

Návod k použití sady QIAAsymphony® DSP Circulating DNA Kit (Charakteristiky funkčních vlastností)

Verze 2



Pro diagnostické použití in vitro

Pro použití se sadou QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit



937556



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Německo

R1

Charakteristiky funkčních vlastností jsou k dispozici v elektronické formě a lze je nalézt na kartě zdrojů na straně produktu na adrese www.qiagen.com.

Obecný úvod

Systém QIAasymphony DSP Circulating DNA představuje in vitro systém připravený k použití ke kvalitativní purifikaci cirkulující bezbuněčné DNA (ccfDNA) z lidské plazmy a moči.

Sada QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit je určena k použití pouze v kombinaci s přístrojem QIAasymphony SP.

Se sadou QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit jsou dodávány reagentie pro plně automatizovanou a simultánní purifikaci ccfDNA rozsáhlého množství typů lidské plazmy (se stabilizátory profilu ccfDNA, např. Cell-Free DNA BCT® od Streck®, ale i bez stabilizátorů profilu ccfDNA, např. zkumavky s EDTA) a z lidské moči (se stabilizátory profilu ccfDNA i bez nich). Charakteristika funkčních vlastností pro jednotlivé typy zkumavek pro odběr krve však nebyla stanovena a uživatel je musí validovat sám.

Purifikovaná ccfDNA je kompatibilní se širokou škálou následných aplikací, např. PCR diagnostika v rámci biochemické kvantifikace nebo analýzy na bázi fluorescence či NGS.

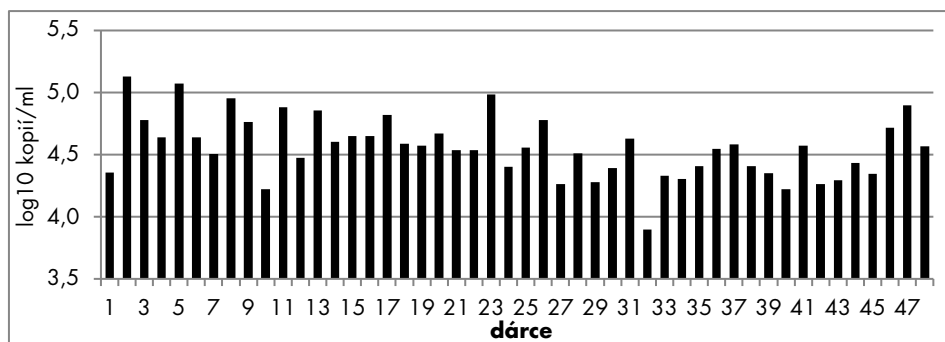
Přístroj QIAasymphony SP provádí všechny kroky postupu purifikace. V jednom zpracování se zpracovává až 96 vzorků v šaržích po 24. Vzorky moči mohou vyžadovat ruční předběžnou úpravu vzorku.

Poznámka: Charakteristiky funkčních vlastností jsou výrazně závislé na různých faktorech a vztahují se ke konkrétní následné aplikaci. Tyto vlastnosti byly stanoveny pro sadu QS DSP Circulating DNA Kit ve spojení s ukázkovými následnými aplikacemi. Metody pro izolaci nukleových kyselin z biologického vzorku se však používají jako front-end pro více následných aplikací, přičemž pro jakýkoli takový pracovní postup je třeba v rámci vývoje následné aplikace stanovit výkonnostní parametr, například křížovou kontaminaci a provozní přesnost. Proto je odpovědností uživatele ověřit celý pracovní postup a stanovit vhodné parametry výkonu.

