 |
|----------------|--------------|---------------|
| Überstand [µl] | 100          | 250           |

- ③ Vermischen Sie geeignete BLB- und Proteinase K-Volumina:

| Protokoll                  | Pathogen 200 | Pathogen 1000 |
|----------------------------|--------------|---------------|
| BLB [µl]                   | 100          | 250           |
| Proteinase K [µl]          | 20           | 50            |
| <b>BLB/PK-Gemisch [µl]</b> | <b>120</b>   | <b>300</b>    |

- Geben Sie dieses Gemisch in das 1,5-ml-Röhrchen mit der Probe und mischen Sie es gründlich auf einem Vortexer.

- ④ Inkubieren Sie die Probe 10 Minuten lang bei +65 °C und schütteln Sie sie währenddessen mit 850 U/Min. Inkubieren Sie dann 10 Minuten lang bei +95 °C.

⚠ Bei der Isolierung von RNA wird die Inkubation bei +95 °C ausgelassen, da diese die Integrität der RNA beeinträchtigen könnte.

- ⑤ Überführen Sie das angegebene Lysatvolumen in die Probenbearbeitungsplatte.

| Protokoll                                               | Pathogen 200 | Pathogen 1000 |
|---------------------------------------------------------|--------------|---------------|
| In die Probenbearbeitungsplatte pipettiertes Lysat [µl] | 200          | 500           |

### Vorbehandlung von Abstrichproben

- ① Suspensieren Sie einen trockenen Abstrichtupfer in einem geeigneten Volumen eines Gemischs aus BLB und Proteinase K.

| Protokoll                  | Pathogen 200 | Pathogen 1000    |
|----------------------------|--------------|------------------|
| BLB [µl]                   | 200*         | 500* 1.000*      |
| Proteinase K [µl]          | 20           | 50 100           |
| <b>BLB/PK-Gemisch [µl]</b> | <b>220</b>   | <b>550 1.100</b> |

\* Verwenden Sie bei Abstrichtupfern in Transportmedien die Hälfte des BLB-Volumens. Die andere Hälfte sollte dabei aus der Probe im Transportmedium bestehen. Das Endvolumen muss dem in der Tabelle angegebenen Volumen entsprechen. Vermischen Sie den BLB mit dem Gesamtvolumen an Proteinase K und geben Sie dieses Gemisch zur Probe im Transportmedium hinzu.

- ② Drücken Sie den Abstrichtupfer aus und werfen Sie ihn.
- ③ Mischen Sie gründlich auf einem Vortexer. Inkubieren Sie die flüssige Probe 10 Minuten lang bei +65 °C und schütteln Sie sie dabei mit 450 U/Min. Inkubieren Sie dann 10 Minuten lang bei +95 °C.  
 ⚠ Bei der Isolierung von RNA wird die Inkubation bei +95 °C ausgelassen, da diese die Integrität der RNA beeinträchtigen könnte.
- ④ Kühlen Sie die Proben auf Eis. Zentrifugieren Sie kurz, damit sich das gesamte Probenvolumen unten im Röhrchen absetzt.
- ⑤ Überführen Sie das angegebene Lysatvolumen in die Probenbearbeitungsplatte.

| Protokoll                                               | Pathogen 200 | Pathogen 1000  |
|---------------------------------------------------------|--------------|----------------|
| In die Probenbearbeitungsplatte pipettiertes Lysat [µl] | 200          | 500 oder 1.000 |

**V. Zellen in Kultur** Verwenden Sie zur Isolierung von Nukleinsäuren mit den Protokollen hgDNA 200 und hgDNA 1000 Sie Zellen in Kultur, die in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) resuspendiert wurden.

