



2022. június

QIASymphony® DSP DNA Kit használati útmutató (Teljesítményjellemzők)

2. verzió



In vitro diagnosztikai használatra

A QIASymphony DSP DNA Mini Kit és a QIASymphony DSP DNA Midi Kit készletekkel való használatra



937236, 937255



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Németország

R1

A teljesítményjellemzők elektronikus formátumban állnak rendelkezésre, és a www.qiagen.com weboldalon az adott termék oldalának termékdokumentációs lapján érhetők el.

Általános bevezetés

A QIASymphony DSP DNA Kitek csak a QIASymphony SP készülékkel együtt használhatók.

A QIASymphony DSP DNA Mini Kitek tartalmazzák a totál DNS humán teljes vérből, vérlemezkéket és fehérvérsejteket tartalmazó határrétegből („buffy coat”), szövetekből és formalinban fixált, paraffinba ágyazott (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) szövetmintákból való automatizált tisztításához, valamint humán teljes vérből származó vírus DNS tisztításához szükséges reagenseket. A QIASymphony DSP DNA Midi kitek a totál DNS humán teljes vérből és buffy coatból való automatizált tisztításához szükséges reagenseket tartalmazzák. Mivel azonban nincsenek megállapítva a teljesítményjellemzők minden vérvételi cső és szövettípus esetében, ezekhez a felhasználónak kell validálnia a kitet.

A mágnesesrészecske-technológiával való tisztítás lehetővé teszi a jó minőségű, fehérjéktől, nukleázoktól és egyéb szennyeződésektől mentes nukleinsavak kinyerését. A tisztított nukleinsavakat ezután már közvetlenül fel lehet használni downstream alkalmazásokban, például amplifikációs reakciókban (PCR). A QIASymphony SP végrehajtja a tisztítási eljárás minden lépését. Egyetlen futtatással akár 96 mintát tud feldolgozni, maximum 24-es kötegekben.

Az alábbiakban a különféle alkalmazások kiválasztott teljesítményadatait ismertetjük.

Teljesítményjellemzők

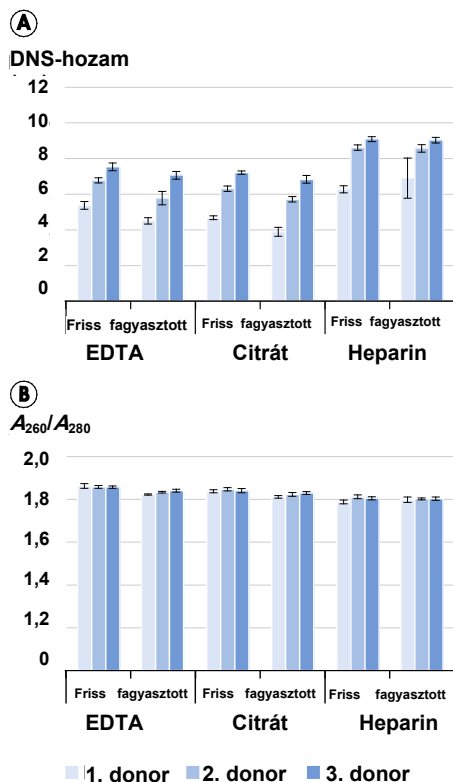
Megjegyzés: A teljesítményjellemzők nagymértékben függenek különböző tényezőktől, és az adott downstream alkalmazáshoz kapcsolódnak. Meghatározásukat a QIASymphony DSP DNA Mini és Midi Kit esetében példa downstream alkalmazásokkal végezték el. Azonban a nukleinsavak biológiai mintából történő izolálására szolgáló módszereket csak előfeldolgozásként használják számos downstream alkalmazáshoz. A teljesítményparamétereket, például a keresztszennyeződést vagy a futtatási precizitást meg kell határozni minden ilyen munkafolyamat esetében, a downstream alkalmazás kidolgozásának részeként. Ezért a felhasználó felelőssége a teljes munkafolyamat validálása a megfelelő teljesítményparaméterek megállapítása érdekében.

Alapteljesítmény és kompatibilitás a különféle downstream alkalmazások esetén

DNA blood és buffy coat

DNS-hozam

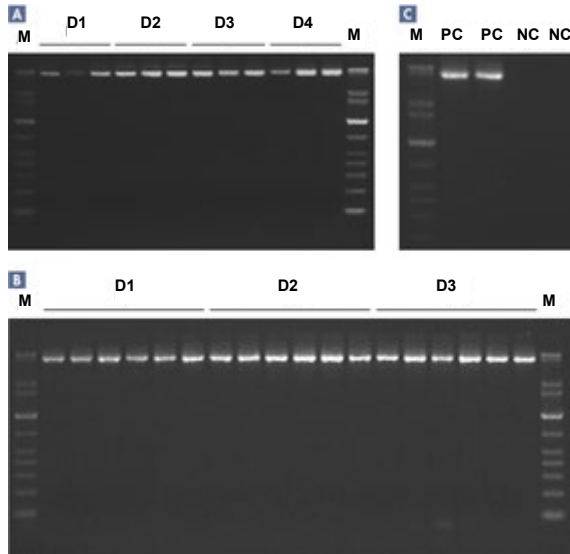
A QIASymphony DSP DNA Mini Kit alapteljesítményét különböző vérvételi csövekkel és antikoagulánsokkal értékelték, valamint friss és fagyasztott humán teljesvér-minták esetében. A teljesvér-mintákat 3 egészséges donortól gyűjtötték (fehérvérsejt [FVS] szám $4,0\text{--}11,0 \times 10^6$ sejt/ml) 3 különböző csőtípusba: EDTA, 10 ml BD™ Vacutainer® 16 x 100 mm (K2-EDTA); citrát, 2,7 ml Sarstedt® S-Monovette® 9NC cső 13 x 75 mm (citrát); heparin, 7,5 ml Sarstedt S-Monovette 15 x 92 mm (Li-heparin). A vért frissen (2–8 °C-on tárolva) vagy fagyasztva (-20 °C-on tárolva) használták. A genomiális DNS tisztítása 200 µl-es mintákból, donoronként és csőtípusonként 4 replikátumból történt, a QIASymphony DSP DNA Mini Kit és a blood 200 DSP protokoll segítségével, 200 µl-es elúciós térfogattal. A DNS-hozamot és a tisztaságot spektroszkópos vizsgálattal határozták meg (1. ábra).



