



Tháng 6 năm 2022

Hướng dẫn Sử dụng QIASymphony® DSP 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 DNA Mini Kit và QIASymphony DSP DNA Midi Kit



937236, 937255



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 thẻ tài nguyên của trang sản phẩm trên www.qiagen.com.

Giới thiệu chung

QIASymphony DSP DNA Kits chỉ được sử dụng kết hợp với QIASymphony SP.

QIASymphony DSP DNA Mini Kit cung cấp thuốc thử để lọc tự động DNA toàn phần từ máu toàn phần ở người, lớp đệm, các mẫu mô và mô cố định formalin, gắn paraffin (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) cũng như DNA của vi-rút từ máu toàn phần ở người. QIASymphony DSP DNA Midi Kit cung cấp thuốc thử để tự động lọc DNA toàn phần từ máu toàn phần ở người và lớp đệm. Tuy nhiên, các đặc tính hiệu suất cho mọi loại mô hoặc ống lấy máu vẫn chưa được thiết lập và phải được người dùng xác nhận.

Công nghệ hạt từ cho phép lọc các axit nucleic chất lượng cao không chứa protein, nuclease và các tạp chất khác. Các axit nucleic đã lọc đã sẵn sàng để sử dụng trực tiếp trong các ứng dụng xuôi dòng, chẳng hạn như phản ứng khuếch đại (PCR). 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.

Trong dữ liệu hiệu suất được chọn sau đây cho các ứng dụng khác nhau được hiển thị.

Đặc tính Hiệu năng

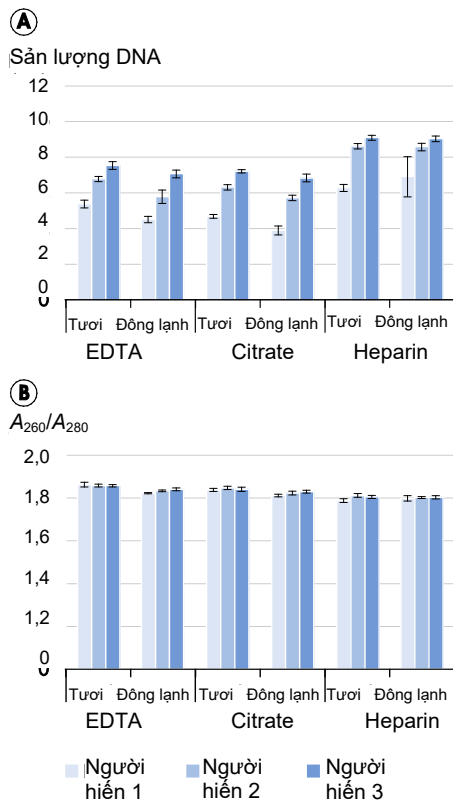
Lưu ý: Đặc tính Hiệu suất phụ thuộc nhiều vào các yếu tố khác nhau và liên quan đến ứng dụng xuôi dòng cụ thể. Đặc tính Hiệu suất đã được thiết lập cho QIASymphony DSP DNA Mini và Midi Kit kết hợp với các ứng dụng xuôi dòng mẫu. Tuy nhiên, các phương pháp phân lập axit nucleic từ bệnh phẩm sinh học được sử dụng như một phương pháp phụ trợ cho nhiều ứng dụng xuôi dòng. Các thông số hiệu suất như nhiễm bẩn chéo hoặc độ chụm lần chạy cần được thiết lập cho bất kỳ quy trình làm việc nào như một phần của quá trình phát triển ứng dụng xuôi dòng. Do đó, người dùng có trách nhiệm xác nhận toàn bộ quy trình làm việc để thiết lập các thông số hiệu suất phù hợp.

Hiệu suất cơ bản và khả năng tương thích với các ứng dụng xuôi dòng khác nhau

Máu DNA và lớp đệm

Sản lượng DNA

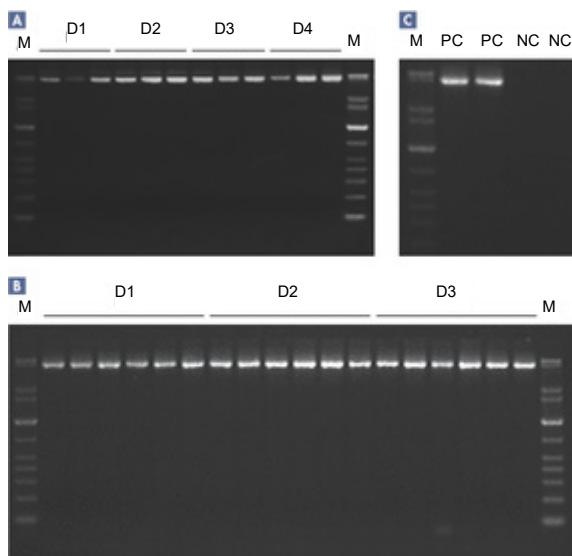
Hiệu suất cơ bản của QIASymphony DSP DNA Mini Kit được đánh giá bằng cách sử dụng các ống thu gom và chất chống đông máu khác nhau, cũng như máu toàn phần tươi và đông lạnh ở người. Máu toàn phần được thu gom từ 3 người hiến khỏe mạnh (số lượng bạch cầu [White Blood Cell, WBC] từ 4,0 đến 11,0 x 10⁶ tế bào/mL) trong 3 loại ống khác nhau: EDTA, 10 mL BD™ Vacutainer® 16 x 100 mm (K2-EDTA); citrate, ống 2,7 mL Sarstedt® S-Monovette® 9NC 13 x 75 mm (citrate); heparin, 7,5 mL Sarstedt S-Monovette 15 x 92 mm (Li-Heparin). Máu được sử dụng hoặc tươi (bảo quản ở 2–8 °C) hoặc đông lạnh (bảo quản ở –20 °C). DNA bộ gen được lọc từ 200 µL mẫu, với 4 bản sao cho mỗi người hiến và loại ống, sử dụng QIASymphony DSP DNA Mini Kit và giao thức máu DSP 200 với thể tích rửa giải 200 µL. Sản lượng và độ tinh khiết của DNA được xác định bằng phân tích quang phổ (Hình 1).



Hình 1. Sản lượng và độ tinh khiết của DNA bằng cách sử dụng các ống thu gom mẫu khác nhau và các chất chống đông máu với máu toàn phần tươi và đông lạnh ở người. A Sản lượng DNA, các thanh thể hiện sản lượng DNA tuyệt đối với độ lệch chuẩn. **B** Độ tinh khiết của DNA, các thanh thể hiện độ tinh khiết của DNA với độ lệch chuẩn.