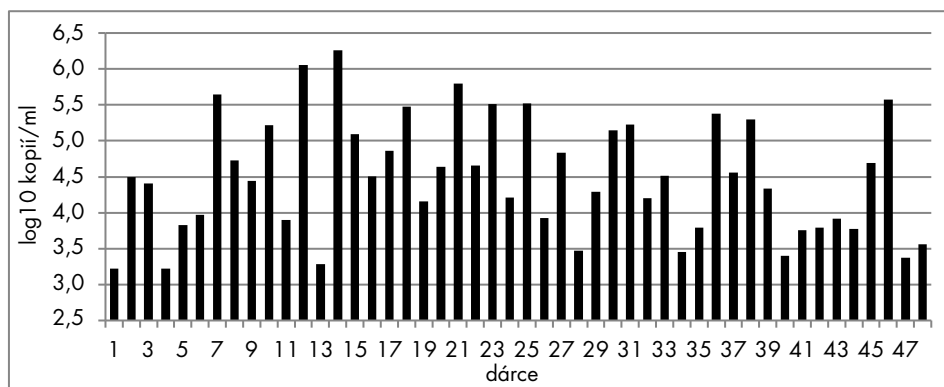
Základní výkonnost

Základní výkonnost sady QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit byla hodnocena s využitím 4ml vzorků plazmy určených k extrakci ccfDNA ze zkumavek Streck a ze 4ml vzorků stabilizované moči od 48 samostatných dárců. Výtěžek ccfDNA byl stanoven pomocí interní analýzy real-time PCR pro kódující sekvenci 18S ribozomální RNA.

Rozdíl ve výtěžku (\log_{10} kopií/ml) na obrázku 1 (4 ml plazmy) a obrázku 2 (4 ml moči) odrážejí silné, na dárci závislé koncentrace ccfDNA, které se typicky nacházejí ve stejném objemu příslušného materiálu vzorku.



Obrázek 1. Výtěžek ccfDNA z plazmy od 48 jednotlivých dárců. Odběr krve od 48 samostatných dárců byl proveden do odběrových zkumavek Cell-Free DNA BCT (Streck). CcfDNA byla extrahována ze 4 ml plazmy s použitím sady QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit. Výtěžek ccfDNA byl kvantifikován pomocí interní analýzy real-time PCR pro kódující sekvenci 18S. Výsledky byly vypočteny jako počet cílových kopií na mililitr vstupní plazmy.



Obrázek 2. Výtěžek ccfDNA z moči 48 samostatných dárců. Moč odebraná od 48 samostatných dárců byla stabilizována pomocí odběrové zkumavky Cell-Free DNA Urine Preserve® (Streck). CcfDNA byla extrahována ze 4 ml moči s použitím sady QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. Výtěžek ccfDNA byl kvantifikován pomocí interní analýzy real-time PCR pro kódující sekvenci 18S. Výsledky byly vypočteny jako cílové kopie na mililitr vstupní moči.

Přesnost cyklu

Pro extrakci lidské ccfDNA z plazmy EDTA byly stanoveny variační koeficienty (Coefficients of variations, CV). Pro analýzu přesnosti byla ccfDNA kvantifikována pomocí interní analýzy real-time PCR v reálném čase pro ribozomální kódující sekvenci 18S. Celkem bylo realizováno 10 cyklů přístroje QIASymphony, každý z nich ve 4 šaržích (8 replikátů na šarži). Údaje o přesnosti mezi analýzami jsou uvedeny v tabulce 1.

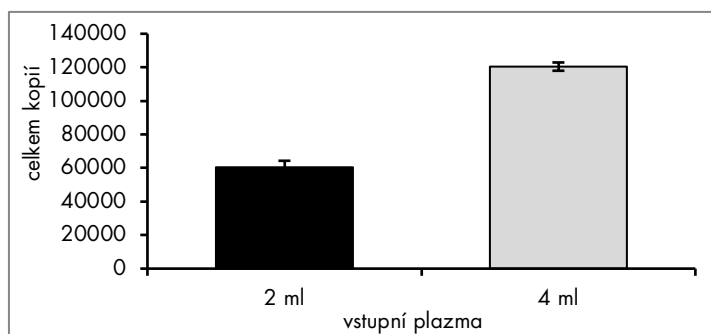
Tabulka 1. Odhady analýzy přesnosti

Přesnost	CV (%)
V rámci šarže	11,67
Opakovatelnost	13,14
Střední přesnost	13,14
Celková přesnost	14,12

Ekvivalentní výkonnost protokolu se 2 ml v protokolu se 4 ml

Ekvivalentní výkonnost protokolů pro vstup vzorku o objemu 2 a 4 ml byla hodnocena pro sadu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit s použitím endogenní ccfDNA extrahované ze směsi lidské EDTA plazmy. Celkem bylo provedeno 8 na sobě nezávislých cyklů přístroje QIASymphony, každý z nich ve 4 šaržích, s 8 replikátů na šarži. Lineární oblast kvantifikace postupu sady QIASymphony DSP Circulating DNA Kit byla stanovena pro kódující sekvenci 18S pomocí interní analýzy real-time PCR (obrázek 3). Poměr rozdílů pro protokoly s 2 ml a se 4 ml je uveden v tabulce 2 (referenční protokol představuje vstupní vzorek o objemu 4 ml).

