



Tháng 6 năm 2022

Hướng dẫn Sử dụng QIASymphony[®] DSP Circulating DNA Kit (Đặc tính Hiệu suất)

Phiên bản 2



Dùng cho Mục đích Sử dụng Chẩn đoán trong Ống nghiệm
Để sử dụng với QIASymphony DSP Circulating DNA Kit



937556



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Đức

R1

Đặc tính Hiệu suất có sẵn dưới dạng điện tử và có thể được tìm thấy trong tab tài nguyên của trang sản phẩm trên www.qiagen.com.

Giới thiệu chung

Hệ thống QIASymphony DSP Circulating DNA tạo thành một hệ thống trong ống nghiệm sẵn dùng để lọc định tính DNA lưu thông tự do (circulating cell-free DNA, ccfDNA) từ huyết tương và nước tiểu người.

Chỉ được sử dụng QIASymphony DSP Circulating DNA Kit kết hợp với dụng cụ QIASymphony SP.

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit cung cấp thuốc thử để lọc đồng thời và tự động hoàn toàn ccfDNA từ một loạt các loại huyết tương người (với chất ổn định chương trình ccfDNA, ví dụ: Cell-Free DNA BCT® từ Streck® cũng như không có chất ổn định chương trình ccfDNA, ví dụ: Ống EDTA) và nước tiểu người (có và không có chất ổn định chương trình ccfDNA). Tuy nhiên, đặc tính hiệu năng cho mọi ống lấy máu chưa được thiết lập và phải được người dùng xác nhận.

ccfDNA đã lọc tương thích với một loạt các ứng dụng sau này, chẳng hạn như hóa học PCR, xét nghiệm định lượng dựa trên huỳnh quang hoặc NGS.

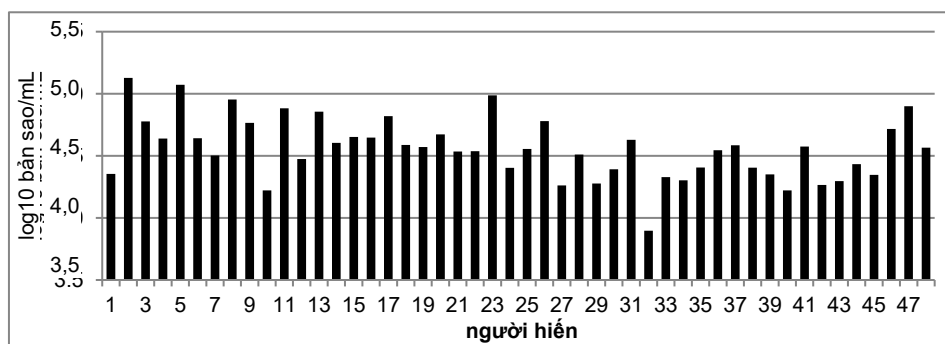
QIASymphony SP thực hiện tất cả các bước của quy trình lọc. Một lượt chạy xử lý được tới 96 mẫu theo các lô gồm 24 mẫu. Mẫu nước tiểu có thể yêu cầu xử lý trước mẫu thủ công.

Lưu ý: Đặc tính Hiệu suất phụ thuộc nhiều vào các yếu tố khác nhau và liên quan đến ứng dụng cụ thể sau này. Nó đã được thiết lập cho QS DSP Circulating DNA Kit kết hợp với các ứng dụng mẫu sau này. Tuy nhiên, cần phải thiết lập các phương pháp để phân lập axit nucleic từ mẫu sinh học được sử dụng làm tiền đề cho nhiều ứng dụng sau này, thông số hiệu suất, ví dụ, nhiễm bẩn chéo và độ chính xác lần chạy cho bất kỳ quy trình làm việc nào như một phần của quá trình phát triển ứng dụng sau này. Do đó, người dùng có trách nhiệm xác nhận toàn bộ quy trình làm việc để thiết lập các thông số hiệu suất thích hợp.

