



Červen 2022

Návod k použití sady QIASymphony® DSP DNA Kit (charakteristiky funkčních vlastností)

Verze 2



K diagnostickému použití in vitro

K použití se sadami QIASymphony DSP DNA Mini Kit a QIASymphony DSP DNA Midi Kit



937236, 937255



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Německo

R1

Charakteristiky funkčních vlastností jsou k dispozici v elektronické podobě a lze je nalézt v záložce zdrojů na produktové stránce na adrese www.qiagen.com.

Obecný úvod

Sady QIASymphony DSP DNA Kit jsou určeny k použití spolu s přístrojem QIASymphony SP.

Sady QIASymphony DSP DNA Mini Kit poskytují reagentie pro automatizovanou purifikaci celkové DNA z lidské plné krve, vrstvy buffy coat, tkání a vzorků tkání fixovaných formalínem a zalitých parafínem (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded FFPE), jakož i virové DNA z lidské plné krve. Sady QIASymphony DSP DNA Midi Kits poskytují reagentie pro automatickou purifikaci celkové DNA z lidské plné krve a vrstvy buffy coat. Charakteristiky funkčních vlastností pro každou zkumavku pro odběr krve nebo typ tkáně však nebyly stanoveny a musí být ověřeny uživatelem.

Technologie magnetických částic umožňuje purifikaci vysoce kvalitních nukleových kyselin, které neobsahují bílkoviny, nukleázy ani jiné nečistoty. Purifikované nukleové kyseliny jsou připraveny k přímému použití v následných aplikacích, jako jsou amplifikační reakce (PCR). QIASymphony SP provádí všechny kroky postupu purifikace. V jednom cyklu se zpracovává až 96 vzorků v šaržích až po 24 vzorcích.

V následujícím textu jsou uvedeny vybrané údaje o výkonu pro různé aplikace.

Charakteristika funkčních vlastností

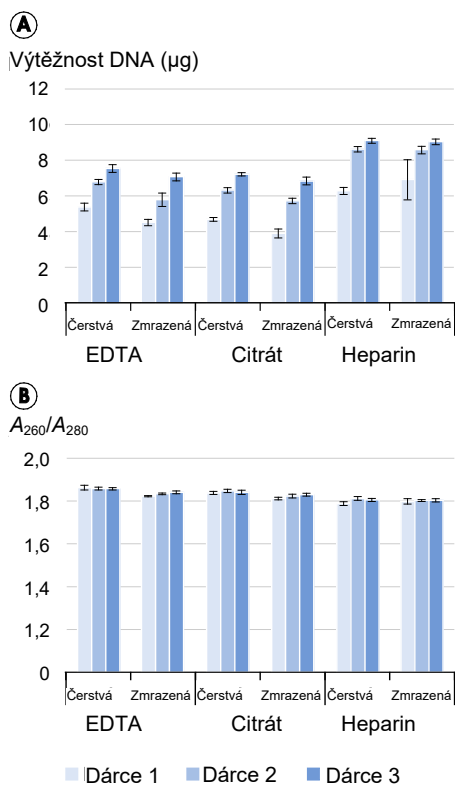
Poznámka: Charakteristiky funkčních vlastností jsou velmi závislé na různých faktorech a souvisejí s konkrétní následnou aplikací. Byly stanoveny pro sady QIASymphony DSP DNA Mini a Midi Kit ve spojení s příkladnými následnými aplikacemi. Metody izolace nukleových kyselin z biologických vzorků se však používají jako předstupeň pro řadu navazujících aplikací. Pro každý takový pracovní postup je třeba v rámci vývoje navazující aplikace stanovit výkonnostní parametry, jako je křížová kontaminace nebo přesnost běhu. Proto je povinností uživatele ověřit celý pracovní postup a stanovit vhodné výkonnostní parametry.

Základní funkce a kompatibilita s různými navazujícími aplikacemi

DNA krev a vrstva buffy coat

Výtěžnost DNA

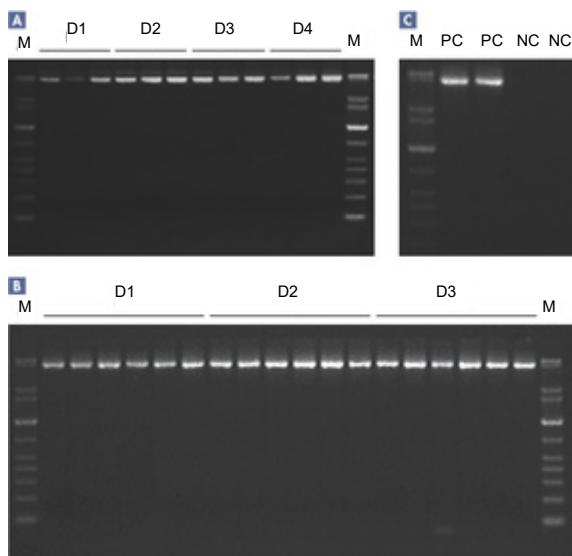
Základní funkce sady QIASymphony DSP DNA Mini Kit byla hodnocena s použitím různých zkumavek a antikoagulantů a také čerstvé a zmrazené lidské plné krve. Plná krev byla odebrána 3 zdravým dárcům (počet bílých krvinek [WBC] 4,0 až 11,0 x 10⁶ buněk/ml) do 3 různých typů zkumavek: EDTA, 10 ml BD™ Vacutainer® 16 x 100 mm (K2-EDTA); citrát, 2,7 ml Sarstedt® S-Monovette® 9NC Tube 13 x 75 mm (citrát); heparin, 7,5 ml Sarstedt S-Monovette 15 x 92 mm (Li-Heparin). Krev byla použita buď čerstvá (uchovávaná při 2–8 °C), nebo zmrazená (uchovávaná při –20 °C). Genomická DNA byla purifikována z 200 µl vzorků se 4 replikáty na dárce a typ zkumavky pomocí sady QIASymphony DSP DNA Mini Kit a protokolu DNA Blood 200 DSP s elučním objemem 200 µl. Výtěžnost a čistota DNA byly stanoveny pomocí spektroskopické analýzy (obrázek 1).



Obrázek 1. Výtěžnost a čistota DNA při použití různých zkumavek pro odběr vzorků a antikoagulantů s čerstvou a zmrazenou lidskou plnou krví. A Výtěžnost DNA, úsečky znázorňují absolutní výtěžnost DNA se směrodatnou odchylkou. **B** Čistota DNA, úsečky ukazují čistotu DNA se směrodatnou odchylkou.