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



Obrázek 3. Ekvivalentní výkonnost při použití protokolu s 2 ml a 4 ml vstupním vzorkem. Lineární rozsah protokolu ccfDNA byl stanoven pomocí protokolů se 2 ml a se 4 ml. Výtěžek ccfDNA byl kvantifikován pomocí interní analýzy real-time PCR pro kódující sekvenci 18S. Výsledky byly vypočteny jako celkový počet kopií na protokol.

Tabulka 2. Rozdíl mezi protokoly se 2 ml a se 4 ml (N = 256)

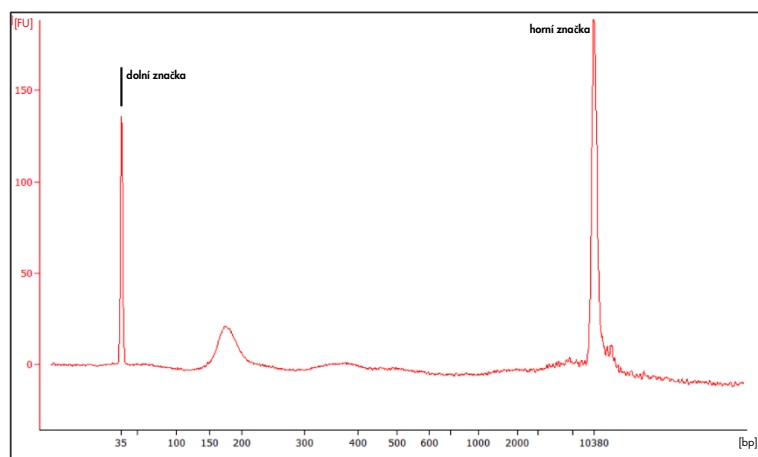
Parametr	Hodnota
Odhadovaný poměr geometrického průměru u vypočtených kopií/ml	1,01
Dolní 95% limit spolehlivosti	0,92
Horní 95% limit spolehlivosti	1,11
Celková přesnost	14,12

Výkonnost protokolů pro 2 a 4 ml vstupní vzorek je ekvivalentní, měřeno ve vypočtených kopiích na mililitr.

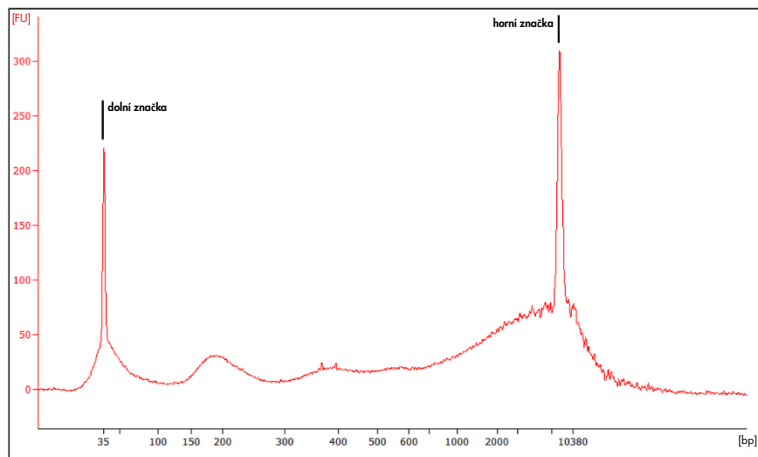
Distribuce velikosti

Pro vyhodnocení distribuce velikosti výstupního vzorku byla ccfDNA ze 4ml vstupního vzorku extrahována s použitím sady QIASymphony DSP Circulating DNA Kit, eluována v 75 µl a poté byl 1 µl eluátu podroben analýze velikosti pomocí bioanalyzátoru Agilent® 2100 technikou Agilent High Sensitivity DNA Chip. Bylo provedeno celkem 5 nezávislých replikací. Jeden reprezentativní profil DNA je znázorněn pro plazmu na [obrázku 4](#) a pro moč na [obrázku 5](#).

Elektroferogram pro plazmu na [obrázku 4](#) ukazuje často pozorovaný vrchol při přibližně 165 bp, v rozmezí od 145 do 196 bp, který se v rozsahu délky DNA váže na histon v nukleozomu. Elektroferogram moči na [obrázku 5](#) ukazuje, že převládající vrchol při přibližně 160 bp je širší, v rozsahu přibližně 145 až 250 bp. Dále se u vzorků moči vyskytuje druhý vrchol v rozmezí přibližně 20 až 100 bp (na úrovni nižší značky vrcholu), což ukazuje na frakci ccfDNA s vyšším stupněm fragmentace. Navíc [obrázek 5](#) znázorňuje velký počet dlouhých fragmentů DNA přibližně od 2 kb. Velké množství takových fragmentů genomové DNA se často nachází ve vzorku moči, s největší pravděpodobností v důsledku uvolňování genomové DNA z buněk přítomných v moči.