1. ábra: DNS-hozam és tisztaság a különféle mintavételi csövekkel és antikoagulánsokkal, friss és fagyasztott humán teljes vér esetében. **A** DNS-hozam, az oszlopok az abszolút DNS-hozamot mutatják a szórással. **B** A DNS tisztasága, az oszlopok a DNS tisztaságát mutatják a szórással.

A DNS integritása

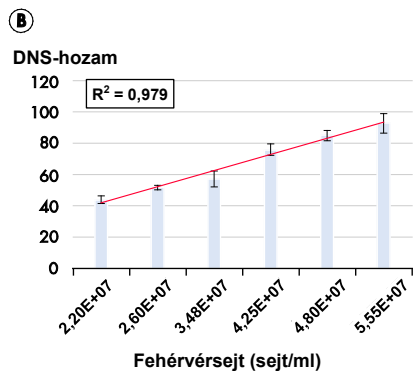
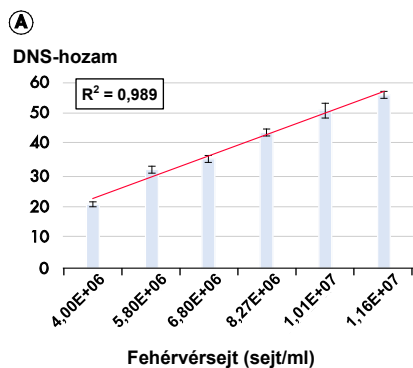
A hosszú PCR-termékeket (5 kb) LongRange PCR assay segítségével amplifikálták (2. ábra).



2. ábra: A DNS integritása long-range PCR segítségével vizsgálva. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder. **A** A teljes vért 4 egészséges donortól (D) vették BD K2E csövekbe. A long-range PCR-hoz a genomiális DNS tisztítása 200 µl-es alikvotokból, alikvotonként három replikátumból történt, a QIASymphony DSP DNA Mini Kit és a blood 200 DSP protokoll segítségével, 200 µl-es elúciós térfogattal. D1, 1. donor; D2, 2. donor; D3, 3. donor; és D4, 4. donor. **B** A teljes vért 3 egészséges donortól vették BD K2E csövekbe, amelyből buffy coatot preparáltak. A genomiális DNS tisztítása 200 µl-es alikvotokból, alikvotonként 6 replikátumból történt, a QIASymphony DSP DNA Mini Kit és a buffy coat 200 DSP protokoll segítségével, 200 µl-es elúciós térfogattal. D1, 1. donor; D2, 2. donor; és D3, 3. donor. **C** Kontrollok: PC, pozitív kontroll; és NC, negatív kontroll.

A DNS-hozam és a fehérvérsejtszám összefüggése

A QIASymphony DSP DNA Blood és buffy coat alkalmazások teljesítményét vér és buffy coat minták segítségével értékelték, az egyes mintatípusok esetében 6 különböző fehérvérsejtszámmal. Teljes vér esetében a fehérvérsejtszám 4×10^6 sejt/ml és $11,6 \times 10^6$ sejt/ml között volt, buffy coat esetében pedig $2,2 \times 10^7$ sejt/ml és $5,6 \times 10^7$ sejt/ml között. A DNS-hozam meghatározása spektroszkópos vizsgálattal történt, ábrázolása pedig a fehérvérsejtszám függvényében látható (3. ábra).



3. ábra: A DNS-hozam és a fehérvérsejtszám összefüggése. **A** A genomiális DNS tisztítása 1 ml humán teljes vérből történt, a QIASymphony DSP DNA Midi Kit és a blood 1000 DSP protokoll segítségével, 500 µl-es elúciós térfogattal. Az oszlopok az abszolút DNS-hozamot mutatják a szórással. **B** A genomiális DNS tisztítása 400 µl-es buffy coat mintákból történt, a QIASymphony DSP DNA Midi Kit és a buffy coat 400 DSP protokoll segítségével, 400 µl-es elúciós térfogattal. Az oszlopok az abszolút DNS-hozamot mutatják a szórással.

Vírusvér

Előre kvantifikált CMV WHO standard CMV-negatív humán teljes vérben történő hígításával találati arány vizsgálatot végeztek. 90 IU CMV/ml vírustartalmú minták esetében 100%-os kimutatási arányt figyeltek meg (1. táblázat).

1. táblázat: A QIASymphony DSP Virus Blood alkalmazás szenzitivitása

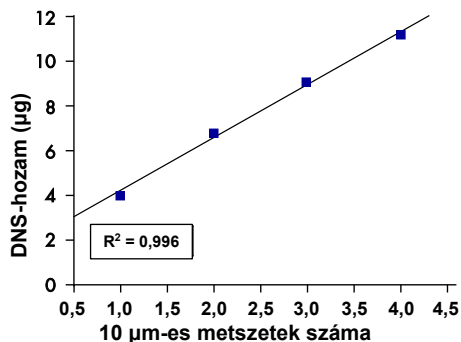
CMV (IU/ml)	Replikátumok	Találatok	Találat (%)
350	18	18	100,00
230	32	32	100,00
115	31	31	100,00
90	32	32	100,00
60	30	24	80,00
30	30	15	50,00
15	30	10	33,33
6	21	5	23,81
2	21	2	9,52
0	15	0	0,00

A humán teljes vért 1 egészséges CMV-negatív donortól vették BD K2E csövekbe, és különböző titerekben CMV WHO standardot adtak hozzá. A vírus DNS tisztítása a QIASymphony DSP DNA Mini Kit és a virus blood 200 DSP protokoll segítségével történt, 60 µl-es elúciós térfogattal. Az eluátumokat CMV real-time PCR assay-vel vizsgálták.

Szövet és FFPE szövet

DNS-hozam

A QIASymphony DSP DNA FFPE tissue alkalmazás teljesítményének értékelését frissen metszett humán lép 1–4, 10 µm-es, FFPE-metszetek 6 replikátumával végezték. A DNS-extrakciót a QIASymphony DSP DNA Mini Kit és a tissue low content DSP protokoll segítségével végezték. A paraffinmentesítést és a lízist xilol/etanol előkezeléssel végezték. A DNS-t 50 µl eluáló pufferbe eluálták, és a DNS-hozamot spektroszkópos vizsgálattal határozták meg (4. ábra).