Integrita DNA

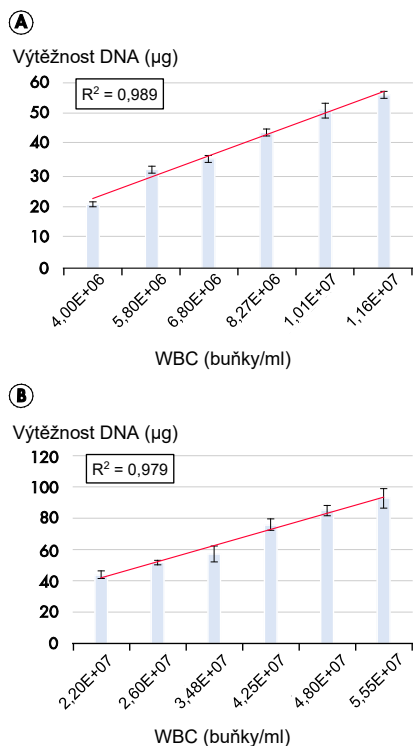
Produkty PCR dlouhého dosahu (5 kb) byly amplifikovány pomocí analýzy LongRange PCR (obrázek 2).



Obrázek 2. Integrita DNA testována pomocí PCR s dlouhým dosahem. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder. **A** Plná krev byla odebrána 4 zdravým dárčům (D) do zkumavek BD K2E. Genomická DNA pro tzv. long-range PCR (amplifikace dlouhých úseků DNA) byla purifikována z 200 μ l alikvotů ve třech replikátech pomocí sady QIASymphony DSP DNA Mini Kit a protokolu Blood 200 DSP s elučním objemem 200 μ l. D1, dárce 1; D2, dárce 2; D3, dárce 3; D4, dárce 4 **B** Plná krev byla odebrána 3 zdravým dárčům do zkumavek BD K2E a byl připraven tzv. buffy coat. Genomická DNA byla purifikována z 200 μ l alikvotů v šesti replikátech pomocí sady QIASymphony DSP DNA Mini Kit a protokolu Buffy Coat 200 DSP s elučním objemem 200 μ l. D1, dárce 1; D2, dárce 2; D3, dárce 3. **C** kontroly: PC = pozitivní kontrola; NC = negativní kontrola.

Korelace výtěžnosti DNA s počtem WBC

Výkon pro aplikace QIASymphony DSP DNA Blood a buffy coat byl hodnocen pomocí vzorků krve a buffy coat s 6 různými počty WBC pro každý typ vzorku. U plné krve se počet WBC pohyboval od 4×10^6 buněk/ml do $11,6 \times 10^6$ buněk/ml a u buffy coat od $2,2 \times 10^7$ buněk/ml do $5,6 \times 10^7$ buněk/ml. Výtěžnost DNA byla stanovena spektroskopickou analýzou a vynesena do grafu v závislosti na počtu WBC (obrázek 3).



Obrázek 3. Korelace výtěžnosti DNA s počtem WBC. A Genomická DNA byla purifikována z 1 ml plné lidské krve pomocí sady QIASymphony DSP DNA Midi Kit a protokolu Blood 1000 DSP s elučním objemem 500 µl. Úsečky znázorňují absolutní výtěžnost DNA se směrodatnou odchylkou. B Genomická DNA byla purifikována ze 400 µl vrstvy buffy coat pomocí sady QIASymphony DSP DNA Midi Kit a protokolu Buffy Coat 400 DSP s elučním objemem 400 µl. Úsečky znázorňují absolutní výtěžnost DNA se směrodatnou odchylkou.

Krev s viry

Studie míry zásahu byly provedeny naředěním předem kvantifikovaného standardního materiálu CMV WHO v CMV negativní lidské plné krvi. U vzorků s virovou náloží 90 IU CMV na mililitr byla zjištěna 100% míra detekce (tabulka 1).

Tabulka 1. Citlivost aplikace QIASymphony DSP Virus Blood

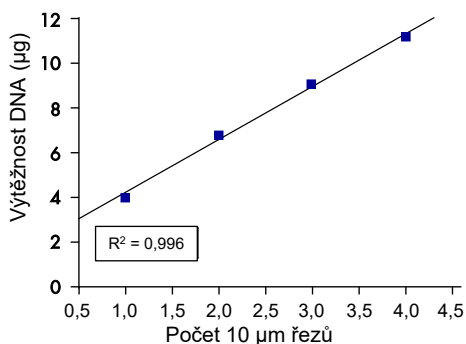
CMV (IU/ml)	Replikáty	Zásahy	Zásah (%)
350	18	18	100,00
230	32	32	100,00
115	31	31	100,00
90	32	32	100,00
60	30	24	80,00
30	30	15	50,00
15	30	10	33,33
6	21	5	23,81
2	21	2	9,52
0	15	0	0,00

Lidská plná krev byla odebrána jednomu zdravému CMV negativnímu dárci do zkumavek BD K2E a byla doplněna standardním materiálem CMV WHO s použitím různých titrů. Virová DNA byla purifikována pomocí sady QIASymphony DSP DNA Mini Kit a protokolu Virus blood 200 DSP s elučním objemem 60 µl. Eluáty byly analyzovány pomocí analýzy CMV real-time PCR.

Tkáně a tkáně FFPE

Výtěžnost DNA

Výkonnost aplikace QIASymphony DSP DNA tkáně FFPE byla hodnocena pomocí 6 replikátů 1–4, 10 µm, FFPE řezů čerstvě nařezané lidské sleziny. Extrakce DNA byla provedena pomocí sady QIASymphony DSP DNA Mini Kit ve spojení s protokolem DSP pro nízký obsah tkáně. Deparafinizace a lýza byly provedeny metodou předběžné úpravy xylenem a etanolem. DNA byla eluována v 50 µl elučního pufru a výtěžnost DNA byla stanovena spektroskopickou analýzou (obrázek 4).



Obrázek 4. Korelace výtěžnosti DNA s počtem řezů tkáně FFPE. Šest replikátů 1–4, 10 µm, FFPE tkáňových řezů lidské sleziny bylo deparafinováno předúpravou xylenem/etanolem. Extrakce DNA byla provedena v přístroji QIASymphony SP pomocí sady QIASymphony DSP DNA Mini Kit ve spojení s protokolem DSP pro nízký obsah tkáni a elučním objemem 50 µl.

