









Plasma-SeqSensei™

Leitfaden zur Probenvorbereitung

Manuelle Anleitung

April 2022

Bedeutung der Symbole			
	Hersteller		Vorsicht
	Gebrauchs- anweisung beachten		Vor Nässe schützen
	Temperatur- begrenzung		Grenze für Luftfeuchtigkeit

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung.....	3
1.1	BEABSICHTIGTER VERWENDUNGSZWECK	3
1.2	WORKFLOW	4
2	Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	5
2.1	NICHT MITGELIEFERTER MATERIALIEN.....	5
2.2	VERBRAUCHSMATERIAL.....	6
2.3	AUSRÜSTUNG	6
3	Lagerung und Handhabung.....	8
3.1	TRANSPORTBEDINGUNGEN.....	8
3.2	GENERELLE VORSICHTSMAßNAHMEN FÜR DIE HANDHABUNG	8
3.3	WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN.....	8
3.3.1	BESONDERE MAßNAHMEN	9
3.3.2	HANDHABUNG UND LAGERUNG.....	9
3.3.3	VORSICHTSMAßNAHMEN FÜR DIE REAGENZIEN-HANDHABUNG.....	10
3.3.4	SICHERHEIT UND KONTAMINATIONSVORBEUGUNG	10
4	Arbeitsablauf.....	13
4.1	BLUTENTNAHME UND -VERARBEITUNG.....	13
4.1.1	ANWEISUNGEN ZUR PLASMAAUFBEREITUNG (VOLLBLUT)	13
4.2	AUFREINIGUNG ZIRKULIERENDER DNA AUS PLASMA.....	15
4.3	PROBENQUANTIFIZIERUNG (QUBIT™)	22
5	Technische Unterstützung.....	24
6	Glossar und Begriffe	25
7	Literatur	26
8	Urheber- und Markenrechte.....	27

1 Einführung

Tumorzellen, bei denen es zu Apoptose, Nekrose oder metabolischer Sekretion kommt, geben kleine Mengen ihrer DNA in den Blutkreislauf ab. Die tumorspezifische Fraktion der zirkulierenden freien DNA (cfDNA) wird als zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA) bezeichnet und enthält die genetischen Informationen des Primärtumors und sogar der Metastasen. Zahlreiche Forschungsstudien und Versuche haben die klinische Anwendung des ctDNA-Profilings in unterschiedlichen Stadien der Krebsbehandlung demonstriert, darunter Therapieauswahl, Prognose und Überwachung (1).

Für den ctDNA-Nachweis sind verschiedene Technologien auf Basis von NGS verfügbar. Jedoch ist der Großteil aufgrund von Verzerrungen und Fehlern bei Sequenzierung und PCR für den Nachweis seltener Varianten nicht geeignet. Plasma-SeqSensei™ ist eine neuartige NGS-basierte Technologie, die eindeutige molekulare Kennungen (Unique Molecular Identifiers, UID) im Sequenzierungs-Workflow verwendet. Dadurch kommt es zu signifikant weniger Fehlern, was zu einer extrem hohen Sensitivität der PSS-Technologie führt (2).

Für eine hohe Sensitivität und beste Ergebnisse muss die Vorbereitung von cfDNA aus Blutproben gemäß dem geprüften Arbeitsablauf durchgeführt werden, der beschrieben wird in ► Kapitel 4 *Arbeitsablauf*, Seite 13/30.

1.1 Beabsichtigter Verwendungszweck

Der Zweck dieses Leitfadens zur Probenvorbereitung besteht darin, die Benutzer von PSS *Assay-Specific* Kits bei der Vorbereitung von cfDNA aus Blutproben zu unterstützen. Diese Anleitung enthält die Verfahren zur Plasmaaufreinigung, cfDNA-Aufreinigung sowie zur cfDNA-Quantifizierung mit Qubit™. Der Workflow beginnt mit Blutproben, die in Streck Blood Collection Tubes® zur Verwendung in Liquid Biopsy-Anwendungen, wie Plasma-SeqSensei™ *Assay-Specific* Kits und Next-Generation-Sequenzierungs (NGS)-Technologien entnommen wurden.

1.2 Workflow

Der Plasma-SeqSensei™ Workflow ist in mehrere Schritte unterteilt, die zu befolgen sind. Abbildung 1 beschreibt dieses Verfahren und beinhaltet Schritte für die Probenvorbereitung und dient auch als Leitfaden für bestimmte Gebrauchsanweisungen (IFU), die von der Blutentnahme bis zum Erhalt der Sequenzierungsergebnisse zu befolgen sind.

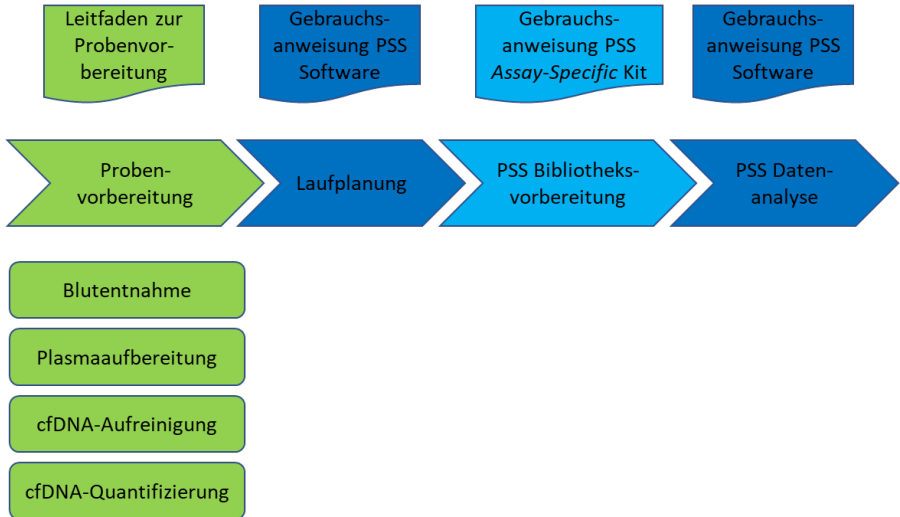


Abbildung 1: Plasma-SeqSensei™ Verfahren, einschließlich Workflowschritte, die im Leitfaden zur Probenvorbereitung und anderen erforderlichen Dokumenten beschrieben werden.