4. ábra: A DNS-hozam és az FFPE szövetmetszetek számának összefüggése. Humán lépből származó 1–4, 10 µm-es, FFPE szövetmetszetek 6 replikátumának paraffinmentesítését végezték el xilol/etanol előkezeléssel. A DNS-extrakciót QIASymphony SP készüléken, a QIASymphony DSP DNA Mini Kit és a tissue low content DSP protokoll segítségével végezték, 50 µl-es elúciós térfogattal.

Biomarkerek mutációs állapotának elemzése real-time PCR segítségével

A biomarkerek mutációs állapotának elemzéséhez humán vastagbél FFPE-metszetekből extrahált DNS-t, valamint humán tüdőszövet mintákból extrahált DNS-t használtak.

FFPE szövetminták esetében a DNS-extrakcióhoz 3 x 10 µm vastagságú humán vastagbél metszeteket használtak a minta-előkészítéshez. A DNS-extrakciót Deparaffinization Solution felhasználásával (előkezelés) és a tissue low content DSP protokoll segítségével végezték, 100 µl-es elúciós térfogattal. A KRAS biomarker mutációs elemzését a KRAS detektálására szolgáló valós idejű PCR assay segítségével, az assay kézikönyvének megfelelően végezték. A kontroll assay C_T -értékei tartományon belül voltak, és a mutációs elemzés egy aminosav szubsztitúciót mutatott a 12-es kodonban, amit 4,17-es ΔC_T -érték jelzett, ami a 12SER mutáció megadott kimutatási küszöbértéke (8) alatt van (2. táblázat).

2. táblázat: FFPE szövetben lévő KRAS biomarker mutációs elemzésének eredményei

Minta	Reakció	Cél C _T	Belső kontroll C _T	ΔC _T *
Templát nélküli kontroll	Kontroll	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	Kontroll	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
FFPE szövet (humán vastagbél)	Kontroll	24,94	31,98	–
	12ALA	n.d.	32,42	–
	12ASP	n.d.	32,73	–
	12ARG	n.d.	33,05	–
	12CYS	n.d.	32,74	–
	12SER	29,11	32,34	4,17
	12VAL	n.d.	32,81	–
	13ASP	n.d.	33,20	–

* ΔC_T = M C_T – C C_T, ahol M = mutáció, C = kontroll; n.d. = nem detektált.

A fagyasztott szövetmintából történő DNS-extrakcióhoz a minta-előkészítés 25 mg humán tüdőszövet felhasználásával, a tissue high content DSP protokoll segítségével történt, 200 µl-es elúciós térfogattal. Az EGFR biomarker mutációs elemzését az EGFR detektálására szolgáló valós idejű PCR assay-vel végezték. A kontroll elemzését és a mutáció kimutatását az assay kézikönyvének megfelelően végezték. Az eredmények egy deléció mutattak az EGFR génben, amit 2,47-es ΔC_T-érték jelzett, ami a mutáció megadott kimutatási küszöbértéke (12) alatt van (3. táblázat).

3. táblázat: Fagyasztott szövetben lévő EGFR biomarker mutációk elemzésének eredményei

Minta	Reakció	Cél C _T	Belső kontroll C _T	ΔC _T *
Templát nélküli kontroll	Kontroll	0,00	31,71	–
	T790M	0,00	32,36	–
	Deléciók	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	Kontroll	28,78	31,05	–
	T790M	30,08	31,13	1,30
	Deléciók	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
Szövet (humán tüdő)	Kontroll	25,76	31,23	–
	T790M	n.d.	31,99	–
	Deléciók	28,23	30,99	2,47
	L858R	n.d.	31,33	–
	L861Q	n.d.	31,98	–
	G719X	n.d.	32,06	–
	S768I	n.d.	31,88	–
	Ins	n.d.	31,62	–

* ΔC_T = M C_T – C C_T, ahol M = mutáció, C = kontroll; n.d. = nem detektált.

Megismételhetőség és reprodukálhatóság

DNA blood

A DNS-extrakciót a blood 200 DSP protokoll segítségével végezték, 200 µl-es elúciós térfogattal. A megismételhetőség értékeléséhez egyetlen kezelő 3 különböző napon 3 független futtatást végzett (futtatásonként 96 mintával), amelyek 4 db 24 mintás kötegből álltak (4. táblázat és 5. táblázat).

A reprodukálhatóság értékeléséhez 3 kezelő 3 különböző napon, különböző QIASymphony SP készülékeken 3 független futtatást végzett (futtatásonként 96 mintával), amelyek 4 db 24 mintás kötegből álltak (6. táblázat és 7. táblázat).

4. táblázat: A megismételhetőség értékelésének eredményei

Futtatás	Köteg	n	Átlag DNS-hozam (µg)	Szórás	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
Összes	–	288	4,96	–	–

n, replikátumok száma; SD, szórás; CV, variációs koefficiens.

5. táblázat: Precizitási adatok a megismételhetőség értékeléséhez

	Szórás	CV
Kötegek között, egy futtatáson belül	0,25	4,95
Átlagos ismétlési pontosság	0,26	5,18

SD, szórás; CV, variációs koefficiens.

6. táblázat: A reprodukálhatóság értékelésének eredményei

Futtatás	Köteg	n	Átlag DNS-hozam (µg)	Szórás	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
Összes	–	288	5,38	–	–

n, replikátumok száma; SD, szórás; CV, variációs koefficiens.

7. táblázat: Precizitási adatok a reprodukálhatóság értékeléséhez

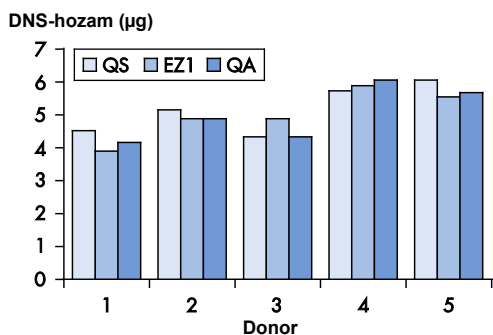
	Szórás	CV
Kötegek között, egy futtatáson belül	0,25	4,73
Átlagos ismétlési pontosság	0,38	7,03

SD, szórás; CV, variációs koefficiens.

