



Plasma-SeqSensei™

Guida alla preparazione del campione

Manuale di linee guida

Aprile 2022

Glossario dei simboli

	Produttore		Attenzione
	Consultare le istruzioni per l'uso		Conservare a secco
	Limiti di temperatura		Limiti umidità

Sommaro

1	Introduzione	3
1.1	FINALITÀ	3
1.2	FLUSSO DI LAVORO	4
2	Reagenti, consumabili e apparecchiature	5
2.1	MATERIALE NON IN DOTAZIONE	5
2.2	MATERIALI DI CONSUMO	6
2.3	ATTREZZATURE	6
3	Conservazione e manipolazione	8
3.1	CONDIZIONI DI SPEDIZIONE	8
3.2	PRECAUZIONI GENERALI PER LA MANIPOLAZIONE	8
3.3	AVVISI E PRECAUZIONI	8
3.3.1	MISURE SPECIFICHE	9
3.3.2	MANIPOLAZIONE E CONSERVAZIONE	9
3.3.3	PRECAUZIONI PER LA MANIPOLAZIONE DEI REAGENTI	10
3.3.4	PRECAUZIONI RELATIVE ALLA SICUREZZA E ALLA CONTAMINAZIONE	10
4	Procedura	13
4.1	RACCOLTA DEL SANGUE E ANALISI	13
4.1.1	ISTRUZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL PLASMA (SANGUE INTERO)	13
4.2	PURIFICAZIONE DEL DNA CIRCOLANTE DAL PLASMA	15
4.3	QUANTIFICAZIONE DEL CAMPIONE (QUBIT™)	21
5	Assistenza tecnica	23
6	Glossario e terminologia	24
7	Bibliografia	25
8	Diritti d'autore e marchi commerciali	26

1 Introduzione

Le cellule tumorali in fase di apoptosi, necrosi o secrezione metabolica rilasciano piccole quantità del loro DNA nel flusso sanguigno. La frazione tumorale specifica del DNA libero circolante (cfDNA) è chiamata DNA tumorale circolante (ctDNA) e contiene le informazioni genetiche del tumore primario e delle metastasi. Numerosi studi di ricerca e prove sperimentali hanno dimostrato l'applicazione clinica della profilazione del ctDNA in fasi diverse della terapia oncologica, compresa la selezione della terapia, la prognosi e il monitoraggio (1).

Sono disponibili diverse tecnologie basate sul sequenziamento in parallelo (NGS) per il rilevamento del ctDNA. Tuttavia, a causa del sequenziamento e della distorsione e degli errori della PCR, la maggior parte di esse non è indicata per il rilevamento di varianti rare. Plasma-SeqSensei™ è una nuova tecnologia basata su NGS che implementa identificatori molecolari univoci (UMI) nel flusso di lavoro di sequenziamento. Ne consegue una significativa riduzione degli errori che comporta una sensibilità ultra-elevata della tecnologia PSS (2).

Per raggiungere una sensibilità elevata e i migliori risultati, la preparazione del cfDNA da campioni di sangue deve essere eseguita in conformità con la procedura testata descritta nel ► capitolo 4 *Procedura*, pagina 13/26.

1.1 Finalità

Lo scopo della presente guida alla preparazione del campione è quello di assistere gli utenti dei PSS *Assay-Specific Kit* nella preparazione di cfDNA da campioni di sangue. La presente guida contiene le procedure per la purificazione del plasma, la purificazione del cfDNA e la quantificazione del cfDNA con Qubit™. Il flusso di lavoro inizia con la raccolta di campioni di sangue in Streck Blood Collection Tubes® per l'utilizzo in applicazioni di biopsia liquida quali Plasma-SeqSensei™ *Assay-Specific Kit* e in tecnologie di sequenziamento in parallelo (Next-Generation Sequencing, NGS).

1.2 Flusso di lavoro

Il flusso di lavoro di Plasma-SeqSensei™ è suddiviso in diverse fasi alle quali l'utente deve attenersi. La Figura 1 descrive questo processo e comprende le fasi di preparazione del campione, nonché una guida relativa alle specifiche Istruzioni per l'uso (IFU) a cui attenersi, dalla raccolta del sangue ai risultati di sequenziamento.