Analýza mutačního stavu biomarkerů pomocí real-time PCR

Analýza mutačního stavu biomarkerů byla provedena pomocí DNA extrahované z FFPE řezů lidského tlustého střeva a DNA extrahované ze vzorků lidské plicní tkáně.

Pro extrakci DNA ze vzorků tkáně FFPE byly použity 3 x 10 µm řezy lidského tlustého střeva pro přípravu vzorků. Extrakce DNA byla provedena pomocí deparafinizačního roztoku Deparaffinization Solution v rámci předběžné přípravy a protokolu DSP pro nízký obsah tkáně ve spojení se 100 µl elučního objemu. Mutační analýza biomarkeru KRAS byla provedena pomocí analýzy PCR v reálném čase pro detekci KRAS v souladu s příručkou k analýze. Hodnoty C_T kontrolní analýzy byly v definovaném rozmezí a analýza detekce mutace odhalila aminokyselinovou substituci v kodonu 12, což se projevilo hodnotou ΔCT 4,17, což je pod definovanou mezní hodnotou 8 pro detekci mutace 12SER (tabulka 2).

Tabulka 2. Výsledky mutační analýzy biomarkerů KRAS ve tkáni FFPE

Vzorek	Reakce	Cílová C _T	Interní kontrolní C _T	ΔC _T *
Beztemplátová kontrola	Kontrola	0,00	32,75	–
	12ALA	0,00	32,65	–
	12ASP	0,00	32,69	–
	12ARG	0,00	32,86	–
	12CYS	0,00	32,35	–
	12SER	0,00	32,76	–
	12VAL	0,00	32,41	–
	13ASP	0,00	32,26	–
Standard	Kontrola	25,95	32,73	–
	12ALA	26,39	32,29	0,44
	12ASP	26,54	32,15	0,59
	12ARG	26,35	32,14	0,40
	12CYS	26,31	32,47	0,36
	12SER	26,50	32,34	0,55
	12VAL	25,80	31,92	-0,15
	13ASP	27,09	32,54	1,14
Tkáň FFPE (lidské tlusté střevo)	Kontrola	24,94	31,98	–
	12ALA	nezjištěno	32,42	–
	12ASP	nezjištěno	32,73	–
	12ARG	nezjištěno	33,05	–
	12CYS	nezjištěno	32,74	–
	12SER	29,11	32,34	4,17
	12VAL	nezjištěno	32,81	–
	13ASP	nezjištěno	33,20	–

* ΔC_T = M C_T – C C_T, kde M znamená mutaci a C znamená kontrolu; n.z., nezjištěno.

Extrakce DNA ze zmrazených vzorků tkáně: pro přípravu vzorku bylo použito 25 mg tkáně lidských plic s využitím protokolu DSP pro vysoký obsah tkáně a 200 μl elučního objemu. Mutační analýza biomarkeru EGFR byla provedena pomocí analýzy PCR v reálném čase pro EGFR. Analýza kontroly a detekce mutací byla provedena podle popisu v příručce analýzy. Výsledky odhalily delecí v genu EGFR, což dokazuje hodnota ΔC_T 2,47, která je nižší než definovaná mezní hodnota 12 pro detekci mutace (tabulka 3).

Tabulka 3. Výsledky mutační analýzy biomarkerů EGFR ve zmrazené tkáni

Vzorek	Reakce	Cílová C _T	Interní kontrolní C _T	ΔC _T *
Beztemplátová kontrola	Kontrola	0,00	31,71	–
	T790M	0,00	32,36	–
	Delece	0,00	31,75	–
	L858R	0,00	32,05	–
	L861Q	0,00	31,77	–
	G719X	0,00	31,68	–
	S768I	0,00	32,25	–
	Ins	0,00	31,84	–
	Standard	Kontrola	28,78	31,05
T790M		30,08	31,13	1,30
Delece		28,23	31,19	-0,55
L858R		27,58	30,83	-1,20
L861Q		27,80	30,86	-0,98
G719X		27,80	30,90	-0,98
S768I		29,28	31,41	0,50
Ins		28,00	31,64	-0,78
Tkáň (lidské plíce)		Kontrola	25,76	31,23
	T790M	nezjištěno	31,99	–
	Delece	28,23	30,99	2,47
	L858R	nezjištěno	31,33	–
	L861Q	nezjištěno	31,98	–
	G719X	nezjištěno	32,06	–
	S768I	nezjištěno	31,88	–
	Ins	nezjištěno	31,62	–

* ΔC_T = M C_T – C C_T, kde M znamená mutaci a C znamená kontrolu; n.z., nezjištěno.

Opakovatelnost a reprodukovatelnost

Krevní DNA

Extrakce DNA byla provedena s využitím protokolu Blood 200 DSP s elučním objemem 200 μ l. Opakovatelnost byla hodnocena jedním operátorem, který provedl 3 nezávislé série (po 96 vzorcích) ve 3 různých dnech, přičemž každá série se skládala ze 4 šarží po 24 vzorcích (tabulka 4 a tabulka 5).

Reprodukovatelnost byla hodnocena provedením 3 nezávislých sérií (po 96 vzorcích) ve 3 různých dnech 3 různými operátory na různých přístrojích QIASymphony SP, přičemž každá série se skládala ze 4 šarží po 24 vzorcích (tabulka 6 a tabulka 7).

Tabulka 4. Výsledky hodnocení opakovatelnosti

Cyklus	Šarže	<i>n</i>	Průměrná výtěžnost DNA (μ g)	SD	CV
1	1	24	5,32	0,22	4,22
	2	24	4,90	0,22	4,54
	3	24	4,95	0,21	4,26
	4	24	5,05	0,18	3,60
2	1	24	5,17	0,30	5,84
	2	24	4,90	0,15	3,14
	3	24	4,82	0,20	4,13
	4	24	4,87	0,17	3,52
3	1	24	5,11	0,17	3,33
	2	24	4,84	0,24	4,91
	3	24	4,87	0,16	3,38
	4	24	4,78	0,16	3,38
Celkem	–	288	4,96	–	–

n, počet replikátů; SD, směrodatná odchylka; CV, variační koeficient.