- ① Zur Isolierung von DNA aus Zellen, die in Suspension kultiviert wurden, zentrifugieren Sie die Zellen in Kultur vorsichtig 5 Minuten lang bei 300 × g. Waschen Sie das Zellpellet bei Bedarf mit PBS.  
 ⓘ Das Zellpellet kann bei -15 bis -25 °C mehrere Wochen lang gelagert werden.
- ② Entfernen Sie das Kulturmedium (oder die PBS) und resuspendieren Sie die Zellen in kalter PBS, indem Sie pipettieren oder das Röhrchen schütteln, bis das Zellpellet resuspendiert ist.
- ③ Überführen Sie ein geeignetes Volumen der Suspension in die Probenbearbeitungsplatte.  
 ⚠ Für das Protokoll hgDNA 200 dürfen maximal  $5 \times 10^5$  Zellen/200 µl verwendet werden. Für das Protokoll hgDNA 1000 dürfen maximal  $1 \times 10^6$  Zellen verwendet werden. Jede Abweichung von diesen Werten kann die Leistung beeinträchtigen.

**VI. Frisch  
gefrorenes  
Gewebe**

Verwenden Sie zur Isolierung von Nukleinsäuren mit dem Protokoll hgDNA 200 maximal 5 mg homogenisiertes frisch gefrorenes Gewebe.

***Gewebehomogenisierung mittels Proteinase-K-Verdau***

- ① Geben Sie maximal 5 mg Gewebe in ein 1,5-ml-Röhrchen.
- ② Geben Sie 180 µl MagNA Pure DNA Tissue Lysis Buffer und 20 µl Proteinase K zur Gewebeprobe hinzu.
- ③ Inkubieren Sie sie bei +55 °C, bis das Gewebe vollständig aufgelöst ist (in der Regel dauert dies 3 Stunden bis zu einer Nacht).  
 ⓘ Diese Homogenisierungsmethode führt zu einer hohen DNA-Ausbeute und schont die DNA.
- ④ Überführen Sie ein geeignetes Lysatvolumen in die Probenbearbeitungsplatte.
- ⑤ Das Lysat kann bei -80 bis -20 °C gelagert werden, wenn eine sofortige Aufreinigung nicht gewünscht ist.

***Gewebehomogenisierung mit dem MagNA Lyser Instrument***

- ① Überführen Sie maximal 5 mg Gewebe in ein Röhrchen mit MagNA Lyser Green Beads.
- ② Geben Sie 200 µl MagNA Pure DNA Tissue Lysis Buffer hinzu.
- ③ Homogenisieren Sie das Gewebe 30 bis 40 Sekunden lang im MagNA Lyser Instrument. Wenn danach noch keine vollständige Homogenisierung erzielt wurde, wiederholen Sie diesen Schritt. Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch des MagNA Lyser Instruments.  
 ⓘ Diese Methode ist zwar schnell, die DNA kann jedoch wegen der hohen Scherkräfte teilweise fragmentiert werden.
- ④ Überführen Sie ein geeignetes Lysatvolumen in die Probenbearbeitungsplatte.

## VII. Formalin-fixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe

Reinigen Sie die Nukleinsäuren von bis zu 6 FFPE-Gewebeschnitten von 4 oder 5 µm Dicke mit dem MagNA Pure FFPET Buffer Set auf. Dies entspricht einer Höchstmenge von 6 mm<sup>3</sup> Gewebe.

- ⚠ Verwenden Sie nicht mehr als die angegebene FFPE-Gewebeprobemenge, da anderenfalls die Nukleinsäureaufreinigung beeinträchtigt wird. Ausbeute und Qualität der isolierten Nukleinsäuren hängen unmittelbar von der Gewebeart, dem Probenalter sowie dem verwendeten Fixierungsprotokoll ab.
- ⚠ In automatisierten Arbeitsabläufen dürfen niemals angebrochene Reagenzflaschen aus manuellen Arbeitsabläufen verwendet werden.