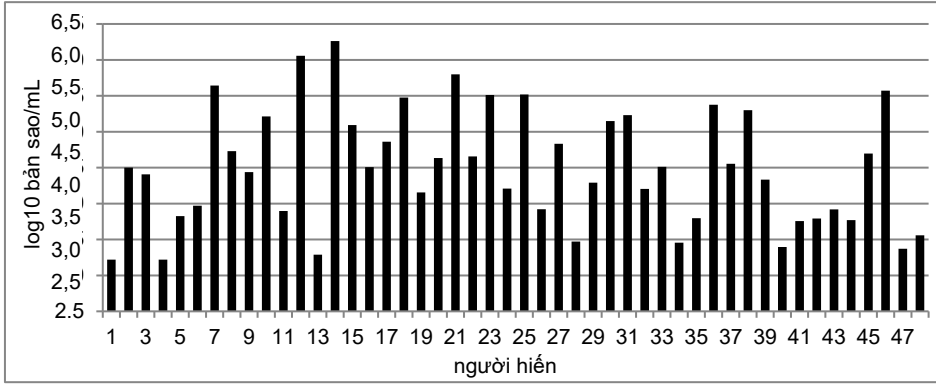
Hiệu suất cơ bản

Hiệu suất cơ bản của QIASymphony DSP Circulating DNA Kit được đánh giá bằng cách sử dụng 48 người hiến đơn lẻ để tách chiết ccfDNA từ 4 mL huyết tương Streck cũng như 4 mL nước tiểu ổn định. Sản lượng ccfDNA đã được xác định bằng xét nghiệm real-time PCR nội bộ cho trình tự mã hóa RNA ribosome 18S.

Sự khác biệt về sản lượng (\log_{10} bản sao/mL) trong Hình 1 (4 mL huyết tương) và Hình 2 (4 mL nước tiểu) phản ánh nồng độ ccfDNA phụ thuộc vào người hiến thường được tìm thấy trong cùng một thể tích của vật liệu mẫu tương ứng.



Hình 1. Sản lượng ccfDNA từ huyết tương của 48 người hiến riêng lẻ. Việc hiến máu từ 48 người hiến riêng lẻ được thực hiện trong Cell-Free DNA BCT (Streck). CcfDNA được tách chiết từ 4 mL huyết tương bằng QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. Sản lượng CcfDNA được định lượng bằng xét nghiệm real-time PCR nội bộ cho trình tự mã hóa 18S. Kết quả được tính toán dưới dạng bản sao đích trên mỗi mililit huyết tương đầu vào.



Hình 2. Sản lượng ccfDNA từ nước tiểu của 48 người hiến riêng lẻ. Nước tiểu lấy từ 48 người hiến đã được ổn định bằng cách sử dụng Cell-Free DNA Urine Preserve® (Streck). CcfDNA được tách chiết từ 4 mL nước tiểu bằng QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. Sản lượng CcfDNA được định lượng bằng xét nghiệm real-time PCR nội bộ cho trình tự mã hóa 18S. Kết quả được tính toán dưới dạng bản sao đích trên mỗi mililit nước tiểu đầu vào.

Độ chụm của lần chạy

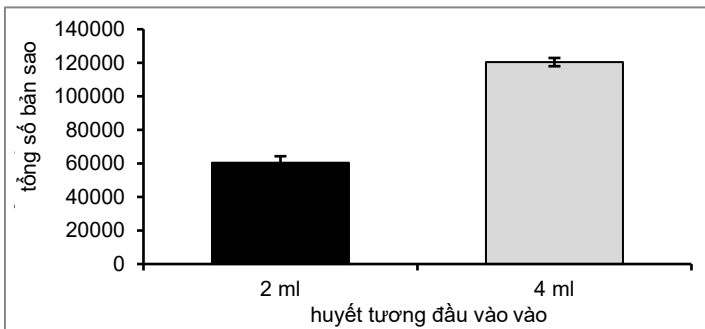
Hệ số biến thiên (Coefficients of Variations, CV) được xác định để tách chiết ccfDNA của người từ huyết tương EDTA. Để phân tích độ chụm, ccfDNA được định lượng bằng xét nghiệm real-time PCR nội bộ cho trình tự mã hóa ribosome 18S. Tổng cộng, 10 lần chạy QIASymphony được thực hiện mỗi lần trong 4 đợt (8 lần lặp lại mỗi đợt). Các dữ liệu độ chụm được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Phân tích ước tính độ chụm

Độ chụm	CV (%)
Trong lô	11,67
Khả năng lặp lại	13,14
Độ chụm trung gian	13,14
Độ chụm toàn phần	14,12