Obrázek 4. Distribuce velikosti fragmentů ccfDNA získané z plazmy (profil bioanalyzátoru). CcfDNA byla extrahována ze 4 ml plazmy odebrané do zkumavky EDTA s použitím sady QIASymphony DSP Circulating DNA Kit; 1 µl eluátu byl podroben analýze DNA čipů technikou Agilent High Sensitivity DNA Chip. Osa x: velikost – pár bazí (bp); osa y: jednotky fluorescence (FU).

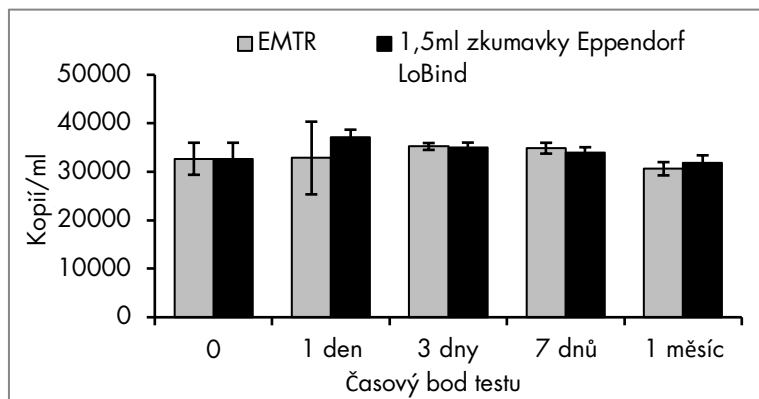


Obrázek 5. Distribuce velikostí fragmentů ccfDNA získané z moči (profil bioanalyzátoru). CcfDNA byla extrahována ze 4 ml moči s použitím sady QIASymphony DSP Circulating DNA Kit; 1 µl eluátu podroben analýze DNA čipů technikou Agilent High Sensitivity DNA Chip. Osa x: velikost – pár bazí (bp); osa y: jednotky fluorescence (FU).

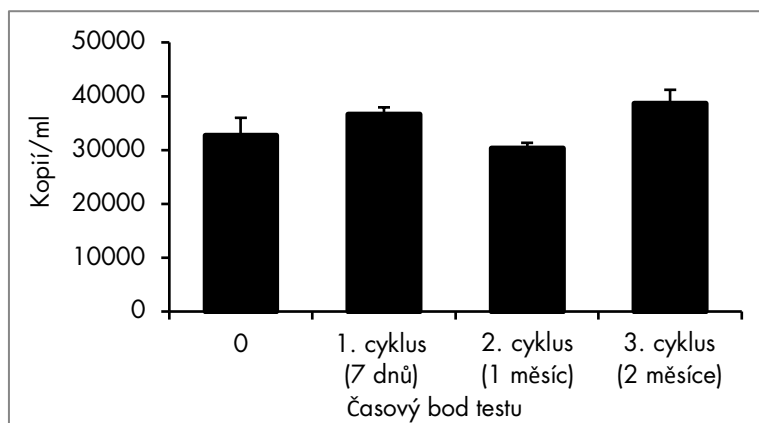
Stabilita eluátů

Stabilita eluátu pro sadu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit byla hodnocena s použitím extrahované ccfDNA z lidské EDTA plazmy. Eluáty byly uchovávány ve 2 různých formátech elučních stojanů: QIAGEN® EMTR (Elution Microtubes CL 96; kat. č. 19588) a 1,5 ml zkumavky Eppendorf® LoBind® Snap Cap Safe-Lock. Eluáty byly analyzovány v 8 replikátech. Stabilita DNA v eluátech byla stanovena pomocí interní analýzy real-time PCR pro kódující sekvenci 18S ribozomální RNA.

Stabilita eluátu při 2–8 °C nebyla ovlivněna dobou skladování do jednoho měsíce ani formátem uchovávání (obrázek 6). Stabilita DNA ve zkumavkách LoBind nebyla ovlivněna skladováním při teplotě –15 °C až –30 °C, včetně 3 cyklů zmrazování-rozmrazování po 7 dnech, po jednom měsíci a po dvou měsících (Obrázek 7).