### ***Proben- und Reagenzvorbereitung für das DNA FFPET 1000-Protokoll***

- ① Geben Sie für jede Isolierung bis zu 6 FFPE-Gewebeschnitte von 4 oder 5 µm Dicke ( $\leq 6 \text{ mm}^3$  Gewebe) in den Boden eines 2,0-ml-Röhrchens.
  - ⚠ Entfernen Sie vor dem Gewinnen von FFPE-Gewebeschnitten überschüssiges Paraffin vom FFPE-Gewebeblock oder -Objekträger.
  - ⚠ Um möglichst viel Nukleinsäure isolieren zu können, müssen sich die FFPE-Gewebeprobe vor der Zentrifugierung so nah wie möglich am Boden des 2,0-ml-Röhrchens befinden.
- ② Zentrifugieren Sie das 2,0-ml-Röhrchen 30 Sekunden lang bei  $5.000 \times g$  und +15 bis +25 °C, damit sich das Probenmaterial am Röhrchenboden sammelt.
- ③ Setzen Sie die zentrifugierten Probenröhrchen auf die 2,0-ml-Adapter, die sich bereits im Probenrack befinden.
  - ⚠ Platzieren Sie die Probenröhrchen-Adapter mit den 2,0-ml-Röhrchen richtig im Probenrack.
 Laden Sie das Probenrack in den Probenrack-Einschub des Gerätes und erstellen Sie anschließend die Anforderung.
- ④ Bereiten Sie das Deparaffinization Reagent vor:  
Geben Sie unmittelbar vor der Verwendung 25 ml des im MagNA Pure FFPET Buffer Set enthaltenen Deparaffinization Reagent in eine der leeren 25-ml-Reagenzflaschen mit Barcode.

- 
- ⑤ Beladen Sie die in der Software markierten Gerätestationen mit dem erforderlichen Bedarfsmaterial.  
Setzen Sie zum Schluss folgende Gefäße in das Reagenzrack ein:
- Deparaffinization Reagent in barcodierter 25-ml-Reagenzflasche
  - Reagenzflasche(n) mit Lysis Buffer
  - Reagenzflasche(n) mit Isopropanol
  - Im Vortexer gemischte MGP-Röhrchen
- ⚠ Es dürfen nur geöffnete Reagenzflaschen und MGP-Röhrchen geladen werden.
- ⚠ Die Bildung von Schaum oder Luftblasen in den Reagenzien des FFPET-Puffersets ist zu vermeiden. Haben sich Luftblasen gebildet, zerstechen Sie diese mit einer Pipettierspitze.
- ⚠ Angebrochene Reagenzflaschen dürfen nur dann verwendet werden, wenn diese aus einem automatisierten Arbeitsablauf auf **demselben** Gerät stammen. Mit der Software wird das Inventar für jedes Gerät mit Hilfe der Reagenzbarcodes überwacht. Dabei werden angebrochene Reagenzflaschen erkannt, um im nächsten Lauf eine optimale Handhabung zu gewährleisten. Die Haltbarkeit der Reagenzflaschen im Gerät beträgt 16 Stunden. Nach der ersten Verwendung sind die Reagenzien 28 Tage lang haltbar.
- Überprüfen Sie das gesamte Bedarfsmaterial und starten Sie anschließend den Lauf.
- 
- ⑥ Entladen Sie nach Abschluss des Laufs das Gerät gemäß der Anleitung in der Benutzerunterstützung. Verschließen Sie alle Reagenzflaschen, die auf demselben Gerät weiterverwendet werden sollen, sofort nach der Verwendung mit den zugehörigen Verschlüssen und lagern Sie sie gemäß den Angaben in der Gebrauchsanweisung.
- 

- ⚠ Gelegentlich können sich lichtdurchlässige/gefärbte Eluate bilden, die für Downstream-Applikationen verwendet werden können.
- ⚠ Bedenken Sie bei der Entsorgung von Abfällen, dass die 2,0-ml-Probenröhrchen Reagenzien des FFPET-Puffersets enthalten.

## VIII. Plasma für zellfreie Nukleinsäuren

Verwenden Sie zur Isolierung zellfreier Nukleinsäuren (cfNA) das MagNA Pure cfNA Buffer Set.

- ⑤ Zentrifugieren Sie die Proben vor der Aufreinigung der zellfreien Nukleinsäuren 5 bis 10 Minuten lang bei  $1.000$  bis  $1.900 \times g$ . Achten Sie darauf, dass das Pellet oder Teile davon nicht übertragen werden.
- ⚠ Die Bildung von Schaum bzw. Blasen ist bei allen Pipettierschritten zu vermeiden.