Hiệu suất tương đương của giao thức 2 và 4 mL

Hiệu suất tương đương của các giao thức đối với mẫu đầu vào 2 và 4 mL được đánh giá cho QIASymphony DSP Circulating DNA Kit sử dụng ccfDNA nội sinh được tách chiết từ nhóm huyết tương EDTA người. Tổng cộng, 8 lần chạy QIASymphony độc lập được thực hiện mỗi lần trong 4 đợt với 8 lần lặp lại mỗi đợt. Phạm vi tuyến tính của quy trình QIASymphony DSP Circulating DNA Kit đã được xác định cho trình tự mã hóa 18S bằng xét nghiệm real-time PCR nội bộ (Hình 3). Tỷ lệ chênh lệch của các giao thức 2 và 4 mL được thể hiện trong Bảng 2 (Giao thức tham chiếu là 4 mL mẫu đầu vào).



Hình 3. Hiệu suất tương đương bằng cách sử dụng giao thức cho mẫu đầu vào 2 và 4 mL. Phạm vi tuyến tính của giao thức ccfDNA được xác định bằng cách sử dụng giao thức 2 và 4 mL. Sản lượng ccfDNA được định lượng bằng xét nghiệm real-time PCR nội bộ cho trình tự mã hóa 18S. Kết quả được tính toán dưới dạng tổng số bản sao cho mỗi giao thức.

Bảng 2. Chênh lệch giữa các giao thức 2 và 4 mL (N= 256)

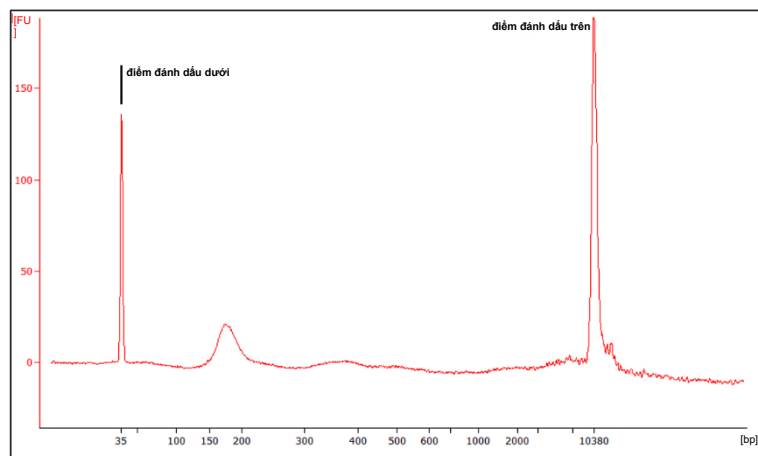
Thông số	Giá trị
Tỷ lệ ước tính bản sao/mL tính toán bình hình học	1,01
Giới hạn tin cậy 95% dưới	0,92
Giới hạn tin cậy 95% trên	1,11
Độ chụm toàn phần	14,12

Hiệu suất của các giao thức cho mẫu đầu vào 2 và 4 mL là tương đương nhau, được đo bằng số bản sao tính toán trên mililit.