Obrázek 6. Stabilita ccfDNA u eluátů skladovaných při teplotě 2–8 °C ve formátu 2 zkumavek. CcfDNA byla extrahována z plazmy odebrané zkumavek s EDTA s použitím sady QIASymphony DSP Circulating DNA Kit a byla skladována při teplotě 2–8 °C pro různé časové body. Výtěžek ccfDNA byl kvantifikován pomocí interní analýzy real-time PCR pro kódující sekvenci 18S. Výsledky byly vypočteny jako počet cílových kopií na mililitr vstupní plazmy.



Obrázek 7. Stabilita ccfDNA u eluátů skladovaných při teplotě -15 až -30 °C, včetně 3 cyklů zmrazování-rozmrazování. CcfDNA byla extrahována z plazmy odebrané do zkumavek s EDTA s použitím sady QIASymphony DSP Circulating DNA Kit a byla skladována při teplotě -15 °C až -30 °C v 1,5ml zkumavkách Eppendorf LoBind. Výtěžek ccfDNA byl stanoven ve 3 testovacích časových bodech za použití stejného eluátu ve 3 cyklech zmrazení-rozmrazení. Výtěžek ccfDNA byl kvantifikován pomocí interní analýzy real-time PCR pro kódující sekvenci 18S. Výsledky byly vypočteny jako počet cílových kopií na mililitr vstupní plazmy.

Interferující látky

Lidská plazma a moč byly obohaceny různými potenciálně interferujícími látkami (viz tabulka 3) pro účely otestování jejich vlivu na výkonost sady QS DSP Circulating DNA Kit při extrakci ccfDNA a zjištění další kompatibility s ukázkovými následnými analýzami. Elutáty byly analyzovány v rámci interního real-time PCR testu pro kódující sekvenci 18S a pomocí fluorometru Qubit® s použitím analýzy High Sensitivity dsDNA.

Tabulka 3. Test koncentrace potenciálních interferujících látek

Interferující látka	Plazma	Moč
Bilirubin	200 mg/litr*	200 mg/litr*
Hemoglobin	2 g/litr†	-
BSA a Gamma-Globin	Až 120 g/litr*	1 g/litr†
Triglyceridy	5 g/litr*	-
Glukóza	10 g/litr*	10 g/litr*
Krev	-	1 %†
pH	-	pH 4 a pH 9†

* CLSI EP7-A2 Vol. 25 No. 27

† FDA Draft Guidance (11.05.2011)

Žádná z látek uvedených v tabulce 3 neinterferuje, s výjimkou vzorků plazmy s vysokými koncentracemi gama-globulinu (> 30 g/litr), které mohou vést ke snížené výtěžnosti cirkulující bezbuněčné DNA.

Poznámka: Testování bylo provedeno prostřednictvím ukázkových následných aplikací pro účely hodnocení kvality extrahovaných nukleových kyselin. Různé následné aplikace však mohou vyžadovat dodržení rozdílné úrovně čistoty (tj. nepřítomnost potenciálních interferujících látek), a proto musí být rovněž zavedena identifikace a testování relevantních látek jako součást vývoje následné aplikace pro jakýkoli pracovní postup se sadou QIASymphony DSP Circulating DNA Kit.