Tính toàn vẹn của DNA

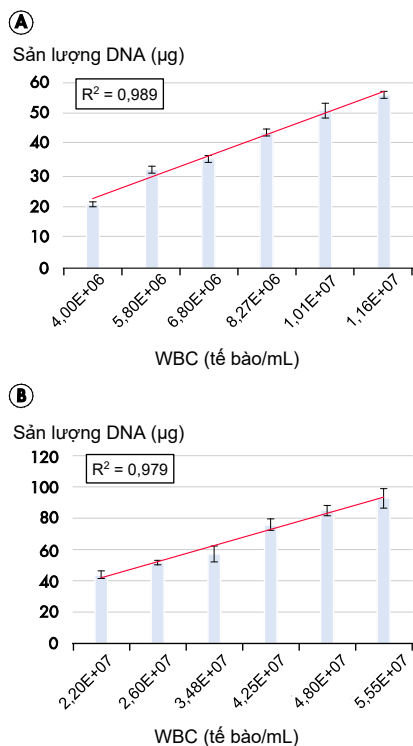
Các sản phẩm PCR tăng dần (5 kb) được khuếch đại bằng cách sử dụng xét nghiệm PCR LongRange (Hình 2).



Hình 2. Tính toàn vẹn của DNA được xét nghiệm bằng PCR tăng dần. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder. **A** Máu toàn phần được lấy từ 4 người hiến khỏe mạnh (D) trong các ống BD K2E. DNA bộ gen cho PCR tăng dần đã được lọc từ các phần 200 μ L trong ba lần bằng cách sử dụng QIASymphony DSP DNA Mini Kit và giao thức DSP máu 200 với thể tích rửa giải 200 μ L. D1, người hiến 1; D2, người hiến 2; D3, người hiến 3; và D4, người hiến 4. **B** Máu toàn phần được lấy từ 3 người hiến khỏe mạnh trong các ống BD K2E và lớp đệm đã được chuẩn bị. DNA bộ gen đã được lọc từ các phần 200 μ L trong 6 lần bằng cách sử dụng QIASymphony DSP DNA Mini Kit và giao thức lớp đệm 200 DSP với thể tích rửa giải 200 μ L. D1, người hiến 1; D2, người hiến 2; and D3, người hiến 3. **C** Mẫu chứng: PC, mẫu chứng dương; và NC, mẫu chứng âm.

Mối tương quan giữa sản lượng DNA và số lượng WBC

Hiệu suất cho QIASymphony DSP DNA Blood và các ứng dụng lớp đệm được đánh giá bằng cách sử dụng các mẫu máu và lớp đệm với 6 số lượng WBC khác nhau cho mỗi loại mẫu. Đối với máu toàn phần, số lượng WBC nằm trong khoảng từ 4×10^6 tế bào/mL đến $11,6 \times 10^6$ tế bào/mL và đối với lớp đệm, số lượng nằm trong khoảng từ $2,2 \times 10^7$ tế bào/mL đến $5,6 \times 10^7$ tế bào/mL. Sản lượng DNA được xác định bằng phân tích quang phổ và vẽ đồ thị dựa trên số lượng WBC (Hình 3).



Hình 3. Mối tương quan giữa sản lượng DNA và số lượng WBC. A DNA bộ gen được lọc từ 1 mL máu toàn phần ở người bằng cách sử dụng QIASymphony DSP DNA Midi Kit và giao thức máu 1000 DSP với thể tích rửa giải là 500 µL. Các thanh thể hiện sản lượng DNA tuyệt đối với độ lệch chuẩn. B DNA bộ gen được lọc từ 400 µL lớp đệm bằng cách sử dụng QIASymphony DSP DNA Midi Kit và giao thức Ớp đệm 400 DSP với thể tích rửa giải là 400 µL. Các thanh thể hiện sản lượng DNA tuyệt đối với độ lệch chuẩn.

Máu vi-rút

Các nghiên cứu về hệ số trùng được thực hiện bằng cách pha loãng vật liệu tiêu chuẩn WHO cho CMV đã được định lượng trước trong máu toàn phần ở người âm tính với CMV. Đã quan sát thấy tỷ lệ phát hiện 100% đối với các mẫu có tải lượng vi-rút là 90 IU CMV trên mỗi mililit (Bảng 1).

Bảng 1. Độ nhạy của ứng dụng QIASymphony DSP Virus Blood

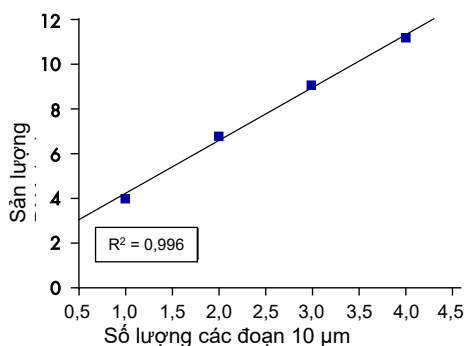
CMV (IU/mL)	Số bản sao	Các tỷ lệ trùng	Tỷ lệ trùng (%)
350	18	18	100,00
230	32	32	100,00
115	31	31	100,00
90	32	32	100,00
60	30	24	80,00
30	30	15	50,00
15	30	10	33,33
6	21	5	23,81
2	21	2	9,52
0	15	0	0,00

Máu toàn phần ở người được lấy từ 1 người hiến khỏe mạnh âm tính với CMV trong các ống BD K2E và được pha với vật liệu tiêu chuẩn WHO cho CMV sử dụng các chuẩn độ khác nhau. DNA của vi-rút đã được lọc bằng cách sử dụng QIASymphony DSP DNA Mini Kit và giao thức máu vi-rút 200 DSP với thể tích rửa giải là 60 µL. Các dịch rửa giải được phân tích bằng xét nghiệm real-time PCR cho CMV.

Mô và Mô FFPE

Sản lượng DNA

Hiệu suất cho ứng dụng mô FFPE QIASymphony DSP DNA được đánh giá bằng cách sử dụng 6 bản sao của các đoạn FFPE từ 1–4, 10 µm, của lá lách người mới cắt. Tách chiết DNA được thực hiện bằng cách sử dụng QIASymphony DSP DNA Mini Kit kết hợp với giao thức DSP hàm lượng thấp của mô. Khử paraffin và ly giải được thực hiện bằng phương pháp tiền xử lý xylene/ethanol. DNA được rửa giải trong 50 µL chất đệm rửa giải và sản lượng DNA được xác định bằng phân tích quang phổ (Hình 4).