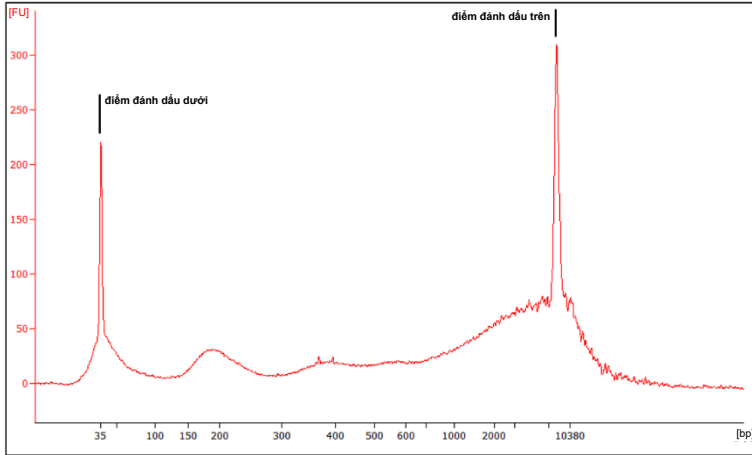
Phân bố kích thước

Để đánh giá sự phân bố kích thước của mẫu đầu ra, ccfDNA từ mẫu đầu vào 4 mL được tách chiết bằng QIASymphony DSP Circulating DNA Kit, rửa giải trong 75 μ L và sau đó 1 μ L dịch rửa giải được phân tích kích thước bằng Agilent® 2100 Bioanalyzer sử dụng Agilent High Sensitivity DNA Chip. Tổng cộng 5 lần lặp lại độc lập đã được thực hiện. Một cấu hình DNA đại diện được trình bày cho huyết tương trong **Hình 4** và cho nước tiểu trong **Hình 5**.

Biểu đồ điện cho huyết tương trong **Hình 4** cho thấy đỉnh thường xuyên quan sát được ở khoảng 165 bp, trong khoảng từ 145 đến 196 bp, nằm trong khoảng chiều dài của DNA liên kết với histone trong nucleosome. Biểu đồ điện cho nước tiểu trong **Hình 5** cho thấy đỉnh lồi ở khoảng 160 bp rộng hơn, trong khoảng từ 145 đến 250 bp. Ngoài ra, đối với nước tiểu, đỉnh thứ hai nằm trong khoảng từ 20 đến 100 bp (ở mức của đỉnh điểm đánh dấu thấp hơn) cho thấy một phần ccfDNA có mức độ phân mảnh cao hơn. Hơn nữa, **Hình 5** cho thấy một số lượng lớn các đoạn DNA dài từ khoảng 2 kb. Thường tìm thấy mức độ phong phú cao của các đoạn DNA bộ gen như vậy trong mẫu nước tiểu rất có thể là do sự giải phóng DNA bộ gen từ các tế bào có trong nước tiểu.



Hình 4. Phân bố kích thước của ccfDNA từ huyết tương (Hồ sơ máy phân tích sinh học). ccfDNA được tách chiết từ 4 mL huyết tương EDTA bằng QIASymphony DSP Circulating DNA Kit; 1 μ L dịch rửa giải được phân tích bằng Agilent High Sensitivity DNA Chip. trục x: kích thước cơ sở (base pair, bp); trục y: đơn vị huỳnh quang (Fluorescence Units, FU).

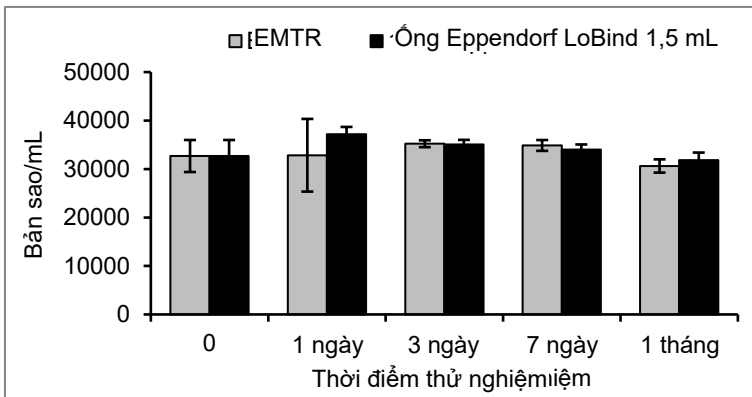


Hình 5. Phân bố kích thước của ccfDNA từ nước tiểu (Hỗ sơ máy phân tích sinh học). ccfDNA được tách chiết từ 4 mL nước tiểu bằng QIASymphony DSP Circulating DNA Kit; 1 μ L dịch rửa giải được phân tích bằng Agilent High Sensitivity DNA Chip. trục x: kích thước cặp cơ sở (base pair, bp); trục y: đơn vị huỳnh quang (Fluorescence Units, FU).