2 Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Für den in diesem Leitfaden beschriebenen Workflow benötigt man nur nicht im Lieferumfang enthaltenes Material, um Blutproben für die Verwendung von Plasma-SeqSensei™ *Assay-Specific* Kits vorzubereiten. Eine Beschreibung und Informationen zur Verwendung der Plasma-SeqSensei™ *Assay-Specific* Kit Komponenten finden Sie in der Plasma-SeqSensei™ *Assay-Specific* Kit Gebrauchsanweisung (www.sysmex-inostics.com).

2.1 Nicht mitgelieferte Materialien

Produkte, für die in Tabelle 1, Tabelle 2 und Tabelle 3 Angaben zum Hersteller/Anbieter und zur Artikelnummer aufgeführt sind, sind für den Assay essenziell und dürfen nicht durch Produkte vergleichbarer Qualität und/oder Eigenschaften ersetzt werden.

Tabelle 1: Wesentliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien für die Plasma-SeqSensei™ Probenvorbereitung

Material	Produkte
Reagenzien und Kits	* QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit, QIAGEN, Nr. 55114
	Ethanol (EtOH) ≥ 99,8 %, p.a.
	2-Propanol ≥ 99,8 %, p.a.
	1X Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS), (pH 7,4 ±0,2 ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)
	* Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit, Thermo Fisher, Nr. Q33230 (100 Assays) oder Nr. Q33231 (500 Assays)
* Qubit™ Assay-Röhrchen, Thermo Fisher, Nr. Q32856	

* Essenzielle Komponenten; dürfen nicht durch Produkte vergleichbarer Qualität und/oder Eigenschaften ersetzt werden.

2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Für die Plasma-SeqSensei™ Probenvorbereitung erforderliches Verbrauchsmaterial

Laborausrüstung	Produkt
Gerät zur Blutentnahme	* Streck Cell-Free DNA Blood Collection Tubes®, Volumen von 10,0 ml, Streck Nr. 218996 für 6 Stück, Streck Nr. 218997 für 100 Stück
Pipettenspitzen/serologische Pipetten	Aerosolbeständige sterile Pipettenspitzen mit Filter, 10, 200, 1.000 µl
	Serologische sterile Pipette, 5, 10, 25 ml
Reaktionsgefäße	Röhrchen mit 50, 15, 2, 1,5 ml
	* LoBind® DNA-Röhrchen 1,5 ml, Eppendorf, Nr. 0030108051
	5-ml-Kryoröhrchen
Sicherheitsausrüstung	Schutzbrille
	Laborkittel, Ärmelschoner, Einmal-Überschuhe, Handschuhe
Verschiedenes	* 3-ml-Erweiterungsröhrchen für QIAvac Vakuumverteiler, Qiagen, Nr. 19587
	* VacConnectors (500) für QIAvac Vakuumverteiler, Qiagen, Nr. 19407

* Essenzielle Komponenten; dürfen nicht durch Produkte vergleichbarer Qualität und/oder Eigenschaften ersetzt werden.

2.3 Ausrüstung

Tabelle 3: Für die Plasma-SeqSensei™ Probenvorbereitung erforderliche Ausrüstung

Laborausrüstung	Produkt
Elektronische Instrumente	Zentrifuge für 1,5/2-ml-Röhrchen, bis zu 20.000 × g, Festwinkelrotor
	Zentrifuge für 15/50-ml-Röhrchen, bis zu 7.197 × g, Festwinkelrotor
	Zentrifuge zur Plasmaaufbereitung, bis zu 6.000 × g, Ausschwingrotor, mit niedriger Verlangsamungs-/ Beschleunigungsrampe, mit Adaptern für 15-ml-Röhrchen
	Adapter für Festwinkelrotor für 5-ml-Kryoröhrchen
	Mini-Zentrifuge, bis zu ≤ 2.000 × g

2 Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Laborausrüstung	Produkt
	Vortexer mit Einsätzen für Röhrrchen und 96-Well-Platten
	Thermometer
	Hitzeblock mit Einsätzen für 2-ml-Röhrrchen
	Gefrierschrank, -15 °C bis -30 °C
	Kühlschrank, 2 °C bis 8 °C
	Tiefkühlgerät, -70 °C bis -100 °C
	DNA-Werkbank/PCR-Kabinett
	Abzugshaube (dringend empfohlen)
	Sicherheitskabinetts der Klasse II für biologische Proben (dringend empfohlen)
	* Qiagen Connecting System
	* QIAvac 24 Plus System
	Vakuumpumpe (230 V, 50 Hz)
	* Qubit™ 3 oder 4 Fluorometer
Pipetten	Pipette 1.000 µl, 200 µl, 10 µl
	Pipette 5 bis 100 ml
Racks	Röhrrchenrack 50 ml, 15 ml, 1,5/2 ml
	Lagerboxen für den Gefrierschrank
Verschiedenes	Eiskübel
	Stoppuhr

* Essenzielle Komponenten; dürfen nicht durch Produkte vergleichbarer Qualität und/oder Eigenschaften ersetzt werden.

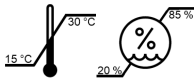
3 Lagerung und Handhabung

3.1 Transportbedingungen

Die Vorbereitung der Blutprobe zur Verwendung der Plasma-SeqSensei™ Assay-Specific Kits erfordert Produkte von Drittparteien, die nicht im Lieferumfang enthalten sind. Für optimale Transportbedingungen befolgen Sie die Anweisungen des Herstellers des nicht enthaltenen Materials.