Hình 4. Mối tương quan giữa sản lượng DNA và số lượng đoạn mô FFPE. Sáu bản sao của các đoạn mô FFPE từ 1–4, 10 µm của lá lách người đã được khử paraffin bằng phương pháp tiền xử lý xylene/ethanol. Tách chiết DNA được thực hiện trên QIASymphony SP bằng cách sử dụng QIASymphony DSP DNA Mini Kit kết hợp với giao thức DSP hàm lượng thấp của mô và 50 µL thể tích rửa giải.

Phân tích trạng thái đột biến của các chỉ dấu sinh học bằng real-time PCR

Phân tích trạng thái đột biến của các chỉ dấu sinh học được thực hiện bằng cách sử dụng DNA tách chiết từ các đoạn FFPE của đại tràng người và DNA tách chiết từ các mẫu mô phổi người.

Để tách chiết DNA từ các mẫu mô FFPE, các đoạn 3 x 10 µm của đại tràng người được sử dụng để chuẩn bị mẫu. Tách chiết DNA được thực hiện bằng cách sử dụng Deparaffinization Solution cho tiền xử lý và giao thức DSP hàm lượng thấp của mô kết hợp với 100 µL thể tích rửa giải. Phân tích đột biến của chỉ dấu sinh học KRAS được thực hiện bằng cách sử dụng xét nghiệm real-time PCR để phát hiện KRAS phù hợp với số tay xét nghiệm. Giá trị C_T của xét nghiệm đối chứng nằm trong phạm vi xác định và phân tích phát hiện đột biến cho thấy sự thay thế axit amin trong codon 12, điều này được chứng minh bằng giá trị ΔC_T là 4,17, thấp hơn giá trị ngưỡng là 8 được xác định để phát hiện đột biến 12SER (Bảng 2).

Bảng 2. Kết quả phân tích đột biến chỉ dấu sinh học KRAS của mô FFPE

Mẫu	Phản ứng	C _T đích	C _T mẫu chứng nội	ΔC _T *
Mẫu chứng không mẫu	Mẫu chứng	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	–
Chất chuẩn	Mẫu chứng	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
Mô FFPE (đại tràng người)	Mẫu chứng	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, trong đó M có nghĩa là đột biến và C có nghĩa là mẫu chứng; n.d., không được phát hiện.

Để tách chiết DNA từ các mẫu mô đông lạnh, 25 mg mô phổi người được sử dụng để chuẩn bị mẫu bằng cách sử dụng giao thức DSP hàm lượng cao của mô và thể tích rửa giải là 200 μL. Phân tích đột biến của chỉ dấu sinh học EGFR được thực hiện bằng cách sử dụng xét nghiệm real-time PCR cho EGFR. Phân tích mẫu chứng và phát hiện đột biến được thực hiện như mô tả trong sổ tay xét nghiệm. Kết quả cho thấy có sự mất đoạn trong gen EGFR, điều này được chứng minh bằng giá trị ΔC_T là 2,47, thấp hơn giá trị ngưỡng được xác định để phát hiện đột biến là 12 (Bảng 3).

Bảng 3. Kết quả phân tích đột biến chỉ dấu sinh học EGFR của mô đông lạnh

Mẫu	Phản ứng	C _T đích	C _T mẫu chứng nội	ΔC _T *
Mẫu chứng không mẫu	Mẫu chứng	0,00	31,71	–
	T790M	0,00	32,36	–
	Mất đoạn	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	–
Chất chuẩn	Mẫu chứng	28,78	31,05	–
	T790M	30,08	31,13	1,30
	Mất đoạn	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
Mô (phối người)	Mẫu chứng	25,76	31,23	–
	T790M	n.d.	31,99	–
	Mất đoạn	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, trong đó M có nghĩa là đột biến và C có nghĩa là mẫu chứng; n.d., không được phát hiện.

Tính lặp lại và tính tái lập

Máu DNA

Tách chiết DNA được thực hiện bằng cách sử dụng giao thức máu 200 DSP với thể tích rửa giải là 200 μL. Độ lặp lại được đánh giá bởi một người vận hành duy nhất thực hiện 3 lần chạy độc lập (mỗi lần 96 mẫu) vào 3 ngày khác nhau, với mỗi lần chạy bao gồm 4 lô 24 mẫu (Bảng 4 và Bảng 5).

Độ tái lập được đánh giá bằng cách thực hiện 3 lần chạy độc lập (mỗi lần 96 mẫu) vào 3 ngày khác nhau, bởi 3 người vận hành khác nhau trên các dụng cụ QIAsymphony SP khác nhau, với mỗi lần chạy bao gồm 4 lô 24 mẫu (Bảng 6 và Bảng 7).

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ lặp lại

Lần chạy	Lô	n	Sản lượng DNA trung bình (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	5,17	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
Tổng	–	288	4,96	–	–

n, Số lượng bản sao; SD, độ lệch chuẩn; CV, hệ số biến thiên.

Bảng 5. Dữ liệu độ chụm để đánh giá độ lặp lại

	SD	CV
Giữa các lô trong cùng một lần chạy	0,25	4,95
Độ chính xác lặp lại tổng thể	0,26	5,18

SD, độ lệch chuẩn; CV, hệ số biến thiên.

Bảng 6. Kết quả đánh giá độ tái lập

Lần chạy	Lô	n	Sản lượng DNA trung bình (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
Tổng	–	288	5,38	–	–

n, Số lượng bản sao; SD, độ lệch chuẩn; CV, hệ số biến thiên.

Bảng 7. Dữ liệu độ chụm để đánh giá độ tái lập

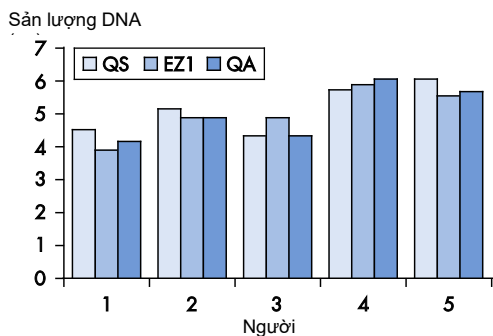
	SD	CV
Giữa các lô trong cùng một lần chạy	0,25	4,73
Độ chính xác lặp lại tổng thể	0,38	7,03

SD, độ lệch chuẩn; CV, hệ số biến thiên.