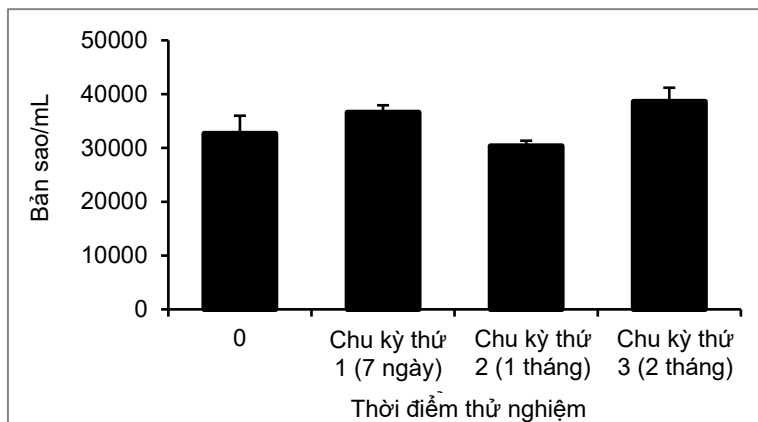
Độ ổn định của dịch rửa giải

Đánh giá độ ổn định của dịch rửa giải cho QIASymphony DSP Circulating DNA Kit bằng cách sử dụng ccfDNA được tách chiết từ nhóm huyết tương EDTA người. Dịch rửa giải được lưu trữ ở 2 loại giá đỡ rửa giải khác nhau: Các ống QIAGEN® EMTR (Elution Microtubes CL 96; số danh mục 19588) và Eppendorf® LoBind® Snap Cap Safe-Lock 1,5 mL. Dịch rửa giải được phân tích theo các lần lặp lại của 8. Độ ổn định của DNA trong các dịch rửa giải đã được xác định bằng xét nghiệm real-time PCR nội bộ cho trình tự mã hóa RNA ribosome 18S.

Độ ổn định của dịch rửa giải ở 2–8 °C không bị ảnh hưởng bởi thời gian bảo quản lên đến một tháng, hoặc bởi loại bảo quản (Hình 6). Độ ổn định của DNA trong ống LoBind không bị ảnh hưởng bởi việc bảo quản ở nhiệt độ từ –15 °C đến –30 °C bao gồm 3 chu kỳ đông lạnh–rã đông sau 7 ngày, một tháng và hai tháng (Hình 7).



Hình 6. Độ ổn định của ccfDNA trong dịch rửa giải được bảo quản ở 2–8 °C trong 2 loại ống. ccfDNA được tách chiết từ huyết tương EDTA bằng QIASymphony DSP Circulating DNA Kit và được bảo quản ở 2–8 °C cho các thời điểm thử nghiệm khác nhau. Sản lượng ccfDNA được định lượng bằng xét nghiệm real-time PCR nội bộ cho trình tự mã hóa 18S. Kết quả được tính toán dưới dạng bản sao đích trên mỗi microlit huyết tương đầu vào.



Hình 7. Độ ổn định của ccfDNA trong dịch rửa giải được bảo quản ở nhiệt độ từ -15 °C đến -30 °C bao gồm 3 chu kỳ đông lạnh-rã đông. ccfDNA được tách chiết từ huyết tương EDTA bằng QIASymphony DSP Circulating DNA Kit và được bảo quản ở nhiệt độ từ -15 °C đến -30 °C trong ống Eppendorf LoBind 1,5 mL. Sản lượng của ccfDNA được xác định tại 3 thời điểm thử nghiệm bằng cách sử dụng cùng một dịch rửa giải ở 3 chu kỳ đông lạnh-rã đông. Sản lượng ccfDNA được định lượng bằng xét nghiệm real-time PCR nội-bộ cho trình tự mã hóa 18S. Kết quả được tính toán dưới dạng bản sao đích trên mỗi mililit huyết tương đầu vào.

Các chất gây nhiễu

Huyết tương và nước tiểu người đã được pha với các chất gây nhiễu tiềm tàng khác nhau (xem Bảng 3) để kiểm tra tác động của chúng đối với hiệu suất tách chiết ccfDNA của QS DSP Circulating DNA Kit và khả năng tương thích sau đó với các xét nghiệm mẫu sau này. Dịch rửa giải được phân tích bằng real-time PCR nội bộ cho trình tự mã hóa 18S và bằng Qubit® Fluorometer sử dụng xét nghiệm dsDNA có độ nhạy cao.