Wichtig: Anders als in den Anweisungen des Herstellers angegeben, dürfen mit Streck Cell-Free DNA BCT® entnommene Proben nicht länger als 6 Tage gelagert werden.

3.2 Generelle Vorsichtsmaßnahmen für die Handhabung



Stellen Sie sicher, dass Temperatur und Luftfeuchtigkeit in den Laboren stets zwischen 15 °C und 30 °C bzw. 20 % und 85 % liegen (verringert das Risiko von Kondensation/Verdampfung).

Im Laborbereich darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden. Die verwendeten Geräte müssen gemäß den Herstelleranweisungen gewartet werden.

Die Dekontamination und die Entsorgung aller Reagenzien, Proben und weiterer verwendeter Materialien müssen unter Einhaltung der geltenden gesetzlichen Bestimmungen erfolgen. Für die Bestimmung genauer und reproduzierbarer Ergebnisse ist es sehr wichtig, jegliche Kontamination mit Fremd-DNA zu vermeiden, insbesondere mit PCR-Produkten von vorher bearbeiteten Proben. Die häufigste Quelle für eine DNA-Kontamination sind die amplifizierten Produkte aus vorangegangenen Tests.

3.3 Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen



Vermeiden Sie einen Kontakt der Reagenzien mit der Haut, den Augen oder Schleimhäuten. Weitere Warnungen, Vorsichtsmaßnahmen und besondere Maßnahmen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (Safety Data Sheets, SDS) des Herstellers.

3.3.1 Besondere Maßnahmen

Erste-Hilfe-Maßnahmen:

- **Genereller Rat:** Holen Sie im Fall persistierender Wirkungen ärztlichen Rat ein. Legen Sie kontaminierte Kleidung und Schuhe umgehend ab und waschen Sie sie gründlich vor dem nächsten Gebrauch.
- **Bei Einatmung:** Entfernen Sie die betroffene Person aus der unmittelbaren Umgebung. Stellen Sie ausreichende Frischluftzufuhr sicher.
- **Bei Hautkontakt:** Waschen Sie die betroffene Stelle mit Seife und viel Wasser ab.
- **Bei Augenkontakt:** Entfernen Sie Kontaktlinsen. Spülen Sie das Auge mindestens 10 bis 15 Minuten gründlich unter fließendem Wasser aus und halten Sie dabei die Augenlider offen. Schützen Sie das nicht betroffene Auge.
- **Bei Verschlucken:** Rufen Sie umgehend einen Arzt. Rufen Sie kein Erbrechen hervor. Einer bewusstlosen Person darf keinesfalls etwas über den Mund verabreicht werden.

3.3.2 Handhabung und Lagerung

Allgemeine Schutz- und Hygienemaßnahmen

Im Labor darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden. Vor dem Verlassen muss eine gute Händewaschtechnik angewendet werden. Dämpfe nicht einatmen. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden. Verschmutzte oder nasse Kleidung umgehend ablegen.

Schutzmaßnahmen zur sicheren Handhabung

Die Risiken bei der Handhabung des Produkts müssen durch angemessene Schutz- und Vorsichtsmaßnahmen minimiert werden. Beim Arbeitsverfahren müssen die Freisetzung von gefährlichen Substanzen oder Hautkontakt so weit wie möglich ausgeschlossen werden.

Hinweise zum Schutz vor Feuer und Explosionen

Keine besonderen Maßnahmen erforderlich.

Bedingungen zur sicheren Lagerung, einschließlich etwaiger Unverträglichkeiten



Den Behälter dicht geschlossen an einem trockenen, gut belüfteten Ort lagern. Geöffnete Behälter müssen sorgfältig wieder verschlossen und aufrecht stehend gelagert werden, um Auslaufen zu verhindern.

3.3.3 Vorsichtsmaßnahmen für die Reagenzien-handhabung



Um die korrekte Verwendung und Entsorgung von Reagenzien zu gewährleisten und eine Kontamination von Reagenzien zu vermeiden, befolgen Sie die nachfolgend aufgeführten Vorsichtsmaßnahmen:

- Keine abgelaufenen oder falsch gelagerten Reagenzien verwenden.
- Reagenzien gemäß den Herstellerangaben vorbereiten.
- Reagenzien dürfen nur zusammen mit den Reagenzien aus dem gleichen Kit verwendet werden.
- Reagenzien aus verschiedenen Kits oder Chargen dürfen nicht vermischt oder ausgetauscht werden.
- Öffnungsdatum dokumentieren und Röhrchen nach jeder Verwendung markieren, um zu gewährleisten, dass die Reagenzien das Verfallsdatum und die empfohlene Anzahl von Einfrier-/ Auftauzyklen nicht überschritten haben.
- Kontamination von Reagenzien durch häufigen Handschuhwechsel vermeiden. Handschuhe immer zwischen der Handhabung von Proben und Reagenzien wechseln.
- Nicht verwendete Reagenzien und Abfall gemäß den nationalen, regionalen und örtlichen Vorschriften entsorgen.