- ① Geben Sie ein geeignetes Volumen Proteinase K in ein frisches Probenröhrchen, das für diese Applikation getestet wurde (Sarstedt-Röhrchen 55.466 und Sarstedt-Röhrchen 55.495). Geben Sie die Probe in das Röhrchen mit Proteinase K, mischen Sie vorsichtig und inkubieren Sie 20 Minuten lang bei +37 °C.

| Protokoll          | cfNA ss 2000<br>cfNA ds 2000 | cfNA ss 4000<br>cfNA ds 4000 |
|--------------------|------------------------------|------------------------------|
| Proteinase K [µl]  | 200                          | 400                          |
| Probenvolumen [µl] | 2.000                        | 4.000                        |

- ② Setzen Sie je nach Anzahl der zu bearbeitenden Proben ein geeignetes Volumen von cfNA-Puffergemisch an: pipettieren Sie Cell-Free Nucleic Acid Enhancement Buffer (CELB) in einen Behälter geeigneter Größe und geben Sie Isopropanol (IPA) hinzu. Verschließen Sie den Behälter und mischen Sie durch vorsichtiges Umschwenken. Die Lösung ist maximal 2 Stunden lang stabil.

| Protokoll                                             | cfNA ss 2000<br>cfNA ds 2000 | cfNA ss 4000<br>cfNA ds 4000 |
|-------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| CELB [µl]                                             | 1.750                        | 3.500                        |
| IPA [µl]                                              | 300                          | 600                          |
| <b>cfNA-Puffer-<br/>gemisch (CELB +<br/>IPA) [µl]</b> | 2.050                        | 4.100                        |

- ③ Geben Sie zu jeder Probe eine geeignete Menge cfNA-Puffergemisch hinzu:  
2.000 µl cfNA-Puffergemisch bei einer 2.000-µl-Probe bzw. 4.000 µl cfNA-Puffergemisch bei einer 4.000-µl-Probe. Mischen Sie gründlich, um eine homogene Mischung herzustellen, indem Sie die Flüssigkeit ca. 8-mal dispensieren und aspirieren.

⚠ Das Lysat darf nicht aufbewahrt werden.

- 🕒 Wenn sich Blasen bilden, können diese entfernt werden, indem sie in eine Pipettierspitze aspiriert werden. Halten Sie die Pipettierspitze dazu direkt über der Flüssigkeitsoberfläche in die Nähe der Seitenwand des Röhrchens. Blasen können auch dadurch entfernt werden, dass die Röhrchen verschlossen und 1 Minute lang bei 2.000 × g zentrifugiert werden.

- ④ Laden Sie die Röhrchen in das Probenrack. Laden Sie das Probenrack in das Gerät.

### 8.3 Isolierung

Das MagNA Pure 24 Instrument ist für die gleichzeitige Bearbeitung von bis zu 24 Proben vorgesehen. Detaillierte Informationen zur Bedienung des Gerätes finden Sie in der MagNA Pure 24 Benutzerunterstützung.