Hiệu suất so sánh

Máu DNA

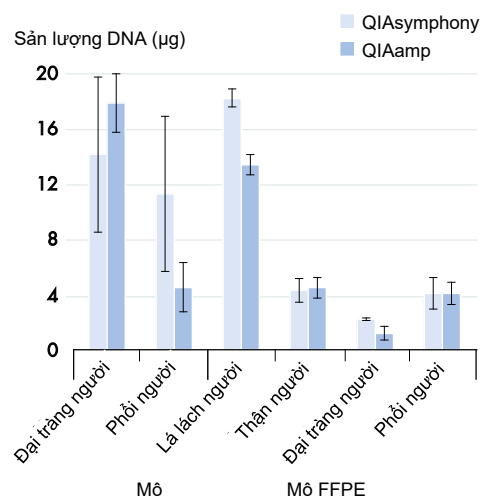
Hiệu suất được phân tích cho hệ thống máu QIAAsymphony DSP DNA so với hệ thống máu DNA EZ1[®] DSP và quy trình chuẩn bị thủ công QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit. DNA được lọc từ các mẫu máu khác nhau, được phân tích cho sản lượng DNA (Hình 5).



Hình 5. So sánh sản lượng DNA giữa các hệ thống lọc DNA máu khác nhau. Máu toàn phần được lấy từ 5 người hiến khỏe mạnh trong các ống BD K2E. Đối với tất cả các phương pháp, thể tích đầu vào vào mẫu 200 μ L và thể tích rửa giải 200 μ L được sử dụng. QS, QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit và giao thức máu 200 DSP; EZ1, EZ1 Advanced XL sử dụng EZ1 DSP DNA Blood Kit; QA, QIAamp DNA Blood Mini Kit. Các thanh thể hiện sản lượng DNA tuyệt đối cho mỗi mẫu.

Mô và Mô FFPE

Hiệu suất của QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit được so sánh với hiệu suất của QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit thủ công và QIAamp DSP DNA Mini Kit sử dụng mô FFPE, mô tươi và mô đông lạnh tương ứng làm vật liệu mẫu. Việc chuẩn bị mẫu thủ công và tự động, cũng như định lượng sản lượng DNA, được thực hiện đồng thời. Sản lượng DNA sau khi tách chiết từ các mẫu mô tươi/đông lạnh và mô FFPE bằng cách sử dụng QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit, QIAamp DSP DNA Mini Kit, (mô) và QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (mô FFPE) được hiển thị trong Hình 6.



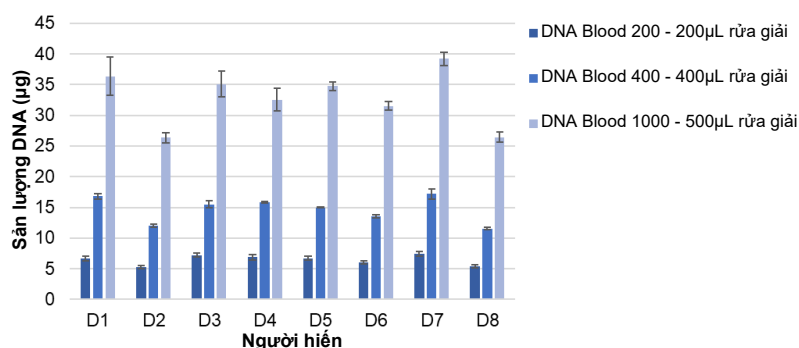
Hình 6. Tách chiết DNA từ các mẫu mô và mô FFPE. Đối với mô tươi/đông lạnh, các mẫu phổi và đại tràng người được cắt thành các mảnh 6 x 25 mg. Ba mảnh của mỗi loại mô được sử dụng để chuẩn bị mẫu bằng QIAAsymphony SP kết hợp với giao thức DSP hàm lượng cao của mô. Tách chiết DNA từ các mẫu còn lại được thực hiện bằng QIAamp DSP DNA Mini Kit. DNA được rửa giải trong 200 μ L và sản lượng DNA được xác định bằng phân tích quang phổ. Để tách chiết DNA từ mô FFPE, 12 bản sao có chứa các đoạn mô FFPE 3 x 10 μ m từ các bộ phận cơ thể người khác nhau đã được chuẩn bị. Sáu mẫu được sử dụng để chuẩn bị mẫu bằng QIAAsymphony SP kết hợp với tiền xử lý Deparaffinization Solution và giao thức DSP hàm lượng thấp của mô. Tách chiết DNA từ các mẫu còn lại được thực hiện bằng QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. DNA được rửa giải trong 50 μ L và sản lượng DNA được xác định bằng phân tích quang phổ. Các thanh thể hiện sản lượng DNA tuyệt đối với độ lệch chuẩn.

Phạm vi đầu vào mẫu/ đầu ra dịch rửa giải

Máu DNA

Các phạm vi đầu vào và đầu ra dịch rửa giải khác nhau cho ứng dụng máu DNA được so sánh bằng cách sử dụng các mẫu từ những người hiến máu có phạm vi số lượng WBC từ $5,0$ đến $8,0 \times 10^6$ tế bào/mL.

Máu toàn phần được lấy từ 8 người hiến khỏe mạnh trong các ống BD K2E. DNA được lọc từ 6 bản sao, mỗi bản sao sử dụng QIASymphony DSP DNA Mini/Midi Kit và giao thức DNA blood 200 DSP với thể tích rửa giải $200 \mu\text{L}$, giao thức DNA blood 400 DSP với thể tích rửa giải $400 \mu\text{L}$ và giao thức DNA blood 1000 DSP với thể tích rửa giải $500 \mu\text{L}$ (Hình 7).

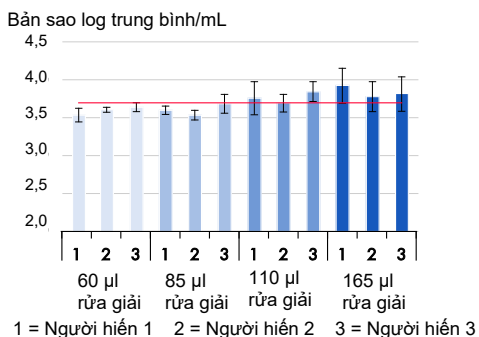


Hình 7. So sánh các đầu vào mẫu và thể tích rửa giải khác nhau cho các hệ thống lọc DNA máu. Máu toàn phần được lấy từ 8 người hiến khỏe mạnh trong các ống BD K2E. Tách chiết DNA được thực hiện bằng cách sử dụng giao thức DNA blood 200 với thể tích rửa giải $200 \mu\text{L}$, giao thức DNA blood 400 với thể tích rửa giải $400 \mu\text{L}$ và giao thức DNA blood 1000 với thể tích rửa giải $500 \mu\text{L}$. Sản lượng DNA được xác định bằng phân tích quang phổ.