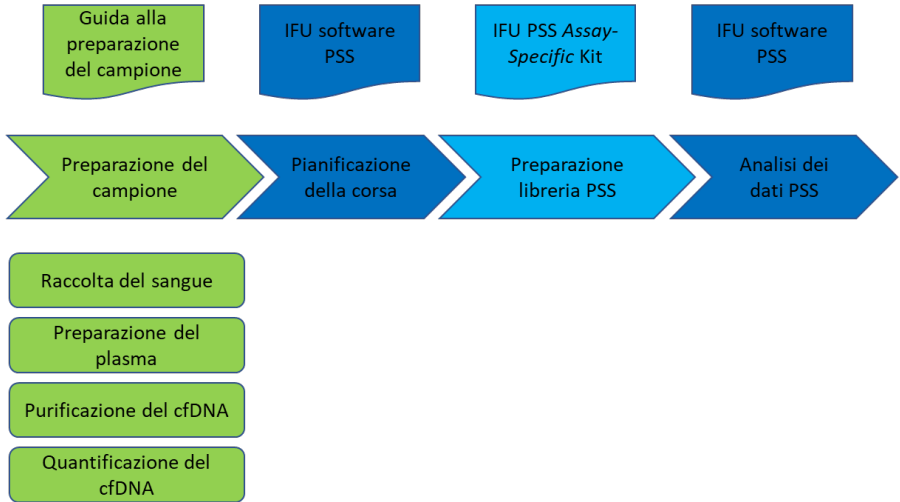


Figura 1: Il processo di Plasma-SeqSensei™, che comprende le fasi del flusso di lavoro descritte nella Guida alla preparazione del campione e gli altri documenti necessari.

2 Reagenti, consumabili e apparecchiature

Il flusso di lavoro descritto nella presente guida richiede l'uso esclusivo di materiale non in dotazione per la preparazione dei campioni di sangue per l'utilizzo di Plasma-SeqSensei™ Assay-Specific Kit. Per una descrizione e per l'utilizzo dei componenti di Plasma-SeqSensei™ Assay-Specific Kit, fare riferimento alle IFU di Plasma-SeqSensei™ Assay-Specific Kit (www.sysmex-inostics.com).

2.1 Materiale non in dotazione

I prodotti laddove i dettagli sul produttore/fornitore e il numero d'ordine sono forniti nelle Tabella 1, Tabella 2 e Tabella 3, sono essenziali per il saggio e non devono essere scambiati con prodotti di qualità e/o con proprietà paragonabili.

Tabella 1: Materiale essenziale non in dotazione per la preparazione del campione per Plasma-SeqSensei™

Materiale	Prodotti
Reagenti e kit	* QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit, QIAGEN, n. 55114
	Etanolo (EtOH) ≥ 99,8 %, p.a.
	2-propanolo ≥ 99,8 %, p.a.
	1X Soluzione salina tampone fosfato (Phosphate Buffered Saline, PBS), (pH 7,4 ±0,2, senza Ca ²⁺ e Mg ²⁺)
	* Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit, Thermo Fisher, n. Q33230 (100 rxns) o n. Q33231 (500 rxns)
* Provette per analisi Qubit™, Thermo Fisher, n. Q32856	

* Componenti essenziali; non devono essere scambiati con prodotti di qualità e/o proprietà paragonabili.

2.2 Materiali di consumo

Tabella 2: Materiali di consumo necessari per la preparazione del campione per Plasma-SeqSensei™

Attrezzatura di laboratorio	Prodotto
Dispositivo per la raccolta del sangue	* Streck Cell-Free DNA Blood Collection Tubes®, volume 10 ml, Streck n. 218996 per la confezione da 6 provette, Streck n. 218997 per la scatola da 100 provette
Puntali pipette/pipette sierologiche	Puntali per pipette sterili resistenti all'aerosol con filtri da 10, 200, 1.000 µl
	Pipetta sierologica da 5, 10, 25 ml, sterile
Provette di reazione	Provette da 50, 15, 2, 1,5 ml
	* Provette per DNA LoBind® da 1,5 ml, Eppendorf, n. 0030108051
	Flaconcino criogenico da 5 ml
Apparecchiatura di sicurezza	Occhiali di protezione
	Camici, manicotti, copriscarpa monouso, guanti protettivi
Varie	* Prolunghe per provette da 3 ml per collettori a vuoto QIAvac, Qiagen, n. 19587
	* VacConnectors (500) per collettori a vuoto QIAvac, Qiagen, n. 19407

* Componenti essenziali; non devono essere scambiati con prodotti di qualità e/o proprietà paragonabili.

2.3 Attrezzature

Tabella 3: Attrezzature richieste per la preparazione del campione per Plasma-SeqSensei™

Attrezzatura di laboratorio	Prodotto
Strumenti elettronici	Centrifuga per provette da 1,5/2 ml, RCF di 20.000 × g, rotore ad angolo fisso
	Centrifuga per provette da 15/50 ml, RCF di 7.197 × g, rotore ad angolo fisso
	Centrifuga per la preparazione del plasma, RCF di 6.000 × g, rotore con cestello oscillante, bassa rampa di decelerazione/accelerazione e adattatori per provette da 15 ml
	Adattatori per rotori ad angolo fisso per flaconcini criogenici da 5 ml

2 Reagenti, consumabili e apparecchiature

Attrezzatura di laboratorio	Prodotto
	Minicentrifuga, RCF $\leq 2.000 \times g$
	Vortexer con inserti per provette e piastre a 96 pozzetti
	Termometro
	Blocco riscaldante con inserti per provette da 2 ml
	Congelatore, da $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$
	Frigorifero, da $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$
	Congelatore, temperatura tra $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$
	Stazione di lavoro DNA/cappa per PCR
	Cappa aspirante (fortemente raccomandata)
	Cappe di sicurezza biologica di Classe II (fortemente raccomandate)
	* Qiagen Connecting System
	* QIAvac 24 Plus System
	Pompa a vuoto (230 V, 50 Hz)
	* Fluorometro Qubit™ 3 o 4
Pipette	Pipetta 1.000 μl , 200 μl , 10 μl
	Pipettatore da 5 a 100 ml
Rack	Rack per provette da 50 ml, 15 ml, 1,5/2 ml
	Scatole per conservazione in congelatore
Varie	Secchio per il ghiaccio
	Contasecondi

* Componenti essenziali; non devono essere scambiati con prodotti di qualità e/o proprietà paragonabili.