Bảng 3. Kiểm tra nồng độ của các chất gây nhiễu tiềm tàng

Các chất gây nhiễu	Huyết tương	Nước tiểu
Bilirubin	200 mg/lit*	200 mg/lit*
Hemoglobin	2 g/lit [†]	-
BSA và Gamma-Globin	Tối đa 120 g/lit*	1 g/lit [†]
Triglyceride	5 g/lit*	-
Glucose	10 g/lit*	10 g/lit*
Máu	-	1% [†]
pH	-	pH 4 và pH 9 [†]

* CLSI EP7-A2 Tập 25 Số 27

[†] Hướng dẫn Dự thảo của FDA (11.05.2011)

Không có chất nào được liệt kê trong Bảng 3 gây nhiễu, ngoại trừ các mẫu huyết tương có nồng độ gamma-globulin cao (> 30 g/lit) có thể dẫn đến giảm khả năng phục hồi của DNA lưu thông tự do.

Lưu ý: Thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng các ứng dụng mẫu sau này để đánh giá chất lượng của các axit nucleic được tách chiết. Tuy nhiên, các ứng dụng khác nhau sau này có thể có các yêu cầu khác nhau về độ tinh (tức là không có các chất gây nhiễu tiềm tàng), do đó, cũng cần thiết lập việc xác định và thử nghiệm các chất liên quan như một phần của quá trình phát triển ứng dụng sau này cho bất kỳ quy trình công việc nào liên quan đến QIASymphony DSP Circulating DNA kit.

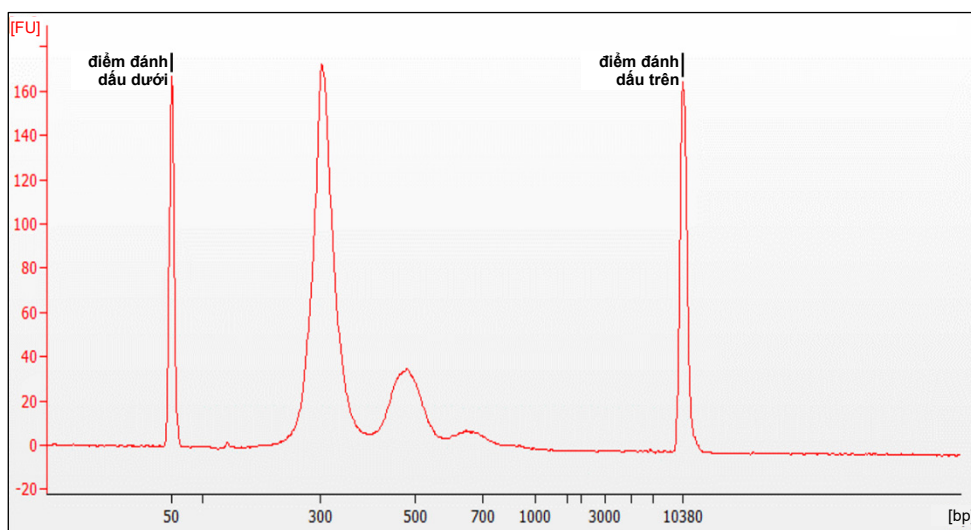
Nhiễm bản chéo

Nguyên cơ nhiễm bản chéo của hệ thống QIASymphony DSP Circulating DNA được phân tích bằng cách thực hiện ba lần chạy 96 mẫu trên dụng cụ QIASymphony SP với các lô bàn cờ xen kẽ (các mẫu dương tính và âm tính xen kẽ). Các huyết tương nữ (mẫu âm tính) và huyết tương nữ được pha với gDNA nam đã cắt nhỏ có nồng độ $1,0E+05$ bản sao gen SRY1 trên mỗi mililit huyết tương (mẫu dương tính) được sử dụng làm vật liệu mẫu cho hệ thống mô hình. Chuẩn bị mẫu được thực hiện theo giao thức 4 mL bao gồm hai lần chuyển mẫu riêng biệt với mỗi thể tích 2 mL. Khả năng nhiễm bản chéo của các mẫu huyết tương nữ âm tính trong quá trình tách chiết được đánh giá bằng cách phân tích tiếp theo dịch rửa giải sử dụng real-time PCR cho gen SRY1 đặc hiệu của nhiễm sắc thể Y. Không phát hiện nhiễm bản chéo giữa mẫu với mẫu, lô với lô, hoặc lần chạy với lần chạy.