Křížová kontaminace

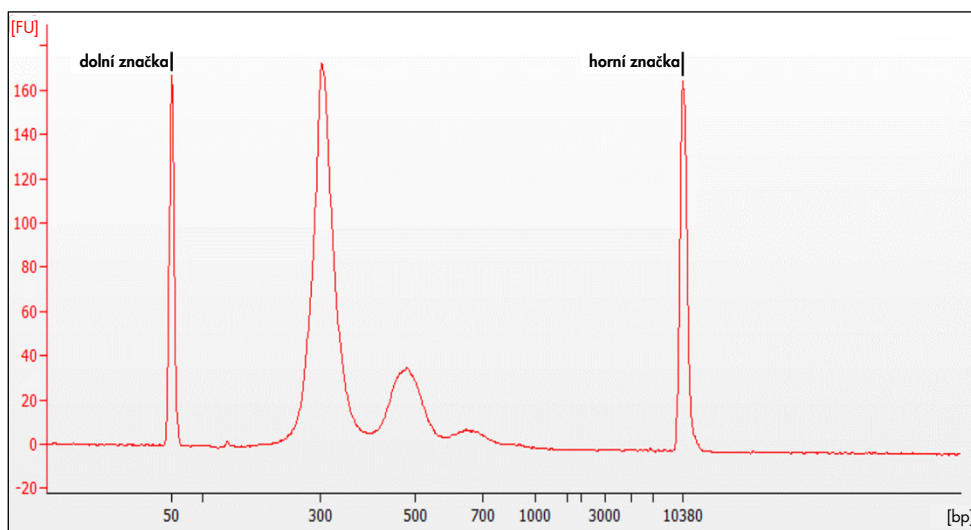
Riziko křížové kontaminace systému QIASymphony DSP Circulating DNA bylo analyzováno realizací tří cyklů 96 vzorků na přístroji QIASymphony SP v režimu střídání šachovnicových šarží (střídající se pozitivní a negativní vzorky). Jako materiály vzorku pro modelový systém byla použita ženská plazma (negativní vzorek) a ženská plazma s přidavkem mužské štěpené gDNA v koncentraci 1,0E+05 kopií genu SRY1 na mililitr plazmy (pozitivní vzorek). Příprava vzorku byla provedena v rámci protokolu se 4 ml, který zahrnuje dva samostatné přenosy vzorků každého ze 2ml objemů. Potenciální kontaminace negativních vzorků ženské plazmy během extrakce byla hodnocena následnou analýzou eluátů pomocí real-time PCR pro gen SRY1 specifický pro chromozom Y.

Nebyla detekována žádná křížová kontaminace mezi vzorky, mezi různými šaržemi ani mezi různými cykly.

Kompatibilita s různými navazujícími aplikacemi

Ukázkové následné aplikace byly využity během postupu vývoje sady QIASymphony DSP Circulating DNA Kit, aby bylo prokázáno, že izolované nukleové kyseliny jsou kompatibilní s širokou řadou různých technologií pro následné aplikace, včetně analýzy real-time PCR (viz obrázek 1, , obrázek 2, , obrázek 3, obrázek 6 a obrázek 7), technologie fluorometru Qubit (proteinová analýza a vysoce citlivá analýza dsDNA), knihovny (viz obrázek 8) a sekvenování Next Generation Sequencing (Next Generation Sequencing, NGS).



















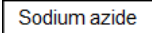
Elektroferogram na obrázku 8 znázorňuje příklad úspěšné ligace adaptéru a následné amplifikace ccfDNA. Vedle výrazného vrcholu při 300 bp pro nukleozomální ccfDNA (přibližně 165 plus přibližně 70 bp pro každý adaptér) je zjevný také dinukleozomální vrchol přibl. při 470 bp.



Obrázek 8. DNA knihovna ccfDNA (jediný dárcce) extrahovaná pomocí sady QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. CcfDNA byla extrahována z plazmy odebrané do zkumavek Streck v rámci protokolu se 4 ml a následně bylo 35 µl eluátu přeneseno do sady NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit (Biolabs). Po amplifikaci a purifikaci AMPure XP byla provedena analýza 1 µl eluátu s použitím sady Agilent 7500 DNA Kit.

Symbols

V návodu k použití anebo na obalu a značení se vyskytují následující symboly:

Symbol	Definice symbolu
	Obsahuje dostatek reagensů pro <N> reakcí
	Použijte do
	Tento výrobek splňuje požadavky nařízení EU 2017/746 pro diagnostické zdravotnické prostředky in vitro.
	Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro
	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Číslo materiálu (tj. označení dílu)
	Komponenty
	Obsahuje
	Číslo
	Globální číslo obchodní položky
Rn	R označuje revizi návodu k použití a n je číslo revize
	Teplotní rozmezí
	Výrobce
	Viz návod k použití
	Varování/upozornění
	Proteináza K
	Číslo jamky (tj. jamky kazety s reagensy)
	Kazeta s reagensy
	Azid sodný

Symbol	Definice symbolu
EtOH	Etanol
UDI	Jedinečný identifikátor prostředku

Historie revizí

Revize	Popis
R1, červen 2022	Verze 2, Revize 1 <ul style="list-style-type: none">Aktualizace na verzi 2 v souladu s požadavky Nařízení o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitroPřidány části týkající se interferujících látek, křížové kontaminace a kompatibility s následnými aplikacemi

Aktuální informace o licencích a prohlášení o odmítnutí odpovědnosti v souvislosti s produktem naleznete v příslušné příručce sady QIAGEN nebo 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®(QIAGEN Group); 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 nebo její pobočky). Registrované názvy, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, i když nejsou výslovně takto označeny, nelze považovat za nechráněné zákonem.

HB-3034-D01-001 © 2022 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná