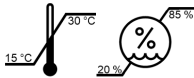
3 Conservazione e manipolazione

3.1 Condizioni di spedizione

La preparazione del campione di sangue per l'utilizzo di Plasma-SeqSensei™ Assay-Specific Kit richiede l'utilizzo di prodotti di terze parti non in dotazione. Per le condizioni ottimali di spedizione, attenersi alle istruzioni del produttore dei materiali non in dotazione.

Importante: Contrariamente a quanto indicato nelle istruzioni del produttore, i campioni raccolti in Streck Cell-Free DNA BCT® possono essere conservati per un periodo non superiore a 6 giorni.

3.2 Precauzioni generali per la manipolazione



Assicurarsi che la temperatura e l'umidità all'interno dei laboratori restino comprese tra 15 °C e 30 °C e tra il 20 % e l'85 %, rispettivamente (riduzione del rischio di condensa/evaporazione).

Non mangiare, bere o fumare in laboratorio. Effettuare la manutenzione delle attrezzature in base alle istruzioni del produttore.

Decontaminare e smaltire tutti i reagenti, i campioni e le relative scorte in conformità ai regolamenti governativi locali. Per ottenere risultati accurati e riproducibili è essenziale evitare la contaminazione con DNA estraneo, soprattutto con i prodotti della PCR provenienti da campioni utilizzati in precedenza. I prodotti amplificati da esperimenti precedenti costituiscono la fonte più comune di contaminazione del DNA.

3.3 Avvisi e precauzioni



Evitare il contatto del reagente con la pelle, gli occhi o le membrane mucose. Per ulteriori avvisi, precauzioni e misure specifiche, fare riferimento alle schede dei dati di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) del produttore.

3.3.1 Misure specifiche

Misure di primo soccorso:

- **Consiglio generico:** in caso di effetti persistenti, consultare un medico. Rimuovere immediatamente indumenti e calzature contaminati e lavarli accuratamente prima di riutilizzarli.
- **In caso di aspirazione:** allontanare la persona dalla zona interessata. Accertarsi che sia presente aria fresca.
- **In caso di contatto con la pelle:** lavare l'area interessata con sapone e abbondante acqua.
- **In caso di contatto con gli occhi:** rimuovere le lenti a contatto. Sciacquare accuratamente l'occhio sotto l'acqua corrente tenendo le palpebre ben aperte per almeno da 10 a 15 minuti. Proteggere l'occhio non colpito.
- **In caso di ingestione:** rivolgersi immediatamente a un medico. Non indurre il vomito. Non somministrare nulla per bocca a una persona in stato di incoscienza.

3.3.2 Manipolazione e conservazione

Misure generali di protezione e igiene

Non mangiare, bere o fumare in laboratorio e assicurarsi che venga utilizzata una buona tecnica di lavaggio delle mani prima di uscire. Non inalare i vapori. Evitare il contatto con gli occhi e la pelle. Rimuovere immediatamente gli indumenti sporchi o inzuppati.

Precauzioni per una manipolazione in sicurezza

I rischi di manipolazione del prodotto devono essere ridotti al minimo adottando le misure di protezione e le azioni preventive appropriate. Il processo di lavoro deve essere progettato per escludere il rilascio di sostanze pericolose o il contatto con la pelle, per quanto possibile.

Consigli sulla protezione contro incendi ed esplosioni

Non sono necessarie misure speciali.

Condizioni per una conservazione sicura, comprese eventuali incompatibilità



Tenere il contenitore ben chiuso in un luogo asciutto e ben ventilato. I contenitori aperti devono essere richiusi con cura e tenuti in posizione verticale per evitare perdite.

3.3.3 Precauzioni per la manipolazione dei reagenti



Per garantire un uso e uno smaltimento corretti e per evitare la contaminazione dei reagenti, seguire le precauzioni elencate di seguito:

- Non utilizzare reagenti scaduti o non conservati correttamente.
- Preparare i reagenti seguendo le istruzioni del produttore.
- I reagenti sono destinati all'uso esclusivo con gli reagenti dello stesso kit.
- I reagenti di kit o lotti diversi non possono essere raggruppati o scambiati.
- Registrare la data di apertura e contrassegnare le provette dopo ogni uso, per garantire che i reagenti non vengano utilizzati dopo la data di scadenza successiva all'apertura o dopo il numero raccomandato di cicli di congelamento-scongelo.
- Evitare la contaminazione dei reagenti cambiando spesso i guanti. Cambiare sempre i guanti tra la manipolazione dei reagenti e dei campioni.
- Smaltire i reagenti non utilizzati e i rifiuti in conformità alle normative ambientali nazionali, regionali e locali.