Tabulka 5. Údaje o přesnosti pro hodnocení opakovatelnosti

	SD	CV
Srovnání šarží v rámci stejného běhu	0,25	4,95
Celková přesnost při opakování	0,26	5,18

SD, směrodatná odchylka; CV, variační koeficient.

Tabulka 6. Výsledky hodnocení reprodukovatelnosti

Cyklus	Šarže	n	Průměrná výtěžnost DNA (μg)	SD	CV
1	1	24	5,32	0,22	4,22
	2	24	4,90	0,22	4,54
	3	24	4,95	0,21	4,26
	4	24	5,05	0,18	3,60
2	1	24	5,73	0,22	3,81
	2	24	5,56	0,26	4,63
	3	24	5,40	0,20	3,63
	4	24	5,46	0,21	3,89
3	1	24	5,73	0,26	4,62
	2	24	5,54	0,24	4,40
	3	24	5,41	0,18	3,34
	4	24	5,49	0,17	3,16
Celkem	–	288	5,38	–	–

n, počet replikátů; SD, směrodatná odchylka; CV, variační koeficient.

Tabulka 7. Údaje o přesnosti pro hodnocení reprodukovatelnosti

	SD	CV
Srovnání šarží v rámci stejného běhu	0,25	4,73
Celková přesnost při opakování	0,38	7,03

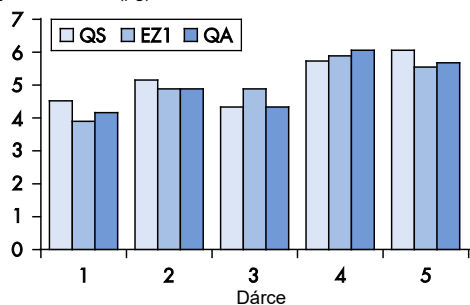
SD, směrodatná odchylka; CV, variační koeficient.

Srovnávací výkon

Krev DNA

Byla analyzována výkonnost krevního systému QIASymphony DSP DNA ve srovnání s krevním systémem EZ1® DSP DNA a manuálním postupem přípravy sady QIAamp® DNA Blood Mini Kit. DNA byla purifikována z různých krevních vzorků a analyzována na výtěžnost DNA (obrázek 5).

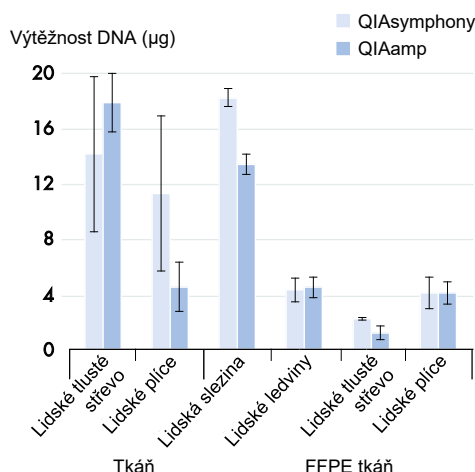
Výtěžnost DNA (μg)



Obrázek 5. Srovnání výtěžnosti DNA mezi různými systémy purifikace krevní DNA. Plná krev byla odebrána 5 zdravým dárcům do zkumavek BD K2E. U všech metod byly použity vstupní objemy vzorků 200 μl a eluční objemy 200 μl. QS, sada QIASymphony DSP DNA Mini Kit a protokol DSP Blood 200; EZ1, EZ1 Advanced XL s použitím sady EZ1 DSP DNA Blood Kit; QA, sady QIAamp DNA Blood Mini Kit. Úsečky ukazují absolutní výtěžnost DNA pro každý vzorek.

Tkáně a tkáně FFPE

Výkonnost sady QIASymphony DSP DNA Mini Kit byla porovnána s výkonností ruční sady QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit a soupravy QIAamp DSP DNA Mini Kit, přičemž jako materiál vzorku byla použita tkáň FFPE a čerstvá a zmrazená tkáň. Ruční a automatická příprava vzorků a kvantifikace výtěžnosti DNA byly prováděny současně. Výtěžnosti DNA po extrakci z čerstvých/zmražených vzorků tkání a vzorků tkání FFPE pomocí sady QIASymphony DSP DNA Mini Kit, QIAamp DSP DNA Mini Kit (tkáň) a sady QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (tkáň FFPE) jsou uvedeny na obrázku 6.



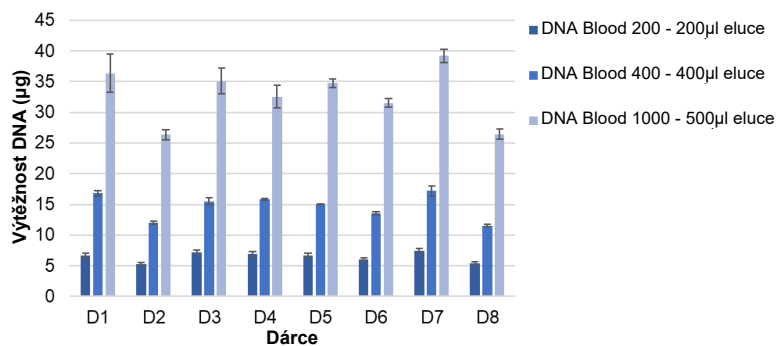
Obrázek 6. Extrakce DNA ze vzorků tkání a FFPE tkání. Čerstvá/zmrazená tkáň: vzorky lidských plic a tlustého střeva byly rozřezány na 6 25mg kousků. Tři kousky každého typu tkáně byly použity na přípravu vzorku s využitím přístroje QIASymphony SP ve spojení s protokolem DSP pro vysoký obsah tkáně. Extrakce DNA ze zbývajících vzorků byla provedena pomocí sady QIAamp DSP DNA Mini Kit. DNA byla eluována v objemu 200 µl a výtěžnost DNA byla stanovena spektroskopickou analýzou. Pro extrakci DNA z tkáně FFPE bylo připraveno 12 replikátů obsahujících řezy tkáně FFPE o velikosti 3 x 10 µm z různých lidských orgánů. Šest vzorků bylo použito pro přípravu vzorku s využitím přístroje QIASymphony SP ve spojení s předběžnou přípravou v deparafinizačním roztoku Deparaffinization Solution a protokolem DSP pro nízký obsah tkáně. Extrakce DNA ze zbývajících vzorků byla provedena pomocí sady QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. DNA byla eluována v objemu 50 µl a výtěžnost DNA byla stanovena spektroskopickou analýzou. Úsečky znázorňují absolutní výtěžnost DNA se směrodatnou odchylkou.