Khả năng tương thích với các ứng dụng khác nhau sau này

Các ứng dụng mẫu sau này được sử dụng trong quá trình phát triển QIASymphony DSP Circulating DNA kit để chứng minh rằng các axit nucleic được phân lập tương thích với một loạt các công nghệ ứng dụng khác nhau sau này, bao gồm Real Time-PCR (xem Hình 1, Hình 2, Hình 3, Hình 6 và Hình 7), Qubit Fluorometer (xét nghiệm protein và xét nghiệm dsDNA độ nhạy cao), Library (xem Hình 8), và Next Generation Sequencing (NGS).

Biểu đồ điện trong Hình 8 cho thấy một ví dụ về việc thất thành công bộ tiếp hợp và khuếch đại ccfDNA sau đó. Bên cạnh đỉnh lồi ở 300 bp đối với ccfDNA nucleosome (khoảng 165 cộng với khoảng 70 bp cho mỗi bộ tiếp hợp), cũng có thể nhìn thấy đỉnh di-nucleosome ở khoảng 470 bp.



Hình 8. DNA Library của ccfDNA (người hiến duy nhất) được tách chiết bằng QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. ccfDNA được tách chiết từ huyết tương Streck bằng cách sử dụng giao thức 4 mL, sau đó 35 μ L dịch rửa giải được chuyển vào NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit (Biolabs). Sau khi khuếch đại và làm sạch AMPure XP, 1 μ L dịch rửa giải được phân tích bằng Agilent 7500 DNA Kit.

Biểu tượng

Các biểu tượng sau đây xuất hiện trong các hướng dẫn sử dụng hoặc trên bao bì và nhãn dán:

Biểu tượng	Định nghĩa biểu tượng
	Chứa thuốc thử đủ cho <N> phản ứng
	Hạn sử dụng
	Sản phẩm này đáp ứng các yêu cầu của Quy định Châu Âu 2017/746 đối với các thiết bị y tế chẩn đoán trong ống nghiệm.
	Thiết bị y tế chẩn đoán trong ống nghiệm
	Số danh mục
	Số lô
	Số vật liệu (nghĩa là nhãn thành phần)
	Thành phần
	Chứa
	Số
	Mã số Thương phẩm Toàn cầu
Rn	R là lần sửa đổi Hướng dẫn Sử dụng và n là số sửa đổi
	Giới hạn nhiệt độ
	Nhà sản xuất
	Tham khảo hướng dẫn sử dụng
	Cảnh báo/thận trọng
	Proteinase K
	Số lọ (tức là lọ hộp thuốc thử)
	Hộp thuốc thử
	Natri azua

Biểu tượng

Định nghĩa biểu tượng

EtOH

Ethanol

UDI

Mã định danh thiết bị duy nhất

Lịch sử Sửa đổi

Lần sửa đổi	Mô tả
Lần sửa đổi 1, tháng 6 năm 2022	Phiên bản 2 Lần sửa đổi 1 <ul style="list-style-type: none">Cập nhật lên phiên bản 2 để tuân thủ IVDRĐã thêm phần dành cho các chất gây nhiễu, nhiễm bẩn chéo và khả năng tương thích với các ứng dụng sau này

Để biết thông tin cập nhật về cấp phép và tuyên bố từ bỏ trách nhiệm cụ thể theo sản phẩm, xem sổ tay hoặc hướng dẫn sử dụng bộ dụng cụ QIAGEN tương ứng. Sổ tay và hướng dẫn sử dụng bộ dụng cụ QIAGEN có sẵn tại www.qiagen.com hoặc có thể được yêu cầu từ bộ phận Dịch vụ Kỹ thuật QIAGEN hoặc nhà phân phối tại địa phương của bạn.

Nhãn hiệu: QIAGEN®, Sample to Insight® (Tập đoàn QIAGEN); Cell-Free DNA Urine Preserve®, Cell-Free DNA BCT®, Streck® (Streck); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.); Eppendorf®, LoBind® (Eppendorf AG); NEBNext® (New England Biolabs, Inc.); Qubit® (Thermo Fisher Scientific or its subsidiaries). Các tên, nhãn hiệu, v.v. đã đăng ký được sử dụng trong tài liệu này, kể cả khi không được đánh dấu cụ thể như vậy được coi là được bảo vệ về pháp lý.

HB-3034-D01-001 © 2022 QIAGEN, tất cả quyền được bảo lưu.

Trang này được để trống có chủ ý