3.3.4 Precauzioni relative alla sicurezza e alla contaminazione



Seguire le precauzioni elencate qui sotto per mantenere l'ambiente di lavoro del laboratorio al riparo da contaminazioni del DNA e garantire la sicurezza del personale:

- Separare le aree di lavoro utilizzate per le operazioni di laboratorio pre-PCR e post-PCR e rispettare un flusso di lavoro unidirezionale da aree "pulite" (pre-amplificazione) ad aree "sporche" (post-amplificazione).

3 Conservazione e manipolazione

- Accertarsi che l'apparecchiatura dedicata (comprese le pipette) come scorte, reagenti, taniche del liquido di scarto a rischio biologico e manuali di laboratorio siano presenti in ciascuna area di lavoro. Non trasferire mai questi materiali tra le aree di lavoro pre-PCR e post-PCR. Si raccomanda di utilizzare la codifica cromatica o l'etichettatura dell'attrezzatura, delle scorte e dei reagenti per identificare quelli che appartengono a una determinata area.
- Indossare adeguati dispositivi di protezione individuale durante tutta la procedura.
 - Indossare sempre un camice da laboratorio (preferibilmente monouso) e guanti senza polvere monouso quando si lavora nei laboratori pre-PCR e post-PCR.
 - Cambiare spesso i guanti tra la manipolazione di reagenti e campioni e dopo che la pelle è venuta a contatto con la superficie esterna dei guanti per impedire la contaminazione.
 - Indossare occhiali protettivi durante la preparazione del plasma e la purificazione del DNA.
 - Indossare copriscarpe monouso o cambiare le calzature tra i laboratori pre-PCR e post-PCR e indossare manicotti monouso di protezione per le braccia (necessari nel laboratorio pre-PCR).
- Quando si esce dalle aree di laboratorio pre-PCR e post-PCR, rimuovere e smaltire i dispositivi di protezione individuale.
- Manipolare tutti i campioni come materiale potenzialmente infettivo. In caso di fuoriuscita, si raccomanda di pulire l'area interessata in primo luogo con un detergente/disinfettante e acqua, quindi con una soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5 % (candeggina) preparata utilizzando acqua deionizzata.

Nota bene: *La concentrazione dell'ipoclorito di sodio nella candeggina liquida reperibile in commercio per uso domestico (ad es. marca Clorox) è generalmente pari al 5,25 %. Una diluizione 1:10 di candeggina per uso domestico consente di ottenere una soluzione con lo 0,5 % di ipoclorito di sodio.*

- Utilizzare cappe per PCR dedicate per le fasi di pipettamento.
- Dopo l'uso, pulire le cappe per PCR con un disinfettante a base di composti di ammonio quaternario (come RHEOSEPT-WD plus o

equivalente) seguito da un prodotto progettato per rimuovere gli acidi nucleici e le nucleasi (come Roti® privo di acidi nucleici o equivalente).

- Dopo l'uso, pulire le aree di lavoro per la PCR con un prodotto apposito per la rimozione degli acidi nucleici e delle nucleasi (come Roti® privo di acidi nucleici o equivalente).
- Decontaminare la cappa di sicurezza, le aree di lavoro per PCR e gli strumenti del laboratorio (pipette, rack per provette e altre attrezzature) con raggi ultravioletti (UV) dopo l'uso. Per garantire l'efficacia delle radiazioni UV, accertarsi che le lampade UV vengano pulite regolarmente per evitare l'accumulo di residui che ne ridurrebbero l'efficienza.
- Utilizzare solo puntali per pipetta sterili resistenti all'aerosol, con filtri (con certificato di lotto, privi di RNAsi e DNAsi e di sostanze pirogene).
- Utilizzare solamente reagenti e provette per PCR.
- Tenere aperta solamente una provetta del campione o del reagente alla volta.
- Per prevenire la contaminazione di soluzioni di reagenti per uso multiplo, preparare delle aliquote di lavoro in conformità alle istruzioni ed evitare il pipettamento diretto.

4 Procedura

4.1 Raccolta del sangue e analisi

I Plasma-SeqSensei™ *Assay-Specific* Kit sono stati sviluppati utilizzando le provette di raccolta del sangue Streck Cell-Free DNA BCT®. Raccogliere e manipolare il sangue secondo le istruzioni del produttore. Le Streck Cell-Free DNA BCT® possono essere usate per i campioni spediti per l'analisi o per i campioni interni.

Spedire i campioni a temperatura ambiente entro 24 ore dal prelievo del sangue. Evitare temperature inferiori a 6 °C e superiori a 37 °C durante la spedizione.

4.1.1 Istruzioni per la preparazione del plasma (sangue intero)

Iniziare la preparazione del plasma non oltre 6 giorni dalla data di prelievo del sangue. Le fasi di preparazione del plasma devono essere effettuate in rapida successione, senza pause tra una fase e l'altra.