Összehasonlító teljesítmény

DNA Blood

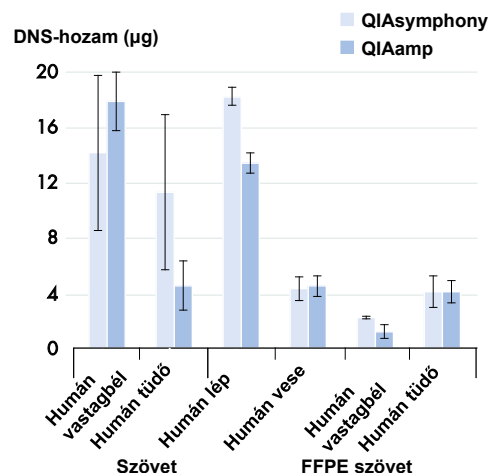
A QIAasymphony DSP DNA vér rendszer teljesítményét az EZ1® DSP DNA vér rendszer és a QIAamp® DNA Blood Mini Kit manuális előkészítési eljárás teljesítményével összehasonlítva vizsgálták. A DNS-t különféle vérmintákból tisztították, és a DNS-hozam szempontjából elemezték (5. ábra).



5. ábra: DNS-hozamok összehasonlítása különböző DNS tisztítási rendszerek esetében. A teljes vért 5 egészséges donortól vették BD K2E csövekbe. Minden módszer esetében 200 µl-es mintabeviteli térfogatot és 200 µl-es elúciós térfogatot alkalmaztak. QS, QIAasymphony DSP DNA Mini Kit és blood 200 DSP protocol; EZ1, EZ1 Advanced XL az EZ1 DSP DNA Blood Kittal; QA, QIAamp DNA Blood Mini Kit. Az oszlopok az egyes minták abszolút DNS-hozamát mutatják.

Szövet és FFPE szövet

A QIAasymphony DSP DNA Mini Kit teljesítményét összevetették a manuális QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit és a QIAamp DSP DNA Mini Kit teljesítményével, FFPE szövetek, friss és fagyasztott szövetminták felhasználásával. A manuális és automatizált minta-előkészítést, valamint a DNS-hozamok mennyiségi meghatározását egyidejűleg végezték. A friss/fagyasztott és FFPE-szövetmintákból történő extrakció DNS-hozamát a QIAasymphony DSP DNA Mini Kit, a QIAamp DSP DNA Mini Kit, (szövet) és a QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (FFPE szövet) esetében a 6. ábra mutatja.



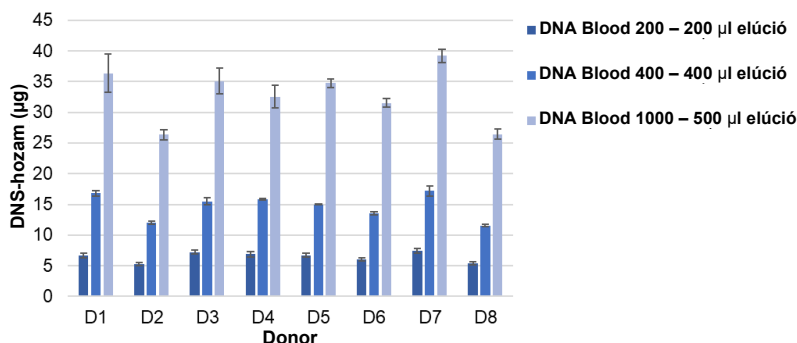
6. ábra: DNS-extrakció szövetből és FFPE szövetmintákból. Friss/fagyasztott szövethez a humán tüdő- és vastagbélmintákat 6 x 25 mg-os darabokra vágják. Az egyes szövetekből három darabot a QIAasymphony SP és a tissue high content DSP protokoll segítségével történő minta-előkészítéshez használtak. A fennmaradó mintákból a QIAamp DSP DNA Mini Kit segítségével végeztek DNS-extrakciót. A DNS-t 200 µl-be eluálták, és a DNS-hozamot spektroszkópos vizsgálattal határozták meg. Az FFPE szövetből történő DNS-extrakcióhoz különböző humán szervekből származó, 3 x 10 µm-es FFPE szövetmetszetet tartalmazó 12 replikátumot preparáltak. Hat mintát használtak fel a QIAasymphony SP készülékkel, Deparaffinization Solution oldatos előkezeléssel és tissue low content DSP protokollal történő minta-előkészítéshez. A fennmaradó mintákból a QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit segítségével végeztek DNS-extrakciót. A DNS-t 50 µl-be eluálták, és a DNS-hozamot spektroszkópos vizsgálattal határozták meg. Az oszlopok az abszolút DNS-hozamot mutatják a szórással.

A bevitt minta és a kapott eluátum aránya

DNA blood

A különböző bevitt minta/kapott eluátum arányokat a DNA blood alkalmazás esetében $5,0\text{--}8,0 \times 10^6$ sejt/ml fehérvérsejtszámú donoroktól származó vérminták segítségével hasonlították össze.

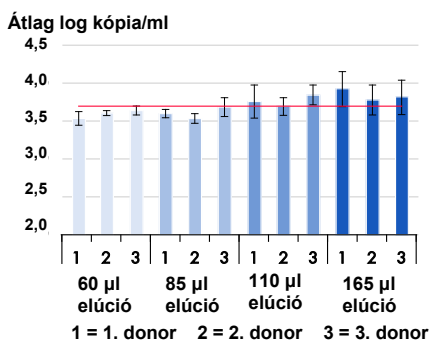
A teljes vért 8 egészséges donortól vették BD K2E csövekbe. A DNS tisztítása 6 replikátumból történt, a QIAAsymphony DSP DNA Mini/Midi Kit segítségével és a DNA blood 200 DSP protokoll esetében 200 µl-es elúciós térfogattal, a DNA blood 400 DSP protokoll esetében 400 µl-es elúciós térfogattal és a DNA blood 1000 DSP protokoll esetében 500 µl-es elúciós térfogattal (7. ábra).