Các thanh hiển thị sản lượng DNA tuyệt đối (giá trị trung bình với độ lệch chuẩn) cho mỗi người hiến.

Máu vi-rút

Máu toàn phần được lấy từ 3 người hiến khỏe mạnh, với số lượng WBC từ $4,0$ đến $11,0 \times 10^6$ tế bào/mL, trong ống BD K2E và được pha với vật liệu tiêu chuẩn cho CMV (chuẩn độ $3,7 \log$ bản sao/mL). DNA của vi-rút được lọc từ 7 bản sao, mỗi bản sao sử dụng QIASymphony DSP DNA Mini Kit và giao thức máu vi-rút 200 DSP với 4 thể tích rửa giải khác nhau (Hình 8).



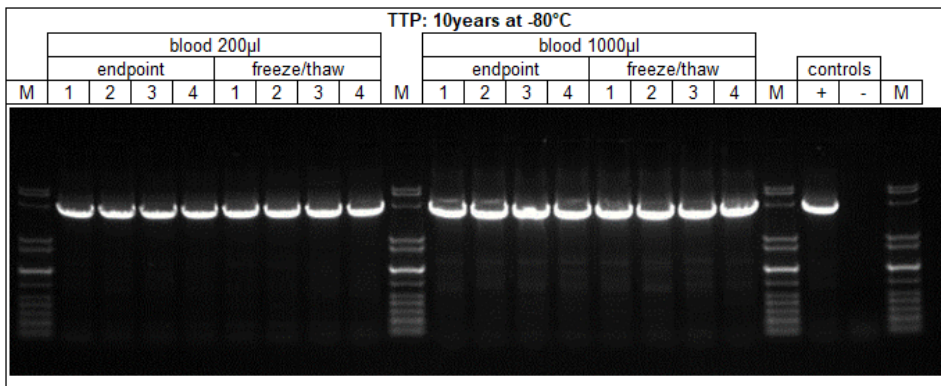
Hình 8. So sánh định lượng DNA của vi-rút đối với các thể tích rửa giải khác nhau. Các dịch rửa giải từ mỗi mẫu cho và thể tích rửa giải (60 , 85 , 110 và $165 \mu\text{L}$) được phân tích bằng xét nghiệm real-time PCR cho CMV. Đường màu đỏ thể hiện chuẩn độ đích và các thanh hiển thị số lượng bản sao log trung bình trên mỗi millilit với độ lệch chuẩn.

Độ ổn định của dịch rửa giải

Lưu ý: Độ ổn định của dịch rửa giải phụ thuộc nhiều vào các yếu tố khác nhau và liên quan đến ứng dụng xuôi dòng cụ thể. Độ ổn định của mẫu đã được thiết lập cho QIASymphony DSP Mini và Midi Kit kết hợp với các ứng dụng xuôi dòng mẫu. Người dùng có trách nhiệm tham khảo hướng dẫn sử dụng của ứng dụng xuôi dòng cụ thể được sử dụng trong phòng thí nghiệm và/hoặc xác nhận toàn bộ quy trình làm việc để thiết lập các điều kiện bảo quản thích hợp.

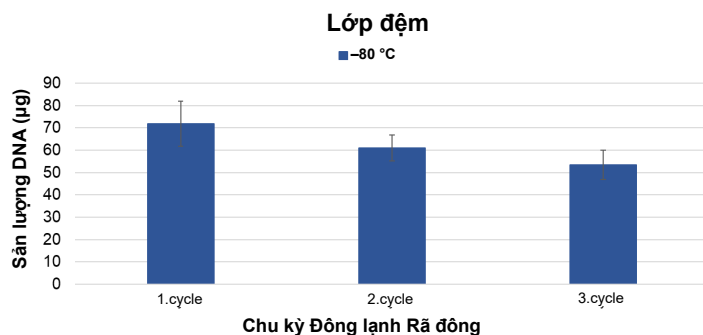
Máu DNA và lớp đệm

Độ ổn định của dịch rửa giải cho ứng dụng máu DNA được xét nghiệm bằng cách sử dụng các dịch rửa giải từ các lần chạy QS được thực hiện với giao thức DNA Blood 200 với thể tích rửa giải 200 μL và với giao thức DNA Blood 1000 với thể tích rửa giải 500 μL . Các dịch rửa giải được bảo quản trong Ống Sarstedt 2 mL ở nhiệt độ phòng, 2–8 $^{\circ}\text{C}$, –20 $^{\circ}\text{C}$ và –80 $^{\circ}\text{C}$. Sản lượng và độ tinh khiết của DNA được xác định bằng phân tích quang phổ. Tính toàn vẹn của DNA được phân tích bằng điện di trên gel và xét nghiệm PCR LongRange (Hình 9).



Hình 9. Độ ổn định của dịch rửa giải đối với máu DNA. DNA được lọc bằng cách sử dụng các giao thức DNA Blood 200 μL và 1000 μL . Các dịch rửa giải được bảo quản ở –80 $^{\circ}\text{C}$ trong các Ống Sarstedt 2 mL. Bốn bản sao đã được phân tích. Tính toàn vẹn của DNA được xét nghiệm bằng PCR tăng dần. Các số liệu cho thấy kết quả sau khi bảo quản trong 10 năm. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder.