Tabella 4: Materiale necessario per la preparazione del plasma dal sangue

Materiale	Prodotto
Dispositivo per la raccolta del sangue	* Streck Cell-Free DNA Blood Collection Tubes®, volume 10 ml, Streck n. 218996 per la confezione da 6 provette, Streck n. 218997 per la scatola da 100 provette
Puntali per pipette	Puntali per pipette sterili resistenti all'aerosol con filtri da 200, 1.000 µl
Provette di reazione	Provette da 15 ml
	Fiaconcino criogenico da 5 ml

1. Centrifugare le provette di sangue a temperatura ambiente (tra 15 °C e 25 °C) per 10 min a 1.600 x g utilizzando un rotore oscillante.

Nota bene: *Per non disturbare lo strato di cellule, utilizzare una rampa di decelerazione bassa della centrifuga.*

2. Dopo la centrifugazione, rimuovere con cura le provette dalla centrifuga (evitare turbolenze).

3. Controllare visivamente la frazione del plasma (surnatante).

Nota bene: *Nei campioni conservati a una temperatura pari o inferiore a 6 °C per un periodo di tempo prolungato (> 12 ore) è possibile osservare uno strato morbido di cellule. Nei campioni conservati a una temperatura pari o superiore a 37 °C per un periodo di tempo prolungato (> 24 ore) è possibile osservare emolisi (plasma rosa chiaro o rossastro).*

4. Senza disturbare lo strato di cellule, trasferire il plasma (surnatante) in una nuova provetta conica da 15 ml pipettando lungo la parete della provetta con una pipetta monocanale o una pipetta volumetrica monouso. Lasciare almeno 500 µl di plasma residuo sullo strato di cellule per non disturbarlo.

Nota bene: *Se è presente uno strato morbido di cellule, trasferire solo la frazione trasparente di plasma e lasciare almeno 500 µl di plasma residuo sullo strato di cellule. Se il campione non mostra una frazione trasparente di plasma, trasferire almeno 2,5 ml di plasma dalla parte superiore.*

Importante: Non raccomandiamo l'analisi di campioni emolitici a causa del maggior rischio di DNA genomico di fondo elevato.

5. Centrifugare il plasma nella provetta da centrifuga da 15 ml a temperatura ambiente (tra 15 °C e 25 °C) per 10 min a 6.000 x g utilizzando un rotore oscillante o ad angolo fisso per rimuovere eventuali cellule ematiche residue.

Nota bene: *Utilizzare una rampa di decelerazione bassa della centrifuga.*

6. Dopo la centrifugazione, rimuovere con cura le provette dalla centrifuga (evitare turbolenze).
7. Senza disturbare il pellet cellulare, trasferire il plasma (surnatante) in una nuova provetta da centrifuga da 15 ml pipettando lungo la parete della provetta con una pipetta monocanale o una pipetta a bulbo monouso. Lasciare un volume residuo di circa 300 µl (~7 mm) sul fondo della provetta, per evitare di contaminare il plasma con le cellule.
8. Miscelare delicatamente il plasma, pipettando su e giù 5 volte con una pipetta monocanale impostata ad un volume di 1 ml.

9. Trasferire il plasma in flaconcini criogenici pre-etichettati.
10. Se non si procede direttamente alle fasi di purificazione del DNA circolante dal plasma, porre immediatamente i flaconcini criogenici con il plasma all'interno di un congelatore in posizione verticale e conservarli a una temperatura tra -70 °C e -100 °C (fino a un massimo di 24 mesi).

Nota bene: *I campioni congelati di plasma devono essere spediti su ghiaccio secco.*

4.2 Purificazione del DNA circolante dal plasma

Per il PSS *Assay-Specific* Kit, la purificazione del DNA libero circolante (cfDNA) dal plasma deve essere eseguita utilizzando QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit n. 55114 (QIAGEN). È possibile processare qualsiasi volume di plasma per campione tra 2 e 4 ml.

Importante: Diversamente dal protocollo di QIAGEN, non aggiungere RNA carrier durante il flusso di lavoro di purificazione del DNA. L'eluizione del DNA segue una procedura a due fasi.

Tabella 5: Materiale necessario per la purificazione del cfDNA dal plasma

Materiale	Prodotti
Reagenti e kit	* QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit, QIAGEN, n. 55114
	Etanolo (EtOH) ≥ 99,8 %, p.a.
	2-propanolo ≥ 99,8 %, p.a.
Puntali pipette/pipette sierologiche	1X Soluzione salina tampone fosfato (Phosphate Buffered Saline, PBS), (pH 7,4 ±0,2, senza Ca ²⁺ e Mg ²⁺)
	Puntali per pipette sterili resistenti all'aerosol con filtri da 20, 200, 1.000 µl
Provette di reazione	Pipetta sierologica da 5, 10, 25 ml, sterile
	Provette da 50, 15, 2, 1,5 ml
Varie	* Provette per DNA LoBind® da 1,5 ml, Eppendorf, n. 0030108051
	* Prolunghe per provette da 3 ml per collettori a vuoto QIAvac, Qiagen, n. 19587
	* VacConnectors (500) per collettori a vuoto QIAvac, Qiagen, n. 19407