Rozsah vstupu/výstupního eluátu vzorku

Krevní DNA

Různé rozsahy vstupních vzorků a výstupních eluátů pro aplikaci DNA z krve byly porovnány pomocí vzorků od dárců krve s rozsahem počtu WBC od 5,0 do 8,0 x 10⁶ buněk/ml.

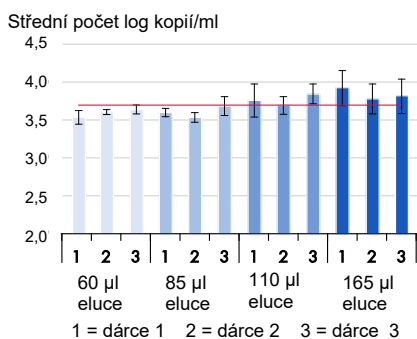
Plná krev byla odebrána 8 zdravým dárcům do zkumavek BD K2E. DNA byla purifikována ze 6 replikátů, z nichž každý byl přečištěn pomocí sady QIASymphony DSP DNA Mini/Midi Kit a protokolu DNA blood 200 DSP s elučním objemem 200 µl, protokolu DNA blood 400 DSP s elučním objemem 400 µl a protokolu DNA blood 1000 DSP s elučním objemem 500 µl (obrázek 7).



Obrázek 7. Srovnání různých vstupů vzorků a elučních objemů pro systémy purifikace krevní DNA. Plná krev byla odebrána 8 zdravým dárčům do zkumavek BD K2E. Extrakce DNA byla provedena pomocí protokolu DNA blood 200 s elučním objemem 200 µl, protokolu DNA blood 400 s elučním objemem 400 µl a protokolu DNA blood 1000 s elučním objemem 500 µl. Výtěžnost DNA byla stanovena spektroskopickou analýzou. Sloupce ukazují absolutní výtěžnost DNA (průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou) pro každého dárce.

Krev s viry

Plná krev byla odebrána 3 zdravým dárčům s počtem WBC v rozmezí 4,0 až 11,0 x 10⁶ buněk/ml do zkumavek BD K2E a byla doplněna standardním materiálem CMV (titr 3,7 log kopií/ml). Virová DNA byla purifikována ze 7 replikátů ve všech případech pomocí sady QIAasymphony DSP DNA Mini Kit a protokolu Virus Blood 200 DSP se 4 různými elučními objemy (obrázek 8).



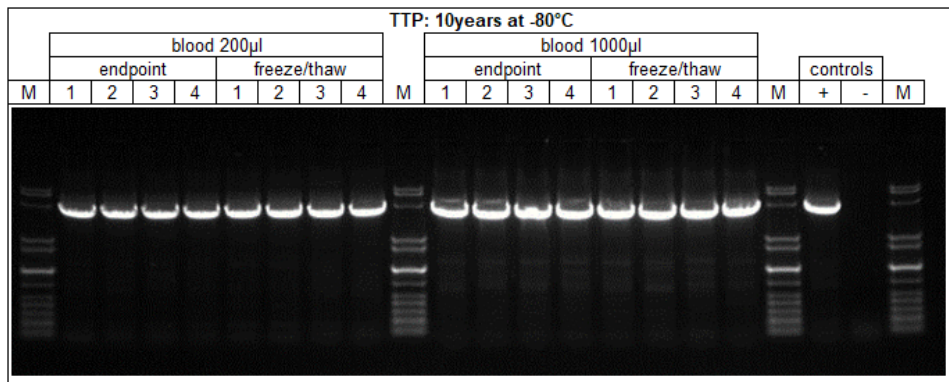
Obrázek 8. Srovnání kvantifikace virové DNA pro různé eluční objemy. Eluáty z každého dárcovského vzorku a elučního objemu (60, 85, 110 a 165 µl) byly analyzovány pomocí analýzy CMV PCR v reálném čase. Červená čára představuje cílový titr a úsečky ukazují průměrné logaritmy kopií na mililitr se směrodatnou odchylkou.

Stabilita eluátů

Poznámka: Stabilita eluátů závisí na různých faktorech a souvisí s konkrétní následnou aplikací. Byly stanoveny pro sadu QIAasymphony DSP DNA Mini a Midi Kit ve spojení s příkladnými navazujícími aplikacemi. Uživatel je povinen konzultovat návod k použití konkrétní navazující aplikace používané v jeho laboratoři a/nebo ověřit celý pracovní postup za účelem stanovení vhodných podmínek skladování.

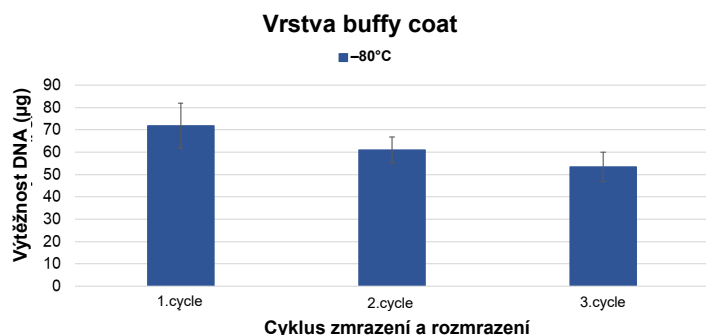
DNA krev a vrstva buffy coat

Stabilita eluátů pro aplikaci DNA krve byla testována pomocí eluátů z cyklů QS provedených protokolem DNA Blood 200 s elučním objemem 200 μ l a protokolem DNA Blood 1000 s elučním objemem 500 μ l. Eluáty byly uchovávány ve 2ml Sarstedtových zkumavkách při pokojové teplotě, 2–8 $^{\circ}$ C, –20 $^{\circ}$ C a –80 $^{\circ}$ C. Výtěžnost a čistota DNA byly stanoveny spektroskopickou analýzou. Integrita DNA byla analyzována pomocí gelové elektroforézy a analýzy LongRange PCR (obrázek 9).