3.3.4 Sicherheit und Kontaminationsvorbeugung



Befolgen Sie die nachfolgend aufgeführten Vorsichtsmaßnahmen, um die Laborumgebung frei von DNA-Kontaminationen zu halten und die Sicherheit aller Mitarbeiter zu gewährleisten:

3 Lagerung und Handhabung

- Getrennte Laborarbeitsbereiche für die Prä- und Post-PCR-Verfahren nutzen und einen Workflow in nur eine Richtung von „sauber“ (Prä-Amplifikation) zu „verschmutzt“ (Post-Amplifikation) einhalten.
- Sicherstellen, dass in jedem Arbeitsbereich eigene, dedizierte Instrumente (einschließlich Pipetten), Verbrauchsmaterialien, Reagenzien, Behälter für biogefährlichen Abfall und Laborhandbücher vorhanden sind. Diese Materialien keinesfalls zwischen dem Prä-PCR- und dem Post-PCR-Arbeitsbereich austauschen. Wir empfehlen eine farbliche Codierung oder Beschriftung der Instrumente, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien, um deutlich zu machen, dass diese zu einem bestimmten Bereich gehören.
- Während des gesamten Verfahrens immer angemessene persönliche Schutzausrüstung tragen.
 - Bei der Arbeit im Prä-PCR- und Post-PCR-Bereich immer Laborkittel (vorzugsweise Einmal-Produkte) und puderfreie Einmal-Handschuhe tragen.
 - Um Kontamination zu vermeiden, Handschuhe zwischen der Handhabung von Proben und Reagenzien häufig und außerdem nach Kontakt der Handschuh-Außenseite mit der Haut wechseln.
 - Bei der Plasmaaufbereitung und DNA-Aufreinigung Schutzbrille tragen.
 - Einmal-Überschuhe tragen oder die Schuhe zwischen den Prä- und Post-PCR-Laboren wechseln und Einmal-Ärmelschoner tragen (erforderlich im Prä-PCR-Labor).
- Die persönliche Schutzausrüstung vor dem Verlassen des Prä-PCR- bzw. des Post-PCR-Labors ablegen und entsorgen.
- Alle Proben sind als potenziell infektiöse Substanz zu behandeln. Nach dem Verschütten von Flüssigkeiten ist es empfehlenswert, den betroffenen Bereich erst mit Reinigungsmittel/Desinfektionsmittel sowie Wasser und anschließend mit 0,5%iger Natriumhypochlorit-Lösung (Bleiche, zubereitet mit entionisiertem Wasser) zu reinigen.

Hinweis: *Übliche flüssige Haushaltsbleiche (z. B. der Marke Clorox) enthält meistens Natriumhypochlorit in einer Konzentration von*

5,25 %. Eine 1:10-Verdünnung solcher Haushaltsbleiche ergibt eine 0,5%ige Natriumhypochlorit-Lösung.

- Für die Pipettierschritte dedizierte PCR-Kabinetts verwenden.
- PCR-Kabinetts nach Gebrauch mit Desinfektionsmittel mit quartären Ammoniumverbindungen (wie RHEOSEPT-WD plus oder gleichwertige Produkte) und daraufhin mit einem Produkt für die Entfernung von Nukleinsäuren und Nukleasen (wie Roti® Nukleinsäurefrei oder gleichwertige Produkte) reinigen.
- PCR-Arbeitsbereiche nach Gebrauch mit einem Produkt für die Entfernung von Nukleinsäuren und Nukleasen (wie Roti® Nukleinsäurefrei oder gleichwertige Produkte) reinigen.
- Sicherheitskabinett, PCR-Arbeitsplätze und Laborutensilien (Pipetten, Racks und andere Geräte) nach dem Einsatz mit ultraviolettem (UV) Licht dekontaminieren. Um eine effektive UV-Strahlung sicherzustellen, UV-Leuchtmittel regelmäßig von Ablagerungen reinigen.
- Nur aerosolbeständige sterile Pipettenspitzen mit Filter verwenden (mit Chargenzertifizierung, RNase-, DNase- und pyrogenfrei).
- Nur PCR-geeignete Reagenzien und Röhrchen verwenden.
- Es sollte immer nur ein Probenröhrchen oder Reagenzröhrchen zu einem bestimmten Zeitpunkt geöffnet sein.
- Um eine Kontamination von Reagenzien für mehr als eine Verwendung zu vermeiden, geeignete Aliquots nach Anleitung vorbereiten und direktes Pipettieren vermeiden.

4 Arbeitsablauf

4.1 Blutentnahme und -verarbeitung

Die Plasma-SeqSensei™ Assay-Specific Kits wurden unter Verwendung von Streck Cell-Free DNA BCT® Blutentnahmeröhrchen entwickelt. Entnehmen und handhaben Sie das Blut gemäß den Herstelleranweisungen. Streck Cell-Free DNA BCT® können für den Probenversand an die Exzellenzzentren oder für Untersuchungen von Proben im eigenen Labor verwendet werden.

Versenden Sie die Proben bei Raumtemperatur und binnen 24 Stunden nach der Blutentnahme. Vermeiden Sie beim Versand Temperaturen unter 6 °C und über 37 °C.

4.1.1 Anweisungen zur Plasmaaufbereitung (Vollblut)

Die Plasmaaufbereitung muss spätestens 6 Tage nach dem Datum der Blutentnahme beginnen. Die Arbeitsschritte für die Plasmaaufbereitung müssen schnell aufeinanderfolgend und ohne Pause zwischen den einzelnen Schritten durchgeführt werden.

Tabelle 4: Erforderliche Materialien für die Plasmaaufbereitung aus Blut

Material	Produkt
Gerät zur Blutentnahme	* Streck Cell-Free DNA Blood Collection Tubes®, Volumen von 10,0 ml, Streck Nr. 218996 für 6 Stück, Streck Nr. 218997 für 100 Stück
Pipettenspitzen	Aerosolbeständige sterile Pipettenspitzen mit Filter, 200, 1.000 µl
Reaktionsgefäße	15-ml-Röhrchen
	5-ml-Kryoröhrchen

1. Zentrifugieren Sie das Blutröhrchen bei Raumtemperatur (zwischen 15 °C und 25 °C) für mindestens 10 Minuten bei 1.600 x g in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor.

Hinweis: Nutzen Sie eine niedrige Verlangsamungsrampe der Zentrifuge, um den Ausschluss der Zellschicht zu vermeiden.

2. Entnehmen Sie nach dem Zentrifugieren vorsichtig die Röhren aus der Zentrifuge (vermeiden Sie Turbulenzen).
3. Nehmen Sie eine Sichtprüfung der Plasmafraktion (Überstand) vor.