Preparazione:

- Accendere la cappa di sicurezza biologica e assicurarne il funzionamento corretto.
- Pulire la cappa di sicurezza biologica e le attrezzature con un agente di rimozione del DNA (ad es. DNA away) e con un agente disinfettante (ad es. EtOH al 70 %).
- Impostare la temperatura del bagnomaria a 60 °C (± 1 °C) e verificare la temperatura dell'acqua con un termometro esterno.
- Impostare la temperatura dei blocchi riscaldanti a 56 °C (± 1 °C) e verificare la temperatura dei blocchi con un termometro esterno.
- Controllare il livello del liquido nel contenitore per i rifiuti liquidi del sistema del vuoto. Il livello del liquido non deve superare la linea indicata.
- Controllare il contenitore per i rifiuti a rischio biologico. Il contenitore per i rifiuti solidi a rischio biologico non deve essere pieno oltre $\frac{3}{4}$.
- Prima di iniziare il lavoro, accendere la pompa a vuoto per verificare che raggiunga la pressione a vuoto richiesta (tra -800 e -900 mbar).

Quando si utilizza un nuovo kit, preparare le soluzioni come descritto qui sotto.

Buffer ACB

- Prima dell'uso, aggiungere 200 ml di isopropanolo (2-propanolo $\geq 99,8$ %, p.a.) a 300 ml di Buffer ACB concentrato per ottenere 500 ml di Buffer ACB. Miscelare con cura.

Buffer ACW1

- Prima dell'uso, aggiungere 25 ml di EtOH ($\geq 99,8$ %, p.a.) a 19 ml di Buffer ACW1 concentrato per ottenere 44 ml di Buffer ACW1. Miscelare con cura.

Buffer ACW2

- Prima dell'uso, aggiungere 30 ml di EtOH ($\geq 99,8$ %, p.a.) a 13 ml di Buffer ACW2 concentrato per ottenere 43 ml di Buffer ACW2. Miscelare con cura.

Purificazione del DNA:

I seguenti passaggi vengono eseguiti nell'area di preparazione del campione nel laboratorio pre-PCR.

Nota bene: Nelle fasi seguenti, ▲ indica volumi dei campioni di plasma di 2-3 ml e ● indica volumi dei campioni di plasma di 3,1-4 ml.

1. Lasciare che i campioni di plasma si scongelino a temperatura ambiente per circa 15-20 min. Non miscelare né agitare.

Nota bene: Il tempo varia a seconda del volume del campione e della temperatura ambiente. Una volta scongelati i campioni, ossia quando il ghiaccio nella provetta non è più visibile, procedere immediatamente con le fasi seguenti.

2. Una volta scongelato il campione, verificare l'eventuale emolisi del plasma.

Importante: Non raccomandiamo l'analisi di campioni emolitici a causa del maggior rischio di DNA genomico di fondo elevato.

3. Preparare tutti i reagenti. Riempire una provetta di raccolta (dal QIAamp® Kit) con ~1 ml di PBS per ciascun campione (per regolare il volume delle aliquote di plasma).

Nota bene: Per ciascuna aliquota di campione, preparare una provetta separata con PBS.

4. Etichettare la provetta con tappo a vite e una provetta da 50 ml per campione.

5. Per ciascun campione da testare: pipettare ▲ 300 µl o ● 400 µl di QIAGEN Proteinase K in una provetta da 50 ml e sistemarla nella cappa di sicurezza biologica.

6. Centrifugare i flaconcini criogenici contenenti il plasma (precedentemente portati a una temperatura tra 15 °C e 25 °C) a 1.000 x g con un rotore ad angolo fisso. Interrompere la centrifugazione una volta raggiunta la velocità.

Nota bene: Assicurarsi che le seguenti fasi da 7 a 10 vengano eseguite in una cappa di sicurezza biologica nell'area pre-PCR.

7. Se i volumi di plasma surnatante centrifugato sono inferiori a ▲ 3 ml o inferiori a ● 4 ml, trasferire il surnatante in una nuova provetta e regolare i volumi con PBS fino a ▲ 3 ml o ● 4 ml.

8. Aggiungere ▲ 3 ml o ● 4 ml di plasma surnatante per campione nelle rispettive provette contenenti proteinasi K.

Nota bene: *Durante il pipettamento, evitare di disturbare il pellet e lasciare circa 30 µl di plasma sul fondo della provetta. Quando si combinano più aliquote, aprire le provette di un solo campione alla volta, ossia le provette da cui prelevare il plasma e la provetta contenente la proteinasi K alla quale il plasma sarà aggiunto.*

9. Aggiungere ▲ 2,4 ml o ● 3,2 ml di tampone ACL (senza RNA carrier) e chiudere il tappo.
10. Miscelare le provette in un vortex a impulsi per 30 s.