Obrázek 9. Stabilita eluátů pro krevní DNA. DNA byla přečištěna pomocí protokolů DNA Blood 200 μ l a 1000 μ l. Eluáty byly uchovávány při teplotě –80 $^{\circ}$ C ve 2ml Sarstedtových zkumavkách. Byly analyzovány čtyři replikáty. Integrita DNA byla testována pomocí PCR s dlouhým dosahem. Na obrázcích jsou uvedeny výsledky po desetiletém skladování. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder.

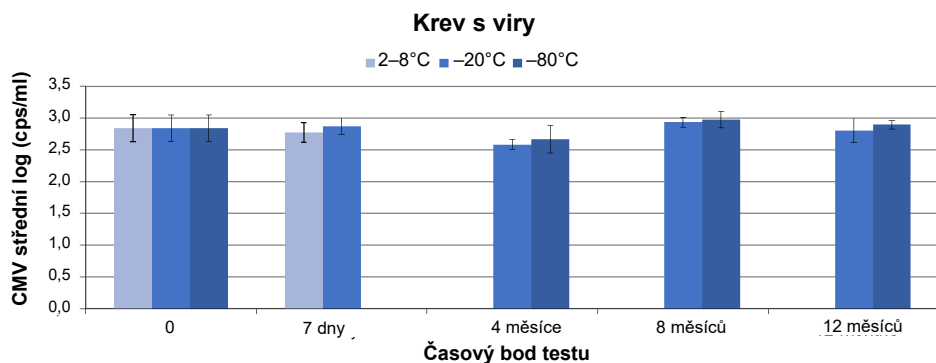
Stabilita eluátů pro aplikaci buffy coat byla testována s použitím eluátů z cyklů QS provedených s protokolem BC 400 μ l a elučním objemem 200 μ l. Eluáty byly uchovávány ve 2 ml Sarstedtových zkumavkách a stojancích na eluční mikrozskumavky při pokojové teplotě, 2–8 $^{\circ}$ C, –20 $^{\circ}$ C a –80 $^{\circ}$ C. Kromě toho byly eluáty podrobeny testům zmrazení/rozmrazení až po dobu 3 cyklů (obrázek 10). Výtěžnost a čistota DNA byly stanoveny spektroskopickou analýzou. Integrita DNA byla analyzována pomocí gelové elektroforézy a analýzy LongRange PCR (50 μ l reakce).



Obrázek 10. Cykly zmrazení a rozmrazení eluátu pro vrstvu buffy coat. DNA byla purifikována pomocí protokolu DNA BC 400 μ l. Vrstva buffy coat byla vytvořena z krve EDTA. Eluáty byly uloženy do 2ml Sarstedtových zkumavek. Výtěžnost DNA byla stanovena v testovaných časových bodech za použití stejného eluátu při 3 cyklech zmrazení a rozmrazení. Výtěžnost DNA byla stanovena spektroskopickou analýzou. Úsečky ukazují absolutní výtěžnost DNA (střední hodnota se směrodatnou odchylkou).

Krev s viry

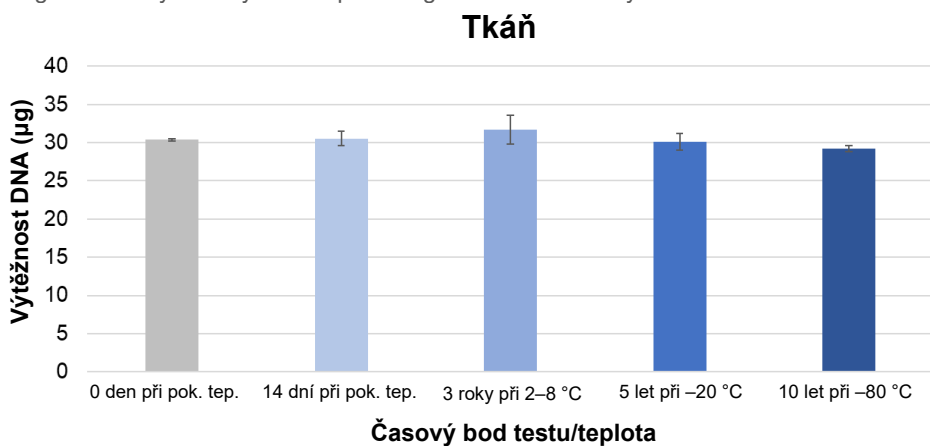
Stabilita eluátu pro aplikaci krve s viry byla testována pomocí eluátů z cyklů QS provedených protokolem Virus Blood 200 s elučním objemem 60 μ l. Jako vzorek byla použita krev K2 EDTA s komerčním standardem CMV (titr 2,7 log kopií/ml). Eluáty byly uchovávány ve 2ml Sarstedtových zkumavkách při teplotách 2–8 °C, –20 °C a –80 °C. Eluáty byly analyzovány pomocí analýzy CMV v reálném čase (obrázek 11). V následujícím textu jsou uvedeny výsledky několika časových bodů testu.



Obrázek 11. Stabilita eluátů pro aplikaci na krev s viry. Vzorky krve EDTA obohacené s komerčním standardem CMV byly purifikovány protokolem Virus Blood 200. Eluáty byly uchovávány při různých teplotách ve stojanech na zkumavky Elution Micro a ve 2ml zkumavkách Sarstedt. Pro každý časový bod testu byly analyzovány 4 replikáty. Úsečky ukazují titer CMV (střední logaritmická hodnota se směrodatnou odchylkou).

Tkáň

Stabilita eluátu pro tkáňovou aplikaci byla testována pomocí protokolu Tissue HC 200 μ l a elučního objemu 200 μ l. Jako vzorek byla použita čerstvá hovězí játra. Eluáty byly uchovávány ve 2ml Sarstedtových zkumavkách a stojancích na eluční mikrozkušavky při pokojové teplotě, 2–8 °C, –20 °C a –80 °C. Výtěžnost a čistota DNA byly stanoveny pomocí spektroskopické analýzy (obrázek 12). Integrita DNA byla analyzována pomocí gelové elektroforézy.