Hinweis: *Bei Proben, die über einen längeren Zeitraum (über 12 Stunden) bei 6 °C oder kälter gelagert wurden, kann eine weiche Zellschicht auftreten. Hämolyse (leicht rosafarbenes oder rötliches Plasma) kann bei Proben auftreten, die über einen längeren Zeitraum (über 24 Stunden) bei 37 °C oder wärmer gelagert wurden.*

4. Überführen Sie das Plasma (Überstand) in ein frisches 15-ml-Röhrchen, ohne die Zellschicht aufzubrechen, indem Sie mit einer Einkanal-Pipette oder einer Einweg-Ballonpipette entlang der Röhrchenwand pipettieren. Belassen Sie mindestens 500 µl Restplasma über der Zellschicht, um diese nicht aufzubrechen.

Hinweis: *Falls eine weiche Zellschicht vorhanden ist, überführen Sie nur die klare Plasmafraktion und belassen Sie mindestens 500 µl Restplasma über der Zellschicht. Falls die Probe keine klare Plasmafraktion aufweist, überführen Sie mindestens 2,5 ml des Plasmas von oben.*

Wichtig: Wir raten von einer Analyse von hämolytischen Proben ab, aufgrund einer größeren Gefahr eines erhöhten genomischen DNA-Hintergrunds.

5. Zentrifugieren Sie das Plasma im 15-ml-Zentrifugenröhrchen bei Raumtemperatur (zwischen 15 °C und 25 °C) für 10 Minuten bei 6.000 x g in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor oder Festwinkelrotor, um verbliebene Blutzellen zu entfernen.

Hinweis: *Nutzen Sie eine niedrige Verlangsamungsrampe der Zentrifuge.*

6. Entnehmen Sie nach dem Zentrifugieren vorsichtig die Röhren aus der Zentrifuge (vermeiden Sie Turbulenzen).
7. Überführen Sie das Plasma (Überstand) in ein frisches 15-ml-Zentrifugenröhrchen, ohne das Zellpellet aufzubrechen, indem Sie eine Einkanal-Pipette oder eine Einweg-Ballonpipette entlang der Röhrchenwand führen. Lassen Sie eine Restmenge von etwa 300 µl (~7 mm) am Boden des Gefäßes stehen, um eine Kontamination des Plasmas mit Zellen zu vermeiden.

4 Arbeitsablauf

8. Mischen Sie das Plasma vorsichtig durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren unter Verwendung einer Einkanal-Pipette, die auf ein Volumen von 1 ml eingestellt ist.
9. Überführen Sie das Plasma in zuvor beschriftete Kryoröhrchen.
10. Wenn Sie den Arbeitsablauf nicht direkt mit den Arbeitsschritten für die „Aufreinigung zirkulierender DNA aus Plasma“ fortsetzen, stellen Sie das Kryoröhrchen mit dem Plasma sofort aufrecht in ein Tiefkühlgerät bei einer Temperatur zwischen -70 °C und -100 °C (wo es bis zu 24 Monate gelagert werden kann).

Hinweis: *Gefrorene Plasmaproben müssen auf Trockeneis versandt werden.*

4.2 Aufreinigung zirkulierender DNA aus Plasma

Bei Verwendung des PSS *Assay-Specific Kits* muss die Aufreinigung zirkulierender, zellfreier DNA (cfDNA) aus Plasma mit dem QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit Nr. 55114 (QIAGEN) durchgeführt werden. Es können Mengen von 2 bis 4 ml Plasma pro Probe verarbeitet werden.

Wichtig: In Abweichung vom QIAGEN-Protokoll soll während des Workflows zur DNA-Aufreinigung keine Carrier RNA hinzugefügt werden. Die DNA-Elution ist ein zweischrittiger Arbeitsablauf.

Tabelle 5: Erforderliches Material für die cfDNA-Aufreinigung aus Plasma

Material	Produkte
Reagenzien und Kits	* QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit, QIAGEN, Nr. 55114
	Ethanol (EtOH) ≥ 99,8 %, p.a.
	2-Propanol ≥ 99,8 %, p.a.
	1X Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS), (pH 7,4 ±0,2 ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)
Pipettenspitzen/serologische Pipetten	Aerosolbeständige sterile Pipettenspitzen mit Filter, 20, 200, 1.000 µl
	Serologische sterile Pipette, 5, 10, 25 ml
Reaktionsgefäße	Röhrchen mit 50, 15, 2, 1,5 ml

Material	Produkte
Reagenzien und Kits	* QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit, QIAGEN, Nr. 55114
	Ethanol (EtOH) ≥ 99,8 %, p.a.
	2-Propanol ≥ 99,8 %, p.a.
	1X Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS), (pH 7,4 ±0,2 ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)
	* LoBind® DNA-Röhrchen 1,5 ml, Eppendorf, Nr. 0030108051
Verschiedenes	* 3-ml-Erweiterungsröhrchen für QIAvac Vakuumverteiler, Qiagen, Nr. 19587
	* VacConnectors (500) für QIAvac Vakuumverteiler, Qiagen, Nr. 19407

Vorbereitung:

- Schalten Sie den Biosicherheitsschrank ein und stellen Sie seine Funktionsfähigkeit sicher.
- Reinigen Sie den Biosicherheitsschrank und die Ausrüstung mit einem Mittel zur DNA-Entfernung (z. B. DNA away) sowie einem Desinfektionsmittel (z. B. 70 % EtOH).
- Stellen Sie die Temperatur des Wasserbads auf 60 °C (±1 °C) ein und überprüfen Sie die Wassertemperatur mit einem externen Thermometer.
- Stellen Sie die Temperatur des Heizblocks auf 56 °C (±1 °C) ein und überprüfen Sie die Temperatur der Blöcke mit einem externen Thermometer.
- Prüfen Sie den Füllstand der Abwasserflasche des Vakuumsystems. Der Füllstand darf die Markierungslinie nicht übersteigen.
- Prüfen Sie den Abfallbehälter für biologische Gefahrenstoffe. Der Abfallbehälter für feste biologische Gefahrenstoffe darf nicht über $\frac{3}{4}$ gefüllt sein.
- Schalten Sie vor dem Beginn der Arbeit die Vakuumpumpe ein, um zu prüfen, ob sie den geforderten Vakuumdruck erreicht (zwischen -800 und -900 mbar).