- ⚠ Die Validierung der Systemleistung für alle im Labor verwendeten Verfahren obliegt dem Benutzer.
- ⚠ Beim Mischen von Primärröhrchen, die Proben enthalten, ist darauf zu achten, dass vor dem Laden in das Gerät kein Schaum bzw. keine Blasen gebildet werden. Damit die Füllstanderkennung fehlerfrei funktioniert, sollten sich keine Tropfen an den Seitenwänden der Probenröhrchen befinden.
- ⚠ Alle Probenröhrchen müssen fest und ordnungsgemäß im Probenrack sitzen.
- ⚠ Wässriges Probenmaterial, wie z. B. Nukleinsäuren, die ohne biologischen Puffer in Wasser oder Flüssigkeiten aufgelöst sind, kann zu einer unzureichenden Aufreinigung führen. Bei wässrigem Probenmaterial stellen Sie durch Zugabe von 10 × PBS eine endgültige Konzentration von 1 × PBS ein.
- ⚠ Wenn die Reagenzkassetten bei Temperaturen unter +15 °C gelagert wurden, lassen Sie sie vor dem Gebrauch mindestens eine Stunde lang bei +15 bis +25 °C äquilibrieren.
- 🕒 In einem Aufreinigungslauf können zwei Reagenzkassetten der gleichen Charge oder unterschiedlicher Chargen verwendet werden.
- ⚠ Vergewissern Sie sich, dass alle Behälter vollständig in die Reagenzkassette eingesetzt wurden, bevor diese auf die Reagenzkassettenladestation gestellt werden.
- ⚠ Mischen Sie die MGP-Röhrchen 60 Sekunden lang einzeln im Vortexer, bevor Sie sie auf die Geräteplattform stellen. Laden Sie die geöffneten MGP-Röhrchen unmittelbar vor dem Start des Laufs vorsichtig auf die Geräteplattform. Wenn Flüssigkeit verschüttet wird, tauschen Sie die MGP-Röhrchen aus.
- ⚠ Alle in das Gerät geladenen Komponenten müssen geöffnet sein: die Röhrchen mit Proben, die MGP-Röhrchen, die internen Kontrollröhrchen, die Reagenzflaschen und die Ausgabe-Verbrauchsmaterialien.
- ⚠ Laden Sie das Reagenzrack vorsichtig in den Reagenzrack-Einschub, damit keine Reagenzien verschüttet werden.
- 🕒 Hinweis für Arbeitsabläufe mit FFPE-Gewebeproben: Geringe Mengen des Deparaffinization Reagent in den Probenbearbeitungsröhrchen beeinträchtigen die Aufreinigung nicht. Verbleibender Lysepuffer beeinträchtigt die Ergebnisse ebenfalls nicht.

## 8.4 Beenden eines Laufs

Entladen Sie nach Abschluss des Laufs die Ausgabe-Verbrauchsmaterialien, die die Eluate enthalten.

- ⌚ Nach Ende eines Laufs sollten keine Eluate länger als 2 Stunden im Gerät verbleiben, da anderenfalls die entsprechenden Ergebnisse mit Flags versehen werden.
- ⌚ Die Kühlung der Eluate wird beim Öffnen der Geräteabdeckung beendet.
- ⌚ Kleine Mengen von magnetischen Glasparkeln in den Ausgaberröhrchen bzw. Tubestreifen führen nicht zu einer Beeinträchtigung der PCR- bzw. RT-PCR-Tests auf LightCycler® Analysesystemen oder herkömmlichen Thermocyclern. Wenn die magnetischen Glasparkel entfernt werden sollen, stellen Sie die Ausgaberröhrchen bzw. Tubestreifen vor dem Entfernen des Eluates auf eine Magnetplatte.
- Die zulässige Zeit zur Aufbewahrung der Reagenzkassette im Gerät darf nicht überschritten werden. Entladen Sie die Reagenzkassette vorsichtig, um ein Verschütten von Flüssigkeit zu vermeiden. Versiegeln Sie die Reagenzkassette mit Versiegelungsfolie. Angebrochene Reagenzkassetten können bei +2 bis +8 °C in aufrechter Stellung für den späteren Gebrauch aufbewahrt werden.
- Fahren Sie unter Beachtung der vom Gerät angezeigten Anweisungen mit dem Entladen fort.
- ⚠ MGP-Röhrchen sind nur für den Einmalgebrauch vorgesehen und müssen nach jedem Lauf entsorgt werden, auch wenn sie nur teilweise verbraucht wurden.
- Entsorgen Sie Flüssig- und Festabfälle gemäß den örtlichen gesetzlichen Bestimmungen.
- Untersuchen Sie das Gerät gründlich auf ausgetretene Flüssigkeiten. Wenn Flüssigkeiten ausgetreten sind, reinigen Sie das Gerät gemäß den Anweisungen der MagNA Pure 24 Benutzerunterstützung.
- Reinigen und dekontaminieren Sie alle Zubehörteile gemäß den Anweisungen der MagNA Pure 24 Benutzerunterstützung.
- ⚠ Reagenzien, die Guanidinthiozyanat (Lysis Buffer) enthalten, dürfen nicht mit Natriumhypochloritlösung (Bleichlösung) oder Säuren in Kontakt kommen, da bei diesen Gemischen hochgradig giftige Gase entstehen können. Weitere Informationen zur Reinigung und Wartung finden Sie in der MagNA Pure 24 Benutzerunterstützung.