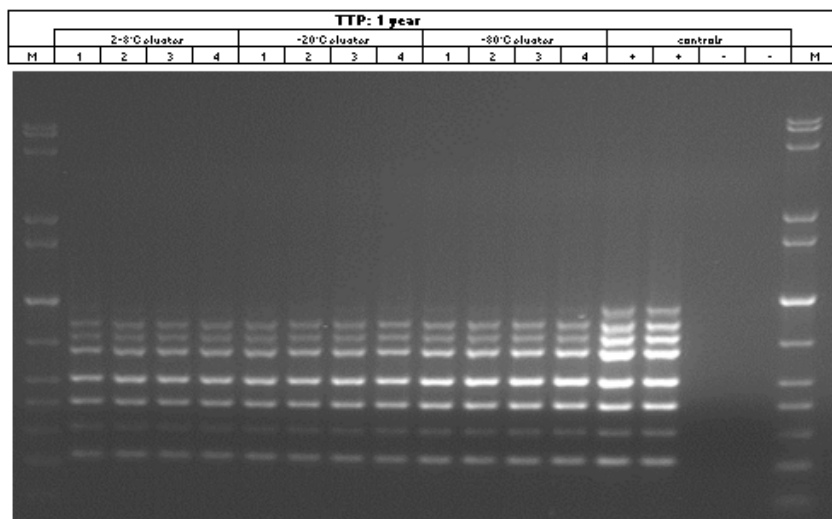


Obrázek 12. Stabilita eluátů pro tkáň. DNA byla přečištěna pomocí protokolu DNA Tissue HC s elučním objemem 200 μ l. Jako vzorek byla použita čerstvá hovězí játra. Eluáty byly uchovávány při různých teplotách ve stojanech na zkumavky Elution Micro a ve 2ml zkumavkách Sarstedt. Pro každý časový bod testu byly analyzovány 4 replikáty. Výtěžnost DNA byla stanovena spektroskopickou analýzou. Úsečky ukazují absolutní výtěžnost DNA (střední hodnota se směrodatnou odchylkou).

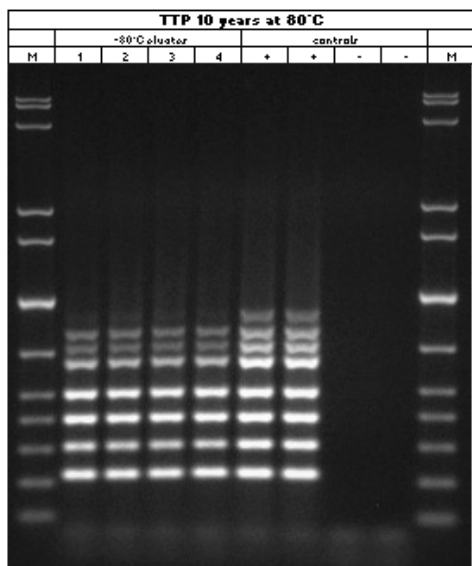
Tkáň FFPE

Stabilita eluátů pro aplikaci na tkáň FFPE byla testována pomocí protokolu Tissue LC 200 μl a elučního objemu 100 μl . Jako vzorový materiál byla použita komerční lidská tkáň FFPE. Eluáty byly uchovávány ve 2ml Sarstedtových zkumavkách a stojancích na eluční mikrozskumavky při pokojové teplotě, 2–8 °C, –20 °C a –80 °C. Eluáty byly analyzovány pomocí analýzy Inhouse human 8-plex PCR (obrázek 13). V následujícím textu jsou uvedeny výsledky dvou časových bodů testu.

A:



B:



Obrázek 13. Stabilita eluátů pro tkáň FFPE. DNA byla purifikována pomocí protokolu DNA Tissue LC. Jako vzorový materiál byla použita komerční tkáň FFPE. Eluáty byly uchovávány při různých teplotách ve stojanech na zkumavky Elution Micro a ve 2ml zkumavkách Sarstedt. Pro každý časový bod testu byly analyzovány 4 replikáty. Eluáty byly analyzovány pomocí analýzy Inhouse human 8plex PCR.

Interferující látky

Vliv inhibičních látek, které mohou být přítomny v plné krvi, na výkonnost aplikace DNA z krve, aplikace viru z krve a tkáňové aplikace byl testován přidáním následujících látek:

Tabulka 8. Potenciální interferující látky testované pro různé aplikace

Interferující látky	Koncentrace	Krev	Krev s viry	Tkáň
Bilirubin	200 mg/l	√	√	√
Hemoglobin	200 g/l	√	√	
Triglyceridy	30 g/l	√	√	√
Protein	120 g/l	√	√	√

Poznámka: „√“ označuje, které vzorky byly testovány na příslušnou potenciální interferující látku.)

U hemoglobinu (200 g/l) a bílkovin (120 g/l) byly stanoveny stávající hladiny v krevním vzorku a přidány další hemoglobin nebo bílkoviny, aby bylo dosaženo uvedených koncentrací, tj. 200, resp. 120 g/l. Pro bilirubin (200 mg/l) a triglyceridy (30 g/l) bylo do vzorků přidáno celkové množství každé látky tak, aby bylo dosaženo uvedených koncentrací.

U tkání bylo celkové množství jednotlivých látek přidáno přímo do lyzátů, nebylo provedeno stanovení koncentrace bilirubinu, triglyceridů ani bílkovin v použitém vzorku tkáně.

Jakékoli potenciální interferující látky (např. léky) a odpovídající koncentrace jsou velmi specifické pro následnou aplikaci a případnou předchozí léčbu pacienta a je třeba je prozkoumat při ověřování takové následné aplikace pomocí sad QIASymphony DSP DNA Mini a Midi Kit.

Poznámka: Testování bylo provedeno pomocí příkladných následných aplikací pro posouzení kvality extrahovaných nukleových kyselin. Různé navazující aplikace však mohou mít různé požadavky na čistotu (tj. nepřítomnost nebo koncentraci potenciálních interferujících látek), takže identifikace a testování příslušných látek a příslušných koncentrací musí být rovněž stanoveny jako součást vývoje navazující aplikace pro jakýkoli pracovní postup zahrnující soupravy QIASymphony DSP DNA Mini a Midi Kit.

Poznámka: Vezměte prosím na vědomí, že během vývoje soupravy QIASymphony DSP DNA Midi Kit nebyly pozorovány žádné známky toho, že by heparin měl negativní vliv na výkon. Norma ISO 20186-2:2019(E) uvádí, že heparin ze zkumavek na odběr krve může ovlivnit čistotu izolovaných nukleových kyselin a případný přenos do eluátů by mohl způsobit inhibici v některých následných aplikacích. Je proto na odpovědnosti uživatele, aby ověřil, zda má heparin negativní vliv na jeho pracovní postup.