4 Arbeitsablauf

Wenn Sie ein neues Kit verwenden, bereiten Sie die Lösungen wie unten beschrieben vor.

Buffer ACB

- Geben Sie vor der Verwendung 200 ml Isopropanol (2-Propanol $\geq 99,8\%$, p.a.) auf 300 ml Buffer ACB Konzentrat, um 500 ml Buffer ACB zu erhalten. Gut vermischen.

Buffer ACW1

- Geben Sie vor der Verwendung 25 ml EtOH ($\geq 99,8\%$, p.a.) auf 19 ml Buffer ACW1 Konzentrat, um 44 ml Buffer ACW1 zu erhalten. Gut vermischen.

Buffer ACW2

- Geben Sie vor der Verwendung 30 ml EtOH ($\geq 99,8\%$, p.a.) auf 13 ml Buffer ACW2 Konzentrat, um 43 ml Buffer ACW2 zu erhalten. Gut vermischen.

DNA-Aufreinigung:

Die folgenden Schritte werden im Probenvorbereitungsbereich im Prä-PCR-Labor durchgeführt.

Hinweis: In der folgenden Anleitung steht ▲ für Probenvolumen von 2,0 – 3,0 ml Plasma und ● steht für Probenvolumen von 3,1 – 4,0 ml Plasma.

1. Lassen Sie die Plasmaproben bei Raumtemperatur ca. 15 bis 20 Minuten lang auftauen. Nicht vermischen oder verwirbeln.

Hinweis: Die Auftaudauer variiert je nach Probenvolumen und der Raumtemperatur. Sobald die Proben aufgetaut sind, d. h., wenn kein Eis im Röhrchen mehr sichtbar ist, fahren Sie unverzüglich mit den folgenden Schritten fort.

2. Prüfen Sie das aufgetaute Plasma auf Hämolyse.

Wichtig: Wir raten von einer Analyse von hämolytischen Proben ab, aufgrund einer größeren Gefahr eines erhöhten genomischen DNA-Hintergrunds.

3. Bereiten Sie alle Reagenzien vor. Füllen Sie für jede Probe ein Entnahmeröhrchen (aus dem QIAamp® Kit) mit ca. 1 ml PBS (um das Volumen der Plasma-Aliquots anzupassen).

Hinweis: *Bereiten Sie für jedes Proben-Aliquot ein eigenes Röhrchen PBS vor.*

4. Beschriften Sie für jede Probe das Röhrchen mit Schraubdeckel und ein 50-ml-Röhrchen.
5. Für jede Testprobe: Pipettieren Sie ▲ 300 µl oder ● 400 µl QIAGEN Proteinase K in ein 50-ml-Röhrchen und setzen Sie dieses in den Biosicherheitsschrank.
6. Zentrifugieren Sie Kryoröhrchen mit Plasma (die zuvor eine Temperatur zwischen 15 °C und 25 °C angenommen haben) bei 1.000 x g mit einer Zentrifuge mit Festwinkelrotor. Brechen Sie den Zentrifugiervorgang ab, sobald die Geschwindigkeit erreicht ist.

Hinweis: *Achten Sie darauf, dass die folgenden Schritte 7 bis 10 in einem Biosicherheitsschrank im Prä-PCR-Bereich durchgeführt werden.*

7. Falls das Volumen des zentrifugierten Plasma-Überstands weniger als ▲ 3,0 ml oder weniger als ● 4,0 ml beträgt, überführen Sie den Überstand in ein neues Röhrchen und füllen Sie das Volumen mit PBS auf ▲ 3,0 ml oder ● 4,0 ml auf.
8. Geben Sie ▲ 3,0 ml oder ● 4,0 ml Plasma-Überstand pro Probe in die jeweiligen Röhrchen mit Proteinase K.

Hinweis: *Vermeiden Sie es, beim Pipettieren das Pellet aufzubrechen, und lassen Sie ungefähr 30 µl Plasma am Boden des Röhrchens. Wenn Sie mehrere Aliquots kombinieren, öffnen Sie immer nur die Röhrchen einer zu untersuchenden Probe gleichzeitig, d. h. die Röhrchen, aus denen das Plasma entnommen wird und das Röhrchen mit Proteinase K, dem Plasma hinzugefügt wird.*

9. Fügen Sie ▲ 2,4 ml oder ● 3,2 ml Buffer ACL (ohne Carrier RNA) hinzu und schließen Sie den Deckel.
10. Mischen Sie die Röhrchen 30 Sekunden lang mit dem Vortex-Mischer im Puls-Modus.

4 Arbeitsablauf

Hinweis: *Vortex-Vermischung im Puls-Modus bedeutet Verwirbelung in kurzen Intervallen.*

11. Inkubieren Sie 60 Minuten (± 2 Minuten) bei 60 °C (± 1 °C) in einem Wasserbad.
12. Füllen Sie in der Zwischenzeit den Eiskübel mit Eis oder holen Sie das Kühlgestell aus dem -15 °C bis -30 °C kalten Gefrierschrank und beschriften Sie die erforderlichen Röhrchen von Hand:
 - a. Eine QIAamp® Mini-Säule pro Probe.
 - b. 1,5-ml-Röhrchen pro Probe.
13. Fügen Sie dem Lysat im Röhrchen ▲ 5,4 ml oder ● 7,2 ml Buffer ACB hinzu.
14. Schließen Sie das Röhrchen und mischen Sie das Lysat gründlich 15 s bis 30 s lang mit dem Vortex-Mischer im Puls-Modus.