7. ábra: Különböző mintabevitel és elúciós térfogatok összehasonlítása a vér DNS tisztítási rendszerek esetében. A teljes vért 8 egészséges donortól vették BD K2E csövekbe. A DNS-extrakciót a DNA blood 200 protokoll esetében 200 µl-es elúciós térfogattal, a DNA blood 400 protokoll esetében 400 µl-es elúciós térfogattal, a DNA blood 1000 protokoll esetében pedig 500 µl-es elúciós térfogattal végezték. A DNS-hozamot spektroszkópos vizsgálattal határozták meg. Az oszlopok az egyes donorok abszolút DNS-hozamát mutatják (átlagérték a szórással).

Vírusvér

A $4,0$ és $11,0 \times 10^6$ sejt/ml közötti fehérvérsejtszámú teljes vért 3 egészséges donortól vették BD K2E csövekbe, és CMV standardot (titer $3,7 \log$ kópia/ml) adtak hozzá. A vírus DNS tisztítása 7 replikátumból történt a QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit és a virus blood 200 DSP protokoll segítségével, 4 eltérő elúciós térfogattal (8. ábra).



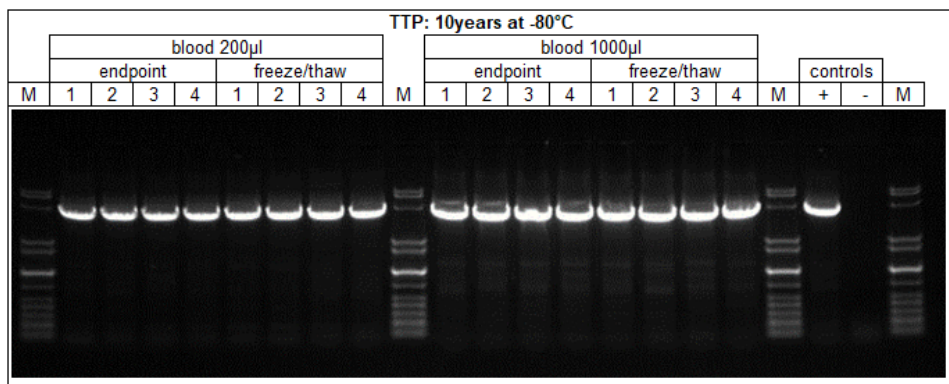
8. ábra: Vírus DNS mennyiségi meghatározásának összehasonlítása különböző elúciós térfogatok esetében. Az egyes donormintákból származó eluátumokat és az elúciós térfogatokat (60, 85, 110 és 165 µl) CMV real-time PCR assay-vel elemezték. A piros vonal a cél titer jelöli, az oszlopok pedig az átlag log kópia/ml értéket mutatják a szórással együtt.

Az eluátum stabilitása

Megjegyzés: Az eluátum stabilitása nagymértékben függ különböző tényezőktől, és az adott downstream alkalmazáshoz kapcsolódik. Meghatározását a QIASymphony DSP Mini és Midi Kit esetében példa downstream alkalmazásokkal végezték el. A felhasználó felelőssége a laboratóriumban alkalmazott specifikus downstream alkalmazás használati útmutatójának tanulmányozása és/vagy a teljes munkafolyamat validálása a megfelelő tárolási feltételek megállapítása érdekében.

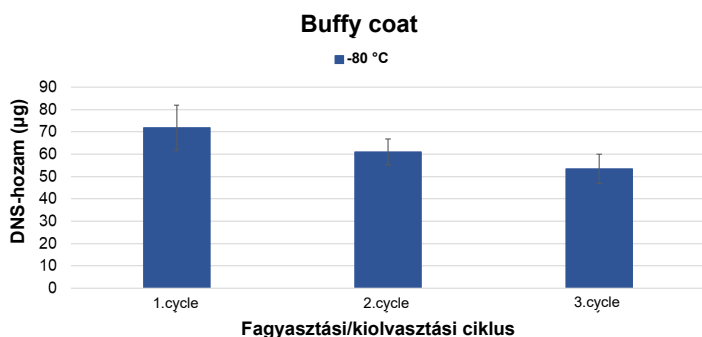
DNA blood és buffy coat

A DNA blood alkalmazásnál az eluátum stabilitását a QS futtatások eluátumaival vizsgálták, a DNA Blood 200 protokoll esetében 200 µl-es elúciós térfogattal, a DNA Blood 1000 protokoll esetében pedig 500 µl-es elúciós térfogattal. Az eluátumokat 2 ml-es Sarstedt csövekben tárolták szobahőmérsékleten, 2–8 °C-on, -20 °C-on és -80 °C-on. A DNS-hozamot és a tisztaságot spektroszkópos vizsgálattal határozták meg. A DNS integritását gélelektroforézissel és LongRange PCR assay-vel vizsgálták. (9. ábra).



9. ábra: Eluátum stabilitása DNS vér esetében. A DNS tisztítása a DNA Blood 200 µl és 1000 µl protokollok segítségével történt. Az eluátumokat -80 °C-on tárolták 2 ml-es Sarstedt csövekben. Négy replikátumot elemeztek. A DNS integritását long-range PCR segítségével vizsgálták. Az ábrákon a 10 év tárolás utáni eredmények láthatók. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder.

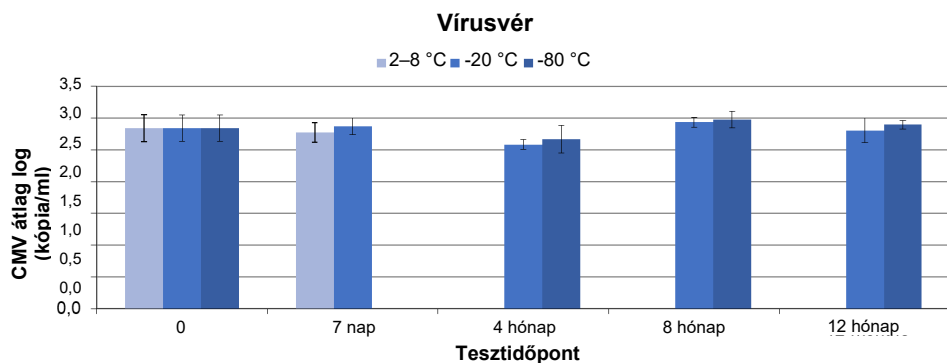
A buffy coat alkalmazásnál az eluátum stabilitását a QS futtatások eluátumaival vizsgálták a BC 400 µl protokoll segítségével, 200 µl-es elúciós térfogattal. Az eluátumokat 2 ml-es Sarstedt csövekben és elúciós mikrocső-állványokon tárolták szobahőmérsékleten, 2–8 °C-on, -20 °C-on és -80 °C-on. Ezenkívül, az eluátumokat 3 ciklus fagyasztás/kiolvasztás esetében is tesztelték (10. ábra). A DNS-hozamot és a tisztaságot spektroszkópos vizsgálattal határozták meg. A DNS integritását gélelektroforézissel és LongRange PCR assay-vel vizsgálták (50 µl-es reakció).