## 8.5 Qualitätskontrolle

⚠ Führen Sie stets geeignete Kontrollen mit.

Damit der gesamte Prozess von der Probenvorbereitung bis hin zur Analyse effektiv überwacht wird, sind folgende Kontrollen durchzuführen:

- Positivkontrolle. Hier wird Probenmaterial verwendet, das die Zielsequenz enthält.
- Negativkontrolle. Hier wird Probenmaterial verwendet, das die Zielsequenz nicht enthält.
- Interne Kontrolle (IC). Hier wird allen aufzureinigenden Proben eine festgelegte Menge einer Kontrollzielsequenz zugegeben. Die interne Kontrolle wird vor der Aufreinigung zugegeben, mit aufgereinigt und dann z. B. mit der jeweiligen Zielsequenz in der gleichen PCR-Reaktion amplifiziert. Bei Applikationen, bei denen die Gefahr falsch-negativer Ergebnisse besteht, ist die Verwendung einer geeigneten internen Kontrolle obligatorisch.

### Interne Kontrollen

Während des Aufreinigungslaufs kann jeder Probe vom Gerät automatisch eine interne Kontrolle (IC) zugegeben werden. Das Volumen der internen Kontrolle ist auf

20 µl pro Probe festgelegt. Es können 2 verschiedene interne Kontrollen pro Lauf geladen werden; es kann jedoch nur eine interne Kontrolle zu jeder Probe hinzugegeben werden. Um diese Funktion zu verwenden, wählen Sie in den globalen Laufeinstellungen die interne Kontrolle aus. Die geeignete Menge der internen Kontrolle wird von der Software berechnet und auf dem Bildschirm *Overview* in den Laufeinstellungen angezeigt. Geben Sie einem 2-ml-Röhrchen mit Barcode das angegebene Volumen der internen Kontrolle zu und laden Sie die Röhrchen in die entsprechenden Positionen auf dem Reagenzrack.

- Ⓢ Das erforderliche Volumen an interner Kontrolle ist infolge mechanischer Beschränkungen größer als das Produkt aus der Anzahl der Proben (n) und 20 µl (d. h.  $n \times 20 \mu\text{l}$ ).
- ⚠ Geben Sie die interne Kontrolle bei cfNA-Protokollen (d.h. 2.000 µl und 4.000 µl der Ursprungsprobe) manuell zum vorbereiteten Lysat zu. Beachten Sie, dass die Funktion für die interne Kontrolle im Gerät zwar verfügbar, nicht jedoch aktiviert ist.
- ⚠ Bei FFPET-Protokollen können keine internen Kontrollen vom Gerät hinzugegeben werden.