Hinweis: *Die folgenden Schritte sind unabhängig vom ursprünglichen Probenvolumen. Es bedarf keiner weiteren Differenzierung mehr zwischen 2 – 3 ml und 3,1 – 4 ml.*

15. Inkubieren Sie die Proben 5 Minuten (± 1 Minuten) lang auf Eis oder im Kühlgestell.
16. Bereiten Sie zwischenzeitlich das QIAvac 24 Plus Vakuumsystem vor:
 - Setzen Sie die VacConnectors in die Plätze.
 - Setzen Sie die beschrifteten QIAamp® Mini-Säulen in die VacConnectors.
 - Setzen Sie die Säulen-Extender (Verlängerungsadapter) auf die QIAamp® Mini-Säulen.
17. Zentrifugieren Sie das Probenröhrchen nach der Inkubation auf Eis 30 s lang bei 7.000 x g, um das Kondensat vom Deckel zu entfernen.
18. Halten Sie das Hauptunterdruckventil noch geschlossen und schalten Sie die Vakuumpumpe ein (mit einer Einstellung zwischen -800 und -900 mbar).
19. Überführen Sie das Lysat vorsichtig in den Säulen-Extender (serologische Pipette). Entsorgen Sie die Röhrchen.

Hinweis: Um einer Kreuzkontamination vorzubeugen, sollten Sie vermeiden, die Pipette über die Säulen-Extender der anderen QIAamp Mini-Säulen zu bewegen.

20. Stellen Sie sicher, dass der Vakuumdruck einem Bereich zwischen -800 und -900 mbar entspricht.
21. Öffnen Sie das Hauptunterdruckventil und lassen Sie das Lysat vollständig durch die Säule laufen.
22. Schließen Sie das Hauptunterdruckventil (das Vakuum bleibt bestehen) und **halten Sie den Unterdruck** in QIAvac 24 Plus aufrecht.
23. Pipettieren Sie 600 µl Buffer ACW1 in den Säulen-Extender.

Hinweis: Um einer Kreuzkontamination vorzubeugen, verwenden Sie eine frische Pipettenspitze für jede Probe und vermeiden Sie es, die Pipettenspitzen über den Säulen-Extender anderer Proben zu bewegen.

24. Öffnen Sie das Hauptunterdruckventil und lassen Sie den Puffer vollständig durch die Säule laufen.
25. Schließen Sie das Hauptunterdruckventil (das Vakuum bleibt bestehen) und **lassen Sie den Unterdruck** im QIAvac 24 Plus entweichen. Entfernen Sie den Säulen-Extender und entsorgen Sie ihn.

Hinweis: Um einer Kreuzkontaminierung vorzubeugen, sollten Sie sorgfältig darauf achten, die entfernten Säulen-Extender nicht über andere Proben/Säulen zu bewegen.

26. Geben Sie 750 µl Buffer ACW2 in die QIAamp® Mini-Säule.

Hinweis: Um einer Kreuzkontamination vorzubeugen, verwenden Sie eine frische Pipettenspitze für jede Probe und vermeiden Sie es, über QIAamp® Mini-Säulen zu arbeiten, die andere Proben enthalten.

27. Öffnen Sie das Hauptunterdruckventil und lassen Sie den Puffer vollständig durch die Säule laufen.
28. Schließen Sie das Hauptunterdruckventil (das Vakuum bleibt bestehen) und **lassen Sie den Unterdruck** im QIAvac 24 Plus entweichen.

29. Geben Sie 750 µl EtOH ($\geq 99,8\%$, p.a.) in die QIAamp® Mini-Säule.

Hinweis: Um einer Kreuzkontamination vorzubeugen, verwenden Sie eine frische Pipettenspitze für jede Probe und vermeiden Sie es, über QIAamp® Mini-Säulen zu arbeiten, die andere Proben enthalten.

30. Öffnen Sie das Hauptunterdruckventil und lassen Sie das EtOH vollständig durch die Säule laufen.
31. Schließen Sie das Hauptunterdruckventil und schalten Sie die Vakuumpumpe aus.
32. Schließen Sie die QIAamp® Mini-Säule, entfernen Sie sie aus dem QIAvac 24 Plus und setzen Sie sie in ein 2-ml-Entnahmeröhrchen. Entsorgen Sie die VacConnectors.
33. Zentrifugieren Sie die Proben 3 Minuten ($\pm 0,5$ Minuten) lang bei voller Geschwindigkeit (20.000 x g) in einer Eppendorf-Zentrifuge 5430 oder einem vergleichbaren Gerät.
34. Setzen Sie die QIAamp® Mini-Säule in ein neues 2-ml-Entnahmeröhrchen. Entsorgen Sie das benutzte 2-ml-Entnahmeröhrchen.
35. Öffnen Sie die Deckel und inkubieren Sie die Säulen in den Röhrchen für 10 Minuten (± 1 Minuten) auf einem Heizblock bei 56 °C (± 1 °C), um die Membran vollständig zu trocknen.
36. Setzen Sie die QIAamp® Mini-Säulen in ein sauberes 1,5-ml-Elutionsröhrchen und entsorgen Sie die 2-ml-Entnahmeröhrchen.
37. Geben Sie vorsichtig 70 µl Buffer AVE in die Mitte der Membran, ohne die Membran zu berühren.

Hinweis: Verwenden Sie für jede Probe eine frische Pipette.

38. Schließen Sie den Deckel und inkubieren Sie 3 Minuten ($\pm 0,5$ Minuten) lang bei Raumtemperatur (zwischen 15 °C und 25 °C).
39. Zentrifugieren Sie 1 Minuten lang bei voller Geschwindigkeit (20.000 x g) in einer Eppendorf-Zentrifuge 5430 oder einem vergleichbaren Gerät.