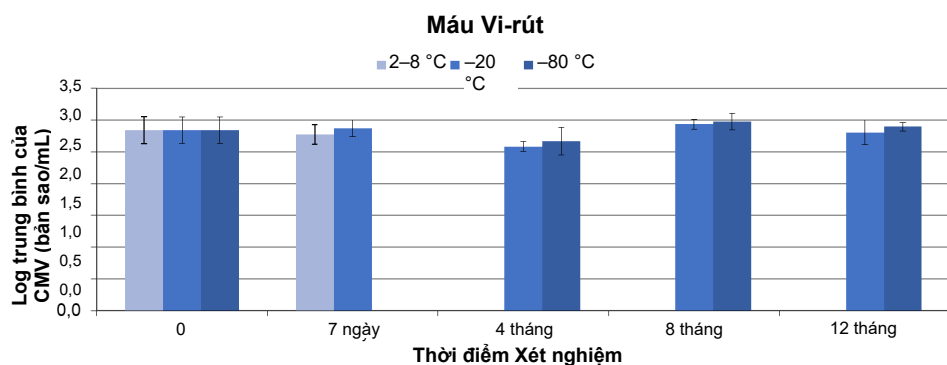
Độ ổn định của dịch rửa giải cho ứng dụng lớp đệm đã được xét nghiệm bằng cách sử dụng các dịch rửa giải từ các lần chạy QS được thực hiện với giao thức BC 400 μL và thể tích rửa giải 200 μL . Các dịch rửa giải được bảo quản trong Ống Sarstedt 2 mL và Giá đỡ ống nhỏ chứa dịch rửa giải ở nhiệt độ phòng, 2–8 $^{\circ}\text{C}$, –20 $^{\circ}\text{C}$ và –80 $^{\circ}\text{C}$. Hơn nữa, các dịch rửa giải đã được xét nghiệm đông lạnh/rã đông trong tối đa 3 chu kỳ (Hình 10). Sản lượng và độ tinh khiết của DNA được xác định bằng phân tích quang phổ. Tính toàn vẹn của DNA được phân tích bằng điện di trên gel và xét nghiệm PCR LongRange (phản ứng 50 μL).



Hình 10. Chu kỳ đông lạnh/rã đông đối với lớp đệm. DNA được lọc bằng cách sử dụng giao thức DNA BC 400 μL . Lớp đệm được tạo ra từ máu EDTA. Các dịch rửa giải được bảo quản trong các Ống Sarstedt 2 mL. Sản lượng DNA được xác định tại các thời điểm xét nghiệm bằng cách sử dụng cùng một dịch rửa giải ở 3 chu kỳ đông lạnh/rã đông. Sản lượng DNA được xác định bằng phân tích quang phổ. Các thanh hiển thị sản lượng DNA tuyệt đối (giá trị trung bình với độ lệch chuẩn).

Máu vi-rút

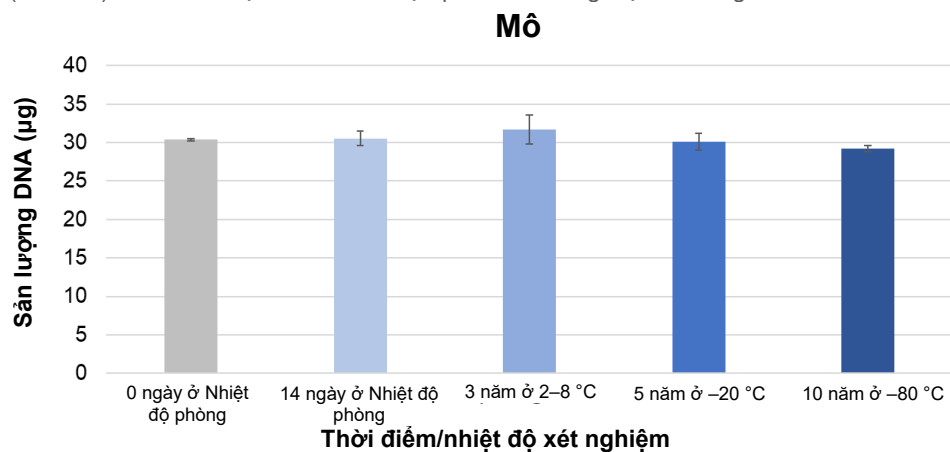
Độ ổn định của dịch rửa giải cho ứng dụng máu vi-rút đã được xét nghiệm bằng cách sử dụng các dịch rửa giải từ các lần chạy QS được thực hiện với giao thức Virus Blood 200 và thể tích rửa giải 60 μL . K₂ Máu EDTA được pha với chất chuẩn CMV thương mại (chuẩn độ 2,7 log bản sao/mL) được sử dụng làm vật liệu mẫu. Các dịch rửa giải được bảo quản trong Ống Sarstedt 2 mL ở 2–8 °C, –20 °C và –80 °C. Các dịch rửa giải khác được phân tích bằng cách sử dụng xét nghiệm thời gian thực cho CMV (Hình 11). Sau đây, kết quả của một số thời điểm xét nghiệm được hiển thị.



Hình 11. Độ ổn định của dịch rửa giải đối với ứng dụng máu vi-rút. Các mẫu máu EDTA được pha với chất chuẩn CMV thương mại đã được lọc bằng quy trình Virus Blood 200. Các dịch rửa giải đã được bảo quản ở một số nhiệt độ trong các Giá đỡ ống nhỏ chứa dịch rửa giải và Ống Sarstedt 2 mL. Mỗi thời điểm xét nghiệm có 4 bản sao được phân tích. Các thanh hiển thị chuẩn độ CMV (giá trị log trung bình với độ lệch chuẩn).

Mô

Độ ổn định của dịch rửa giải cho ứng dụng mô đã được xét nghiệm bằng cách sử dụng giao thức Tissue HC 200 μL và thể tích rửa giải 200 μL . Gan bò tươi được sử dụng làm vật liệu mẫu. Các dịch rửa giải được bảo quản trong Ống Sarstedt 2 mL và Giá đỡ ống nhỏ chứa dịch rửa giải ở nhiệt độ phòng, 2–8 °C, –20 °C và –80 °C. Sản lượng và độ tinh khiết của DNA được xác định bằng phân tích quang phổ (Hình 12). Tính toán vẹn của DNA được phân tích bằng điện di trên gel.