Nota bene: *Con “vortex a impulsi” si intende attivando il vortex a brevi intervalli.*

11. Incubare a 60 °C (±1 °C) in un bagnomaria per 60 min (±2 min).
12. Nel frattempo, riempire di ghiaccio il secchio per il ghiaccio o prendere il rack freddo dal congelatore tra -15 °C e -30 °C ed etichettare manualmente le provette necessarie:
 - a. Una colonna QIAamp® Mini per campione.
 - b. Una provetta da 1,5 ml per campione.

13. Aggiungere ▲ 5,4 ml o ● 7,2 ml di Buffer ACB al lisato nella provetta.
14. Chiudere il tappo della provetta e miscelare completamente in un vortex a impulsi per 15-30 s.

Nota bene: *Le fasi seguenti sono indipendenti dal volume iniziale del campione. Non sono indicate ulteriori differenziazioni tra 2-3 ml e 3,1-4 ml.*

15. Incubare i campioni su ghiaccio o nel rack freddo per 5 min (±1 min).
16. Nel frattempo, preparare il sistema di vuoto QIAvac 24 Plus:
 - Posizionare i VacConnectors negli alloggiamenti.
 - Posizionare le colonne QIAamp® Mini etichettate nei VacConnectors.
 - Posizionare l'adattatore della colonna (adattatore dell'estensione) sulle colonne QIAamp® Mini.

17. Dopo l'incubazione su ghiaccio, centrifugare la provetta del campione a 7.000 x g per 30 s per rimuovere la condensa dal coperchio.
18. Con la valvola a vuoto principale ancora chiusa, accendere la pompa a vuoto (impostandola tra -800 e -900 mbar).
19. Trasferire accuratamente il lisato nell'adattatore della colonna (con una pipetta sierologica). Smaltire le provette.

Nota bene: *Per impedire la contaminazione crociata, evitare di muovere la pipetta sopra gli adattatori della colonna delle altre colonne QIAamp Mini.*

20. Assicurarsi che la pressione a vuoto sia nell'intervallo tra -800 e -900 mbar.
21. Aprire la valvola a vuoto principale e lasciare che il lisato attraversi completamente la colonna.
22. Chiudere la valvola a vuoto principale (con il vuoto acceso) e **mantenere la pressione a vuoto** in QIAvac 24 Plus.
23. Pipettare 600 µl di Buffer ACW1 nell'adattatore della colonna.

Nota bene: *Per impedire la contaminazione crociata, utilizzare un nuovo puntale per pipette per ciascun campione ed evitare di muovere i puntali per pipette sopra l'adattatore della colonna degli altri campioni.*

24. Aprire la valvola a vuoto principale e lasciare che il tampone attraversi completamente la colonna.
25. Chiudere la valvola a vuoto principale (con il vuoto acceso) e **scaricare il vuoto** dal QIAvac 24 Plus. Rimuovere l'adattatore della colonna e smaltirlo.

Nota bene: *Per impedire la contaminazione crociata, accertarsi di non rimuovere gli adattatori della colonna sopra gli altri campioni/le altre colonne.*

26. Applicare 750 µl di Buffer ACW2 alla colonna QIAamp® Mini.

Nota bene: *Per impedire la contaminazione crociata, utilizzare un nuovo puntale per pipette per ciascun campione ed evitare di lavorare sopra le colonne QIAamp® Mini contenenti altri campioni.*

27. Aprire la valvola a vuoto principale e lasciare che il tampone attraversi completamente la colonna.
28. Chiudere la valvola a vuoto principale (con il vuoto acceso) e **scaricare il vuoto** dal QIAvac 24 Plus.
29. Applicare 750 µl di EtOH ($\geq 99,8\%$, p.a.) alla colonna QIAamp® Mini.

Nota bene: *Per impedire la contaminazione crociata, utilizzare un nuovo puntale per pipette per ciascun campione ed evitare di lavorare sopra le colonne QIAamp® Mini contenenti altri campioni.*

30. Aprire la valvola a vuoto principale e lasciare che l'EtOH attraversi completamente la colonna.
31. Chiudere la valvola a vuoto principale e spegnere la pompa a vuoto.
32. Chiudere la colonna QIAamp® Mini, rimuoverla da QIAvac 24 Plus e inserirla dentro una provetta di raccolta da 2 ml. Smaltire i VacConnectors.
33. Centrifugare i campioni in una centrifuga Eppendorf 5430 o equivalente a piena velocità (20.000 x g) per 3 min ($\pm 0,5$ min).
34. Porre la colonna QIAamp® Mini dentro una nuova provetta di raccolta da 2 ml. Smaltire la provetta da 2 ml usata.
35. Aprire i coperchi e incubare l'insieme su un blocco riscaldante a 56 °C (± 1 °C) per 10 min (± 1 min), per asciugare completamente la membrana.
36. Porre le colonne QIAamp® Mini dentro provette da eluizione pulite da 1,5 ml e smaltire le provette di raccolta da 2 ml.
37. Applicare con cura 70 µl di Buffer AVE al centro della membrana senza toccarla.

Nota bene: *Utilizzare un nuovo puntale per pipette per ciascun campione.*

38. Chiudere il coperchio e incubare a temperatura ambiente (tra 15 °C e 25 °C) per 3 min ($\pm 0,5$ min).
39. Centrifugare in una centrifuga Eppendorf 5430 o equivalente a piena velocità (20.000 x g) per 1 min per eluire gli acidi nucleici.