40. Geben Sie erneut vorsichtig 70 µl Buffer AVE in die Mitte der Membran, ohne die Membran zu berühren.

Hinweis: *Verwenden Sie für jede Probe eine frische Pipette.*

41. Schließen Sie den Deckel und inkubieren Sie 3 Minuten ($\pm 0,5$ Minuten) lang bei Raumtemperatur (zwischen 15 °C und 25 °C).
42. Zentrifugieren Sie 1 Minuten lang bei voller Geschwindigkeit (20.000 x g) in einer Eppendorf-Zentrifuge 5430 oder einem vergleichbaren Gerät.
43. Entsorgen Sie die QIAamp® Mini-Säulen.
44. Lagern Sie die cfDNA im Prä-PCR-Labor bis zu 24 Stunden lang bei 2 °C bis 8 °C oder über einen längeren Zeitraum bei -15 °C bis -30 °C. Die aufgereinigte DNA ist mindestens 1 Jahr lang stabil.

4.3 Probenquantifizierung (Qubit™)

Der Qubit™ Assay wird verwendet, um die cfDNA-Mengen zu quantifizieren, die aus den Plasmaproben extrahiert wurden. DNA-Mengen werden in ng/µl angegeben.

Hinweis: *Die Qubit-Messung der Proben stellt nur eine grobe Schätzung der Input-DNA dar, um die Probenladung zu bestimmen. Die endgültige und möglicherweise abweichende Quantifizierung der Proben erfolgt im Laufe der Sequenzierung der Bibliothek mit dem internen Quantifizierer (Quantispike).*

Die PSS Assay-Specific Kits wurden unter Verwendung des Qubit™ 1X dsDNA HS Assays entwickelt (Assay-Umfang: 10 pg/µl bis 100 ng/µl).

Tabelle 6: Erforderliches Material für die Probenquantifizierung mit Qubit™

Material	Produkte
Reagenzien und Kits	* Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit, Thermo Fisher, Nr. Q33230 (100 Assays) oder Nr. Q33231 (500 Assays)
	* Qubit™ Assay-Röhrchen, Thermo Fisher, Nr. Q32856
Pipettenspitzen	Aerosolbeständige sterile Pipettenspitzen mit Filter, 2, 10, 20, 200 µl

4 Arbeitsablauf

Die folgenden Schritte werden im Probenvorbereitungsbereich im Prä-PCR-Labor durchgeführt.

Qubit™ Messung:

Führen Sie das Protokoll entsprechend der Anleitung des Herstellers mit 5 µl Probe durch (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Bestimmung der DNA-Konzentration mit Qubit™

	DNA-Input	Qubit™ 1X dsDNA HS Arbeitslösung (Komponente A)
Standard	10 µl	190 µl
Probe	5 µl	195 µl

Berechnen Sie den **DNA-Input insgesamt**:

*DNA Input pro Probe = gemessene Konzentration in ng/µl * 116 µl*

DNA Input insgesamt = \sum gemessene Konzentrationen aller Proben

Hinweis: Jede **Positive Control** enthält **4,3 ng DNA**, was für den DNA-Input insgesamt für jeden Sequenzierunslauf zu berücksichtigen ist. Die Positive Control-DNA wird automatisch vom Modul „Run Planning“ (Laufplanung) der PSS Software in die Berechnung einbezogen.

Aufgereinigte cfDNA kann im Prä-PCR-Labor bis zu 24 Stunden lang bei 2 °C bis 8 °C oder über einen längeren Zeitraum bei -15 °C bis -30 °C gelagert werden. Die aufgereinigte DNA ist mindestens 1 Jahr lang stabil.

Nächste Schritte:

Informationen zur Laufplanung finden Sie in der Gebrauchsanweisung der PSS Software und Informationen zur Vorbereitung der Sequenzierungsbibliothek finden Sie in der Gebrauchsanweisung des PSS Assay-Specific Kits (siehe Abbildung 1).

5 Technische Unterstützung

Falls bei der Probenvorbereitung Probleme auftreten, konsultieren Sie bitte die Angaben des Herstellers zur Fehlerbehebung, sofern diese vorliegen, oder wenden Sie sich direkt an den Produkthersteller.

6 Glossar und Begriffe

Begriff	Definition
BCT	Blutentnahmeröhrchen
cfDNA	Zellfreie DNA
ctDNA	Zirkulierende Tumor-DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EtOH	Ethanol
IFU	Gebrauchsanweisung
NGS	Next-Generation-Sequenzierung
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PSS	Plasma-SeqSensei™
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sicherheitsdatenblatt
UID	Eindeutige Kennung
UV	Ultraviolett

7 Literatur

- 1) Stewart CM, Kothari PD, Mouliere F, Mair R, Somnay S, Benayed R, Zehir A, Weigelt B, Dawson SJ, Arcila ME, Berger MF, Tsui DW. The value of cell-free DNA for molecular pathology. *J Pathol.* 2018 Apr;244(5):616-627. doi: 10.1002/path.5048. Epub 2018 Mar 12. PMID: 29380875; PMCID: PMC6656375.
- 2) Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jun 7;108(23):9530-5. doi: 10.1073/pnas.1105422108. Epub 2011 May 17. PMID: 21586637; PMCID: PMC3111315.

8 Urheber- und Markenrechte

Die teilweise oder vollständige Vervielfältigung des Inhalts dieses Handbuchs erfordert die vorherige schriftliche Genehmigung durch die Sysmex Corporation, Japan.

Plasma-SeqSensei™ ist eine Marke der Sysmex Corporation, Japan.

Alle anderen Marken, Bezeichnungen und Produkte, selbst wenn sie nicht spezifisch gekennzeichnet sind, sind Marken oder eingetragene Marken ihrer jeweiligen Eigentümer.







Sysmex Inostics GmbH
Falkenried 88
20251 Hamburg, Deutschland
www.sysmex-inostics.com

© 2022 Sysmex Inostics

April 2022

SPIFU.R1