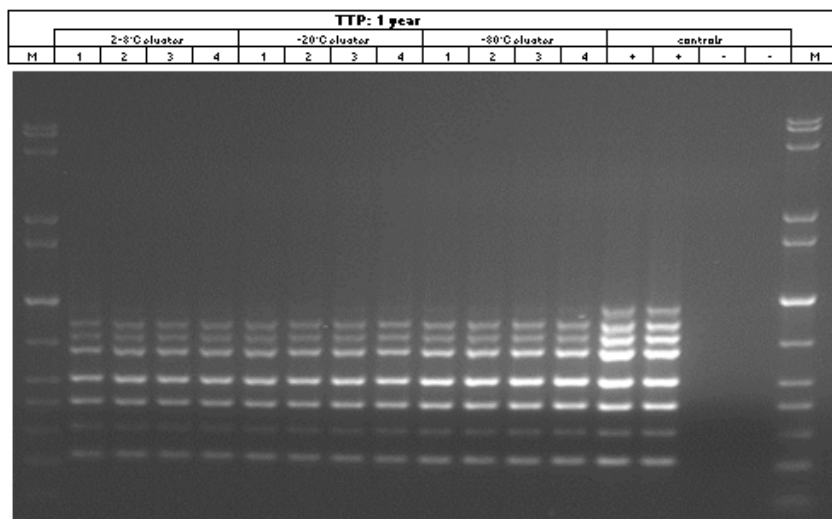


Hình 12. Độ ổn định của dịch rửa giải đối với mô. DNA được lọc bằng cách sử dụng giao thức DNA Tissue HC với thể tích rửa giải 200 μL . Gan bò tươi được sử dụng làm vật liệu mẫu. Các dịch rửa giải đã được bảo quản ở một số nhiệt độ trong các Giá đỡ ống nhỏ chứa dịch rửa giải và Ống Sarstedt 2 mL. Mỗi thời điểm xét nghiệm có 4 bản sao được phân tích. Sản lượng DNA được xác định bằng phân tích quang phổ. Các thanh hiển thị sản lượng DNA tuyệt đối (giá trị trung bình với độ lệch chuẩn).

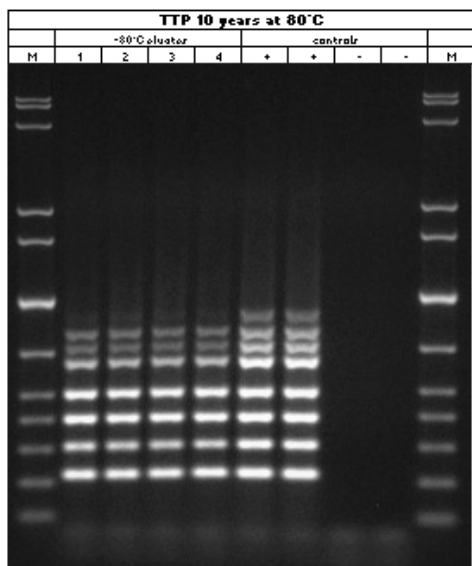
Mô FFPE

Độ ổn định của dịch rửa giải cho ứng dụng mô FFPE đã được xét nghiệm bằng cách sử dụng giao thức Tissue LC 200 μL và thể tích rửa giải 100 μL . Mô FFPE ở người thương mại đã được sử dụng làm vật liệu mẫu. Các dịch rửa giải được bảo quản trong Ống Sarstedt 2 mL và Giá đỡ ống nhỏ chứa dịch rửa giải ở nhiệt độ phòng, 2–8 °C, –20 °C và –80 °C. Các dịch rửa giải đã được phân tích với xét nghiệm 8-plex PCR nội bộ ở người (Hình 13). Sau đây, kết quả của hai thời điểm xét nghiệm được hiển thị.

A:



B:



Hình 13. Độ ổn định của dịch rửa giải đối với mô FFPE. DNA được lọc bằng cách sử dụng giao thức DNA Tissue LC. Mô FFPE thương mại đã được sử dụng làm vật liệu mẫu. Các dịch rửa giải đã được bảo quản ở một số nhiệt độ trong các Giá đỡ ống nhỏ chứa dịch rửa giải và Ống Sarstedt 2 mL. Mỗi thời điểm xét nghiệm có 4 bản sao được phân tích. Các dịch rửa giải được phân tích bằng xét nghiệm 8-plex PCR nội bộ ở người.

Các chất gây nhiễu

Ảnh hưởng của các chất ức chế, có thể có trong máu toàn phần, đến hiệu suất của ứng dụng máu DNA, ứng dụng máu vi-rút và ứng dụng mô được xét nghiệm bằng cách bổ sung các chất sau:

Bảng 8. Các chất có khả năng gây nhiễu được xét nghiệm cho các ứng dụng khác nhau

Các chất gây nhiễu	Nồng độ	Máu	Máu vi-rút	Mô
Bilirubin	200 mg/L	√	√	√
Hemoglobin	200 g/L	√	√	
Triglyceride	30 g/L	√	√	√
Protein	120 g/L	√	√	√

Lưu ý: “√” cho biết vật liệu mẫu nào đã được xét nghiệm cho chất có khả năng gây nhiễu tương ứng.

Đối với hemoglobin (200 g/L) và protein (120 g/L), nồng độ hiện có trong mẫu máu được xác định và hemoglobin hoặc protein được thêm vào để đạt được nồng độ đã chỉ định, tương ứng là 200 hoặc 120 g/L. Đối với bilirubin (200 mg/L) và triglycerid (30 g/L), tổng lượng của mỗi chất được thêm vào mẫu để đạt được nồng độ đã chỉ định.

Đối với mô, tổng lượng của mỗi chất được thêm trực tiếp vào các chất ly giải, không xác định được nồng độ bilirubin, triglycerid hoặc protein của mẫu mô đã sử dụng.

Bất kỳ chất có khả năng gây nhiễu nào (ví dụ: ma túy) và nồng độ tương ứng đều rất đặc hiệu với ứng dụng xuôi dòng và các phương pháp điều trị y tế có thể có trước đó của bệnh nhân và cần được nghiên cứu trong quá trình xác minh ứng dụng xuôi dòng bằng cách sử dụng QIASymphony DSP DNA Mini và Midi Kit.

Lưu ý: Xét nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng các ứng dụng xuôi dòng mẫu để đánh giá chất lượng của các axit nucleic được tách chiết. Tuy nhiên, các ứng dụng xuôi dòng khác nhau có thể có các yêu cầu khác nhau về độ tinh (tức là không có hoặc nồng độ các chất có khả năng gây nhiễu), do đó, việc xác định và xét nghiệm các chất liên quan và nồng độ tương ứng cũng cần được thiết lập như một phần của quá trình phát triển ứng dụng xuôi dòng cho bất kỳ quy trình làm việc nào liên quan đến QIASymphony DSP Mini và Midi Kit.

Lưu ý: Xin lưu ý rằng trong quá trình phát triển QIASymphony DSP DNA Midi Kit không có dấu hiệu nào cho thấy heparin có tác động tiêu cực đến hiệu suất. Tuy nhiên, ISO 20186-2:2019 (E) quy định rằng heparin từ các ống lấy máu có thể ảnh hưởng đến độ tinh của các axit nucleic được phân lập và khả năng chuyển sang dịch rửa giải có thể gây ra ức chế trong một số ứng dụng xuôi dòng. Do đó, người dùng có trách nhiệm xác nhận xem liệu heparin có ảnh hưởng tiêu cực đến quy trình làm việc của họ hay không.