10. ábra: Eluátum fagyasztási/kiolvasztási ciklusai buffy coat esetében. A DNS tisztítása a DNA BC 400 µl protokoll segítségével történt. A buffy coat EDTA-s vérből származott. Az eluátumokat 2 ml-es Sarstedt csövekben tárolták. A DNS-hozamot a tesztidőpontokban ugyanazon eluátumokból határozták meg, 3 fagyasztási/kiolvasztási ciklusban. A DNS-hozamot spektroszkópos vizsgálattal határozták meg. Az oszlopok az abszolút DNS-hozamot mutatják (átlagérték a szórással).

Vírusvér

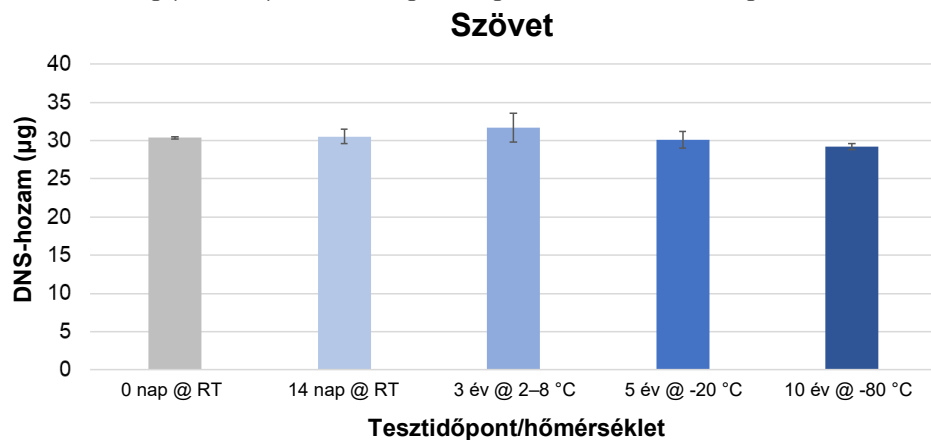
A vírusvér alkalmazásnál az eluátum stabilitását a QS futtatások eluátumaival vizsgálták a Virus Blood 200 protokoll segítségével, 60 µl-es elúciós térfogattal. Mintaanyagként kereskedelmi forgalomban kapható CMV standardot (titer 2,7 log kópia/ml) tartalmazó K₂ EDTA-s vért használtak. Az eluátumokat 2 ml-es Sarstedt csövekben tárolták 2–8 °C-on, -20 °C-on és -80 °C-on. Az eluátumok elemzését CMV real time assay-vel végezték (11. ábra). Az alábbiakban több tesztidőpont eredményei láthatók.



11. ábra: Eluátum stabilitása virus blood alkalmazás esetében. Kereskedelmi forgalomban kapható CMV standardot tartalmazó EDTA-s vérmintát tisztítottak a Virus Blood 200 protokoll segítségével. Az eluátumokat többféle hőmérsékleten tárolták elúciós mikroszó-állványokon és 2 ml-es Sarstedt csövekben. Tesztidőpontként 4 replikátumot vizsgáltak. Az oszlopok a CMV títert mutatják (átlag log érték a szórással).

Szövet

A szövet alkalmazásnál az eluátum stabilitását a Tissue HC 200 µl protokoll segítségével, 200 µl-es elúciós térfogattal vizsgálták. Mintaanyagként friss szarvasmarhamájat használtak. Az eluátumokat 2 ml-es Sarstedt csövekben és elúciós mikroszó-állványokon tárolták szobahőmérsékleten, 2–8 °C-on, -20 °C-on és -80 °C-on. A DNS-hozamot és a tisztaságot spektroszkópos vizsgálattal határozták meg (12. ábra). A DNS integritását gélelektroforézissel vizsgálták.

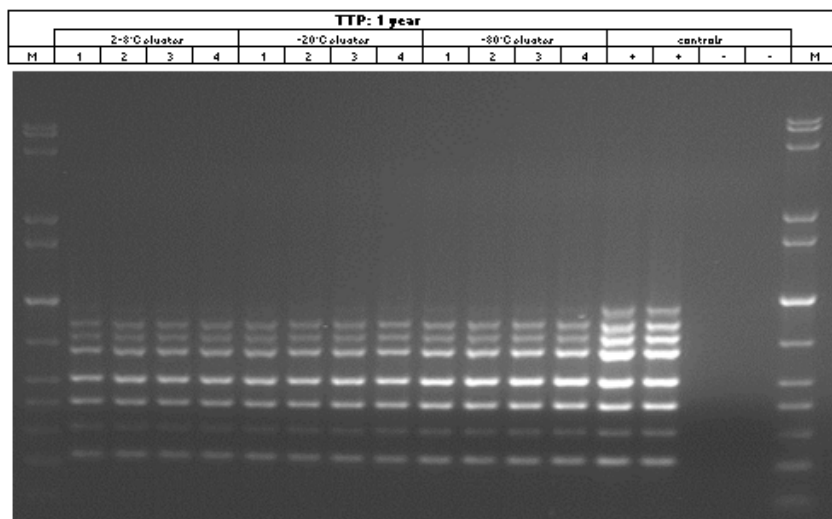


12. ábra: Eluátum stabilitása szövet esetében. A DNS tisztítása a DNA Tissue HC protokoll segítségével történt, 200 µl-es elúciós térfogattal. Mintaanyagként friss szarvasmarhamájat használtak. Az eluátumokat többféle hőmérsékleten tárolták elúciós mikroszó-állványokon és 2 ml-es Sarstedt csövekben. Tesztidőpontként 4 replikátumot vizsgáltak. A DNS-hozamot spektroszkópos vizsgálattal határozták meg. Az oszlopok az abszolút DNS-hozamot mutatják (átlagérték a szórással).