DNA krev a vrstva buffy coat

Pro aplikace DNA z krve bylo testování provedeno pomocí protokolu DSP DNA 1000, který pokrývá nejvyšší vstupní objem vzorku, s použitím elučních objemů 200 a 500 µl.

Eluáty byly analyzovány spektroskopickou analýzou na výtěžnost a čistotu DNA. Kompatibilita PCR byla testována pomocí real-time PCR i pomocí analýzy PCR s koncovým bodem.

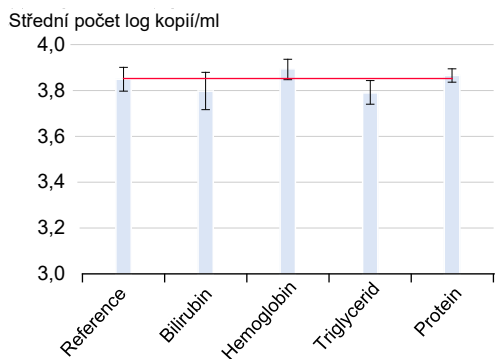
Žádná z látek uvedených v tabulce 9 není interferující; vzorky krve s vysokou koncentrací triglyceridů (> 30 g/l) však mohou vést ke snížení výtěžnosti gDNA.

Krev s viry

Pro aplikaci krve s viry bylo testování provedeno pomocí protokolu DSP Virus Blood 200 s elučním objemem 60 μ l. CMV negativní vzorky krve byly obohaceny o 500 kopií/ml (nízká koncentrace) a 1×10^4 kopií/ml (vysoká koncentrace, obrázek 14) komerčního standardu CMV.

Eluáty byly analyzovány pomocí analýzy CMV Real-time PCR.

Žádná z látek uvedených v tabulce 9 není interferující; vzorky krve s vysokou koncentrací triglyceridů (> 30 g/l) však mohou vést ke snížené purifikaci virové DNA.



Obrázek 14. Test inhibiční látky. Plná krev byla odebrána jednomu zdravému dárci do zkumavek BD K2E a doplněna standardním materiálem CMV (titr 4,0 log kopií/ml). Pět vzorků bylo testováno přidáním potenciálních inhibitorů a virová DNA byla purifikována ze 4 replikátů každého vzorku pomocí sady QIASymphony DSP DNA Mini Kit a protokolu Virus blood 200 DSP s elučním objemem 165 μ l. Eluáty byly analyzovány pomocí analýzy CMV real-time PCR. Červená čára představuje stanovený titr pro referenční vzorky, které nebyly obohaceny o žádnou inhibiční látku, a úsečky ukazují průměrné logaritmicke kopie na mililitr se směrodatnou odchylkou.

Tkáň

U DNA tkáně (čerstvé i zmrazené) bylo testování provedeno pomocí protokolu DSP DNA HC s použitím elučního objemu 200 μ l.

Eluáty byly analyzovány spektroskopickou analýzou na výtěžnost a čistotu DNA. Kompatibilita PCR byla testována pomocí analýzy real-time PCR.

U žádné z látek uvedených v tabulce 9 nebyl zjištěn negativní vliv na přípravu vzorků.

Tkáň FFPE

U tkáně FFPE bylo testování provedeno pomocí protokolu DSP DNA LC s použitím elučního objemu 50 µl.

Látky (viz tabulka 9) byly přidány přímo do lyzátu.

Tabulka 9. Potenciální interferující látky testované pro různé aplikace

Interferující látka	Koncentrace v lyzátu
Xylen	Až 11 %
Etanol	Až 11 %
Deparafinizační roztok Deparaffinization Solution	Až 11 %
Parafín	0,1 µM řez

Eluáty byly analyzovány spektroskopickou analýzou na výtěžnost a čistotu DNA. Kompatibilita PCR byla testována pomocí real-time PCR a také pomocí analýzy Inhouse human 8-plex PCR.

U žádné z látek uvedených v tabulce 9 nebyl zjištěn negativní vliv na přípravu vzorků.

Křížová kontaminace





Krevní DNA

Riziko křížové kontaminace aplikace QIASymphony DNA Blood bylo analyzováno provedením čtyř cyklů 96 vzorků na přístroji QIASymphony SP se střídavými kontrolními šaržemi (střídavě pozitivní a negativní vzorky), přerušovanými zcela negativními šaržemi. Jako modelový systém byla použita mužská krev (obsahující počet WBC $\geq 1.0 \times 10^7$ buněk/ml a ženská krev obsahující počet WBC mezi $4,0 \times 10^6$ a 9×10^6 buněk/ml). Příprava vzorku byla provedena pomocí protokolu pro krev o objemu 1000 µl, který pokrývá největší objem vzorku. Potenciální kontaminace negativních ženských vzorků během extrakce byla vyhodnocena následnou analýzou eluátů pomocí real-time PCR pro chromozom Y.

Nebyla zjištěna žádná křížová kontaminace mezi vzorky, šaržemi, ale ani přenos mezi cykly.

Symbole

V tomto dokumentu se vyskytují následující symboly. Úplný seznam symbolů použitých v návodu k použití nebo na obalu a označení naleznete v příručce.

Symbol	Definice symbolu
	Tento výrobek splňuje požadavky evropského nařízení 2017/746 o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro.
	Zdravotnický prostředek k diagnostice in vitro
	Katalogové číslo
Rn	R znamená revizi návodu k použití a n je číslo revize
	Výrobce

Historie revizí

Revize	Popis
R1, červen 2022	<p>Verze 2, revize 1</p> <ul style="list-style-type: none">• Aktualizace na verzi 2 kvůli souladu s nařízením IVDR• Přidány oddíly pro interferující látky, křížovou kontaminaci, stabilitu eluátů a kompatibilitu s následnými aplikacemi

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifické pro výrobek jsou uvedeny v příručce soupravy QIAGEN nebo v uživatelské příručce. Příručky k soupravám QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na webových stránkách www.qiagen.com nebo si je lze vyžádat od technické podpory společnosti QIAGEN či místního distributora.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, QIAamp®, EZ1®, UltraRun® (QIAGEN Group); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.). Registrované názvy, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, i když nejsou výslovně takto označeny, nelze považovat za nechráněné zákonem.

06/2022 HB-3029-D01-001 © 2022 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