40. Senza toccare la membrana, riapplicare con cura 70 µl di Buffer AVE al centro della membrana.

Nota bene: *Utilizzare un nuovo puntale per pipette per ciascun campione.*

41. Chiudere il coperchio e incubare a temperatura ambiente (tra 15 °C e 25 °C) per 3 min (±0,5 min).

42. Centrifugare in una centrifuga Eppendorf 5430 o equivalente a piena velocità (20.000 x g) per 1 min per eluire gli acidi nucleici.

43. Smaltire la colonna QIAamp® Mini.

44. Conservare il cfDNA nel laboratorio pre-PCR a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C fino a 24 ore o tra -15 °C e -30 °C per periodi più lunghi. Il DNA purificato è stabile per almeno 1 anno.

4.3 Quantificazione del campione (Qubit™)

Qubit™ Assay viene utilizzato per quantificare le quantità di cfDNA estratte dai campioni di plasma. Le quantità di DNA sono riportate in ng/µl.

Nota bene: *La misurazione Qubit dei campioni rappresenta solo un'approssimazione grezza della quantità di DNA per determinare il carico del campione. La quantificazione finale e possibilmente diversa dei campioni verrà eseguita durante il sequenziamento della libreria utilizzando il quantificatore interno (Quantispike).*

I PSS Assay-Specific Kit sono stati sviluppati con Qubit™ 1X dsDNA HS Assay (intervallo dell'analisi: 10 pg/µl a 100 ng/µl).

Tabella 6: Materiale necessario per la quantificazione del campione con Qubit™

Materiale	Prodotti
Reagenti e kit	* Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit, Thermo Fisher, n. Q33230 (100 rxns) o n. Q33231 (500 rxns)
	* Provette per analisi Qubit™, Thermo Fisher, n. Q32856
Puntali per pipette	Puntali per pipette sterili resistenti all'aerosol con filtri da 2, 10, 20, 200 µl

I seguenti passaggi vengono eseguiti nell'area di preparazione del campione nel laboratorio pre-PCR.

Misurazione con Qubit™:

Eseguire il protocollo come descritto nel manuale fornito dal produttore, utilizzando 5 µl di campione (vedere Tabella 7).

Tabella 7: Determinazione della concentrazione di DNA con Qubit™

	Quantità di DNA	Soluzione di lavoro Qubit™ 1X dsDNA HS (componente A)
Standard	10 µl	190 µl
Campione	5 µl	195 µl

Calcolare la **quantità totale di DNA**:

Quantità di DNA per campione

$$= \text{concentrazione misurata in ng/}\mu\text{l} * 116 \mu\text{l}$$

Quantità totale di DNA

$$= \sum \text{concentrazioni misurate per tutti i campioni}$$

Nota bene: Ciascun **controllo positivo contiene 4,3 ng di DNA**, che deve essere considerato nella quantità totale di DNA per ciascuna corsa di sequenziamento. Il DNA di controllo positivo viene automaticamente incluso nel calcolo dal modulo "Run Planning" (Pianificazione della corsa) del software PSS.

Il cfDNA purificato può essere conservato nel laboratorio pre-PCR a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C fino a 24 ore o tra -15 °C e -30 °C per periodi più lunghi. Il DNA purificato è stabile per almeno 1 anno.

Fase successiva:

Fare riferimento alle IFU del software PSS per la pianificazione della corsa e alle IFU del PSS Assay-Specific Kit per la preparazione della libreria di sequenziamento (vedere Figura 1).

5 Assistenza tecnica

Se si verificano problemi durante la preparazione del campione, fare riferimento alla guida per la ricerca e l'eliminazione dei guasti fornita dal produttore, se disponibile, oppure contattare il produttore per assistenza.

6 Glossario e terminologia

Termine	Definizione
BCT	Provette di raccolta del sangue
cfDNA	DNA libero circolante
ctDNA	DNA tumorale circolante
DNA	Acido desossiribonucleico
EtOH	Etanolo
IFU	Istruzioni per l'uso
NGS	Sequenziamento in parallelo
PBS	Soluzione salina tampone fosfato
PCR	Reazione a catena della polimerasi
PSS	Plasma-SeqSensei™
RNA	Acido ribonucleico
SDS	Scheda dei dati di sicurezza
UMI	Identificatore univoco
UV	Ultravioletti

7 Bibliografia

- 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 Diritti d'autore e marchi commerciali

È vietata la riproduzione non autorizzata del contenuto, totale o parziale, di questo manuale in assenza della previa autorizzazione scritta di Sysmex Corporation, Giappone.

Plasma-SeqSensei™ è un marchio commerciale di Sysmex Corporation, Giappone.

Tutti gli altri marchi commerciali, nomi e prodotti sono, anche quando non specificamente contrassegnati come tali, marchi o marchi registrati dei rispettivi proprietari.



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

© 2022 Sysmex Inostics

Aprile 2022

SPIFU.R1