## 9. GRENZEN DER METHODE UND STÖREINFLÜSSE

1. Das MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit wurde ausschließlich für den Gebrauch mit dem MagNA Pure 24 System evaluiert.
2. Zuverlässige Ergebnisse werden nur erzielt, wenn alle Anweisungen für Probenentnahme, Transport, Lagerung und Handhabung der Proben eingehalten werden.
3. Das MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit wurde ausschließlich für das Probenmaterial validiert, das in dieser Gebrauchsanweisung angegeben ist. Die Aufreinigung von Nukleinsäuren aus anderen Probenmaterialien kann zu suboptimalen Ergebnissen führen.
4. Die Protokolle dürfen jeweils nur in Verbindung mit den dafür vorgesehenen Probenmaterialien verwendet werden. Jede Abweichung von diesen Werten kann die Leistung beeinträchtigen.
5. Dieses Produkt darf nur von Labormitarbeitern verwendet werden, die in der Isolierung von Nukleinsäuren geschult wurden. Jede IVD-Applikation, für die dieses Probenvorbereitungsverfahren in Verbindung mit einem *in-vitro*-diagnostischen Downstream-Nukleinsäuretest zum Einsatz kommt, ist im Hinblick auf die einzelnen IVD-Parameter zu validieren.
6. Um das Risiko einer Beeinträchtigung der Ergebnisse auf ein Minimum zu beschränken, müssen geeignete Kontrollen für Downstream-Applikationen verwendet werden.
7. Die Lagerungsbedingungen (Temperatur, Zeiten) für Proben, Lysate, Zellkulturpellets und Eluate sind hinsichtlich der einzelnen IVD-Parameter zu validieren.
8. Die Leistungsdaten sind insbesondere in Bezug auf Downstream-Applikationen vom Benutzer zu validieren. Bei der Auswertung der Ergebnisse müssen alle relevanten klinischen und labortechnischen Daten berücksichtigt werden. Da sich die Analytkonzentrationen von Probenmaterial zu Probenmaterial stark unterscheiden können, sollten vor dem Beginn der Routine Untersuchungen von Kreuzkontaminationen durchgeführt werden, z. B. anhand so genannter Schachbrettmuster-Assays (hoch positive Proben direkt neben negativen Proben).
9. Aufgrund der naturbedingten Unterschiede zwischen den Technologien wird empfohlen, dass der Benutzer vor dem Wechsel von einer Technologie zur anderen Korrelationsstudien im Labor durchführt, um die dadurch bedingten Unterschiede zu qualifizieren. Dabei sollten die laboreigenen Richtlinien bzw. Verfahren befolgt werden.
10. Der Einfluss von Störsubstanzen wurde anhand einer Verdünnungsreihe untersucht, die folgende häufig anzutreffende Substanzen in steigenden Konzentrationen enthielt: humanes Hämoglobin, Bilirubin und Lipide. Die Auswertung erfolgte mit dem Protokoll Pathogen 200.

## 10. ZUSATZINFORMATIONEN

### 10.1 Symbole

In dieser Dokumentation und auf diesem Produkt werden die folgenden Symbole verwendet:

| Symbol                                                                              | Beschreibung                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
|    | Wichtiger Hinweis                                                        |
|    | Hinweis                                                                  |
|    | <i>In-vitro</i> -Dagnostikum.                                            |
|    | Das Reagenz erfüllt die Anforderungen der IVDR-Verordnung (EU) 2017/746. |
|    | Bestellnummer                                                            |
|    | Globale Artikelnummer GTIN                                               |
|    | Einmalige Produktkennung                                                 |
|    | Chargenbezeichnung                                                       |
|    | Verwendbar bis                                                           |
|    | Herstellungsdatum                                                        |
|    | Inhalt des Kits                                                          |
|    | Temperaturbegrenzung                                                     |
|    | Gebrauchsanweisung beachten                                              |
|    | Vertrieb durch                                                           |
|    | Hersteller                                                               |
|   | Bevollmächtigter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft              |
|  | Importeur                                                                |

### 10.2 Änderungen gegenüber der Vorversion

- Aktualisiert zur Umsetzung der Anforderungen der IVD-Verordnung (EU) 2017/746.
- Optionale Kits aktualisiert.

## 11. MARKEN

MAGNA PURE, MAGNA LYSER und LIGHTCYCLER sind Marken von Roche.  
Andere Produktnamen und Marken sind Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.

## 12. REGULATORISCHER HINWEIS/HAFTUNGSAUSSCHLUSS

*In-vitro*-Diagnostikum.

## 13. LITERATUR

<sup>1)</sup> Center for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, letzte Überarbeitung: Dezember 2009.

<sup>2)</sup> Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4: Wayne, PA;CLSI, 2014.



Roche Molecular Systems, Inc.  
1080 US Highway 202 South  
Branchburg, NJ 08876 USA  
Manufactured in Germany



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Straße 116,  
68305 Mannheim, Germany  
+49 621 759 0



Distributed in USA by Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA  
US Customer Technical Support: 1-800-526-1247