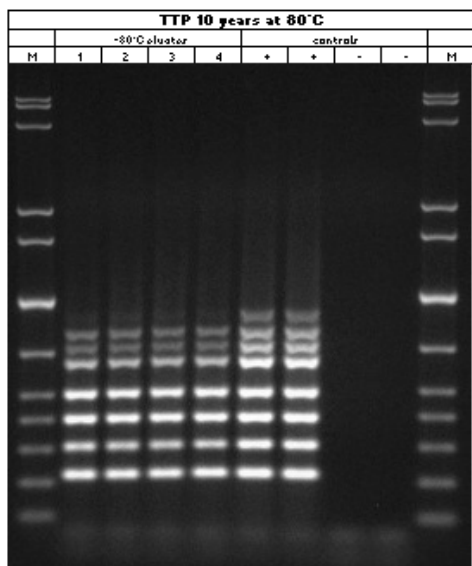
FFPE szövet

Az FFPE szövet alkalmazásánál az eluátum stabilitását a Tissue LC 200 µl protokoll segítségével, 100 µl-es elúciós térfogattal vizsgálták. Mintaanyagként kereskedelmi forgalomban kapható humán FFPE szövetet használtak. Az eluátumokat 2 ml-es Sarstedt csövekben és elúciós mikroszó-állványokon tárolták szobahőmérsékleten, 2–8 °C-on, -20 °C-on és -80 °C-on. Az eluátumokat Inhouse human 8-plex PCR assay-vel vizsgálták (13. ábra). Az alábbiakban két tesztdőpont eredményei láthatók.

A:



B:



13. ábra: Eluátum stabilitása FFPE szövet esetében. A DNS tisztítása a DNA Tissue LC protokoll segítségével történt. Mintaanyagként kereskedelmi forgalomban kapható FFPE szövetet használtak. Az eluátumokat többféle hőmérsékleten tárolták elúciós mikroszó-állványokon és 2 ml-es Sarstedt csövekben. Tesztdőpontként 4 replikátumot vizsgáltak. Az eluátumokat Inhouse human 8-plex PCR assay-vel vizsgálták.

Zavaró anyagok

A teljes vérben előforduló reakciógátló anyagoknak a DNA blood alkalmazás, a virus blood alkalmazás és a tissue alkalmazás teljesítményére gyakorolt hatását az alábbi anyagok hozzáadásával vizsgálták:

8. táblázat: A különböző alkalmazások esetében vizsgált potenciálisan zavaró anyagok

Zavaró anyagok	Koncentráció	Vér	Vírusvér	Szövet
Bilirubin	200 mg/l	√	√	√
Hemoglobin	200 g/l	√	√	
Trigliceridek	30 g/l	√	√	√
Fehérje	120 g/l	√	√	√

Megjegyzés: A „√” azt jelzi, hogy mely mintaanyagokat vizsgálták az adott potenciálisan zavaró anyag esetében.

A hemoglobin (200 g/l) és a fehérje (120 g/l) esetében meghatározták a vérmintában jelen lévő szintet, majd további hemoglobint vagy fehérjét adtak hozzá a jelzett koncentráció, azaz a 200 vagy 120 g/l eléréséhez. A bilirubin (200 mg/l) és a trigliceridek (30 g/l) esetében a jelzett koncentráció elérése érdekében az egyes anyagok teljes mennyiségét hozzáadták a mintákhoz.

Szövet esetében az egyes anyagok teljes mennyiségét közvetlenül a lizátumhoz adták, a szövetminta bilirubin-, triglicerid- és fehérjekoncentrációjának meghatározása nélkül.

A potenciálisan zavaró anyagok (pl. gyógyszerek) és azok koncentrációja nagy mértékben specifikus a downstream alkalmazásra, ezért a beteg korábbi gyógyszeres kezeléseit ki kell vizsgálni az ilyen downstream alkalmazások hitelesítése során, a QIASymphony DSP DNA Mini és Midi Kitek segítségével.

Megjegyzés: A vizsgálatot példa downstream alkalmazásokkal végezték az extrahált nukleinsavak minőségének értékelése érdekében. Azonban az eltérő downstream alkalmazásokhoz eltérő tisztaságra lehet szükség (pl. a potenciálisan zavaró anyagok hiánya vagy koncentrációja), ezért az adott anyagok azonosítása és vizsgálata, valamint azok koncentrációjának megállapítása szükséges a downstream alkalmazás kidolgozása során, a QIASymphony DSP Mini és Midi Kitek alkalmazó munkafolyamatok esetében.

Megjegyzés: Vegye figyelembe, hogy a QIASymphony DSP DNA Midi Kit kidolgozása során nem figyeltek meg arra utaló jelet, hogy a heparin negatívan befolyásolja a teljesítményt. Azonban az ISO 20186-2:2019(E) szabvány kimondja, hogy a vérvételi csövekben lévő heparin befolyásolhatja az izolált nukleinsavak tisztaságát, és annak átszennyezése az eluátumba gátlást okozhat egyes downstream alkalmazások esetében. Ezért a felhasználó felelőssége annak validálása, hogy a heparin negatívan befolyásolja-e a munkafolyamatot.

DNA blood és buffy coat

A DNA blood alkalmazások vizsgálatát a legnagyobb mintabeviteli térfogattal rendelkező DSP DNA 1000 protokoll segítségével végezték, 200 és 500 µl-es elúciós térfogattal.

Az eluátumok DNS-hozamát és tisztaságát spektroszkópos vizsgálattal határozták meg. A PCR-kompatibilitást real-time PCR-rel és végpont PCR assay-vel vizsgálták.

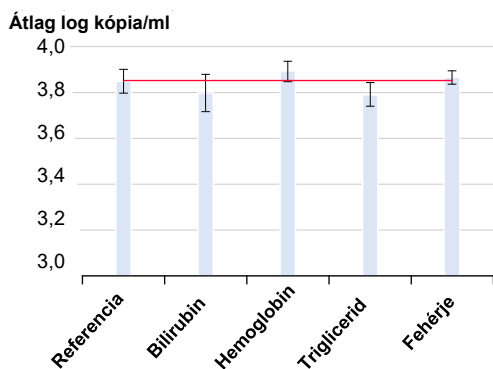
A 9. táblázatban felsorolt anyagok egyike se volt zavaró; azonban a vérmintákban a trigliceridek magas koncentrációja (>30 g/l) csökkent gDNS-hozamot okozhat.

Vírusvér

A vírus blood alkalmazás esetében a vizsgálatot a DSP Vírus Blood 200 protokollal végezték, 60 µl-es elúciós térfogattal. A CMV-negatív vérmintákhoz 500 kópia/ml (alacsony koncentráció) és 1×10^4 kópia/ml (magas koncentráció, 14. ábra) kereskedelmi forgalomban kapható CMV standardot adtak hozzá.

Az eluátumokat CMV real-time PCR assay-vel vizsgálták.

A 9. táblázatban felsorolt anyagok egyike se volt zavaró; azonban a vérmintákban a trigliceridek magas koncentrációja (>30 g/l) a vírus DNS csökkent tisztítását okozhatja.



14. ábra: Reakciógátló anyagok vizsgálata. A teljes vért 1 egészséges donortól vették BD K2E csövekbe, és CMV standardot (titer 4,0 log kópia/ml) adtak hozzá. Öt mintát vizsgáltak potenciális reakciógátlók hozzáadásával; a vírus DNS tisztítása mintánként 4 replikátumból történt a QIASymphony DSP DNA Mini Kit és a vírus blood 200 DSP protokoll segítségével, 165 µl-es elúciós térfogattal. Az eluátumokat CMV real-time PCR assay-vel vizsgálták. A piros vonal a meghatározott títert jelöli a referenciamintákban, amelyekhez nem adtak reakciógátló anyagot, az oszlopok pedig az átlag log kópia/ml értéket mutatják a szórással együtt.

Szövet

DNS szövet (friss és fagyasztott) esetében a vizsgálatot a DSP DNA HC protokoll segítségével végezték, 200 µl-es elúciós térfogattal.

Az eluátumok DNS-hozamát és tisztaságát spektroszkópos vizsgálattal határozták meg. A PCR-kompatibilitást real-time PCR assay-vel vizsgálták.

A 9. táblázatban felsorolt anyagok egyike se volt negatív hatással a minta-előkészítésre.

FFPE szövet

FFPE szövetek esetében a vizsgálatot a DSP DNA LC protokoll segítségével végezték, 50 µl-es elúciós térfogattal.

Az anyagokat (lásd 9. táblázat) közvetlenül a lizátumhoz adták hozzá.

9. táblázat: A különböző alkalmazások esetében vizsgált potenciálisan zavaró anyagok

Zavaró anyagok	Koncentráció a lizátumban
Xilol	Legfeljebb 11%
Etanol	Legfeljebb 11%
Deparaffinization Solution	Legfeljebb 11%
Paraffin	0,1 µM-os metszet

Az eluátumok DNS-hozamát és tisztaságát spektroszkópos vizsgálattal határozták meg. A PCR-kompatibilitást real-time PCR-ral és Inhouse human 8-plex PCR assay-vel vizsgálták.

A 9. táblázatban felsorolt anyagok egyike se volt negatív hatással a minta-előkészítésre.

Keresztszennyeződés





DNA blood

A QIASymphony DNA Blood alkalmazás esetében a keresztszennyeződés kockázatát négy 96 mintás futtatással vizsgálták a QIASymphony SP készüléken, váltakozó sakktábla-elrendezésben (pozitív és negatív minták váltása), teljes mértékben negatív kötegekkel megszakítva. Modellrendszerként férfi vért (fehérvérsejtszám $\geq 1,0 \times 10^7$ sejt/ml) és női vért (fehérvérsejtszám $4,0 \times 10^6$ és 9×10^6 sejt/ml) használtak. A minta-előkészítést a legnagyobb mintatérfogattal rendelkező blood 1000 µl protokoll segítségével végezték. A negatív női minták extrakciós futtatás során bekövetkező potenciális szennyeződését az eluátumok elemzésével értékelték, az Y-kromoszóma kimutatására szolgáló real-time PCR segítségével.

Nem volt kimutatható keresztszennyeződés a minták, a kötegek vagy a futtatások közötti átvitel során.

Szimbólumok

A dokumentumban az alábbi szimbólumok szerepelnek. A használati útmutatóban vagy a csomagoláson és címkéken használt szimbólumok teljes listáját lásd a kézikönyvben.

Szimbólum	A szimbólum meghatározása
	Ez a termék megfelel az in vitro diagnosztikai orvostechnikai eszközökre vonatkozó 2017/746 számú európai rendelet követelményeinek.
	In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszköz
	Katalógusszám
Rn	Az R a Használati útmutató átdolgozását, az n pedig az átdolgozás számát jelöli
	Gyártó

Átdolgozási előzmények

Átdolgozás

Leírás

R1, 2022. június

2. verzió, 1. átdolgozás

- Frissítés a 2. verzióra az IVDR megfeleléshez
- A Zavaró anyagok, Keresztzennyeződés, Az eluátum stabilitása és a Kompatibilitás downstream alkalmazásokkal című részek hozzáadása

A licenccel kapcsolatos legfrissebb információk és a termékspecifikus jogi nyilatkozatok a megfelelő QIAGEN kit kézikönyvében, vagy felhasználói kézikönyvében található. A QIAGEN kitek kézikönyvei és felhasználói kézikönyvei a www.qiagen.com webhelyen érhetők el, illetve a QIAGEN műszaki ügyfélszolgálatától vagy a területileg illetékes forgalmazótól szerezhetők be.

Védjegyek: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, QIAamp®, EZ1®, UltraRun® (QIAGEN Group); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.). A dokumentumban használt bejegyzett nevek, védjegyek stb. akkor sem tekinthetők a törvény védelmén kívül esőnek, ha nincsenek külön jelöléssel ellátva.

06/2022 HB-3029-D01-001 © 2022 QIAGEN, minden jog fenntartva.