Máu DNA và lớp đệm

Đối với các ứng dụng máu DNA, xét nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng giao thức DSP DNA 1000, bao gồm thể tích mẫu đầu vào cao nhất, sử dụng thể tích rửa giải 200 và 500 µL.

Các dịch rửa giải được phân tích bằng phép phân tích quang phổ để tìm ra hiệu suất và độ tinh khiết của DNA. Khả năng tương thích của PCR được xét nghiệm bằng cách sử dụng real-time PCR cũng như xét nghiệm PCR điểm cuối.

Không có chất nào được liệt kê trong Bảng 9 gây nhiễu; tuy nhiên, các mẫu máu có nồng độ triglycerid cao (>30 g/L) có thể dẫn đến giảm sản lượng gDNA.

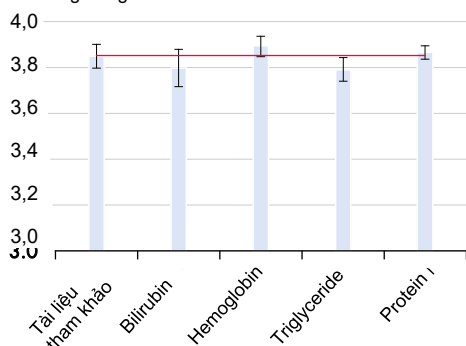
Máu vi-rút

Đối với ứng dụng máu vi-rút xét nghiệm được thực hiện bằng giao thức DSP Virus Blood 200 với thể tích rửa giải 60 μL . Các mẫu máu âm tính với CMV được pha với 500 bản sao/mL (nồng độ thấp) và 1×10^4 bản sao/mL (nồng độ cao, Hình 14) chất chuẩn CMV thương mại.

Các dịch rửa giải được phân tích bằng xét nghiệm real-time PCR cho CMV.

Không có chất nào được liệt kê trong Bảng 9 gây nhiễu; tuy nhiên, các mẫu máu có nồng độ triglycerid cao (>30 g/L) có thể làm giảm hoạt động lọc DNA của vi-rút.

Bản sao log trung bình/mL



Hình 14. Xét nghiệm chất ức chế. Máu toàn phần được lấy từ 1 người hiến khỏe mạnh trong ống BD K2E và được pha với vật liệu tiêu chuẩn cho CMV (chuẩn độ 4,0 log bản sao/mL). Năm mẫu được xét nghiệm bằng cách bổ sung các chất ức chế tiềm năng và DNA của vi-rút được lọc từ 4 bản sao của mỗi mẫu sử dụng QIASymphony DSP DNA Mini Kit và giao thức máu vi-rút 200 DSP với thể tích rửa giải là 165 μL . Các dịch rửa giải được phân tích bằng xét nghiệm real-time PCR cho CMV. Đường màu đỏ thể hiện chuẩn độ được xác định cho các mẫu tham chiếu, không được pha với bất kỳ chất ức chế nào và các thanh hiển thị bản sao log trung bình trên mililit với độ lệch chuẩn.

Mô

Đối với mô DNA (tươi và đông lạnh), xét nghiệm được thực hiện bằng giao thức DSP DNA HC, sử dụng thể tích rửa giải 200 μL .

Các dịch rửa giải được phân tích bằng phép phân tích quang phổ để tìm ra hiệu suất và độ tinh khiết của DNA. Khả năng tương thích của PCR được xét nghiệm bằng cách sử dụng xét nghiệm real-time PCR.

Không có chất nào được liệt kê trong Bảng 9 được xác định là có tác động tiêu cực đến việc chuẩn bị mẫu.

Mô FFPE

Đối với mô FFPE, xét nghiệm được thực hiện bằng giao thức DSP DNA LC, sử dụng thể tích rửa giải 50 μL .

Các chất (tham khảo Bảng 9) đã được thêm trực tiếp vào chất ly giải.

Bảng 9. Các chất có khả năng gây nhiễu được xét nghiệm cho các ứng dụng khác nhau

Các chất gây nhiễu	Nồng độ trong chất ly giải
Xylene	Lên đến 11%
Ethanol	Lên đến 11%
Deparaffinization solution	Lên đến 11%
Paraffin	Đoạn 0,1 µM

Các dịch rửa giải được phân tích bằng phép phân tích quang phổ để tìm ra hiệu suất và độ tinh khiết của DNA. Khả năng tương thích của PCR được xét nghiệm bằng cách sử dụng real-time PCR cũng như xét nghiệm 8-plex PCR.

Không có chất nào được liệt kê trong Bảng 9 được xác định là có tác động tiêu cực đến việc chuẩn bị mẫu.

Nhiễm bản chéo





Máu DNA

Nguy cơ nhiễm bản chéo của ứng dụng QIASymphony DNA Blood được phân tích bằng cách thực hiện bốn lần chạy 96 mẫu trên dụng cụ QIASymphony SP với các lô bàn cờ xen kẽ (mẫu dương tính và âm tính xen kẽ), bị gián đoạn bởi các lô hoàn toàn âm tính. Máu của nam giới (chứa số lượng WBC $\geq 1,0 \times 10^7$ tế bào/mL và máu của phụ nữ chứa số lượng WBC từ $4,0 \times 10^6$ đến 9×10^6 tế bào/mL) được sử dụng làm hệ thống mẫu. Chuẩn bị mẫu được thực hiện bằng cách sử dụng giao thức máu 1000 µL, bao gồm thể tích mẫu cao nhất. Khả năng nhiễm bản của các mẫu của phụ nữ âm tính trong quá trình tách chiết được đánh giá bằng cách phân tích tiếp theo các dịch rửa giải sử dụng real-time PCR cho nhiễm sắc thể Y.

Không phát hiện nhiễm bản chéo khi mang sang giữa các mẫu, hoặc giữa các lô, hoặc giữa các lượt chạy.

Biểu tượng

Các biểu tượng sau xuất hiện trong tài liệu này. Để biết danh sách đầy đủ các biểu tượng được sử dụng trong hướng dẫn sử dụng hoặc trên bao bì và nhãn mác, vui lòng tham khảo sổ tay.

Biểu tượng	Định nghĩa biểu tượng
	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
Rn	R là lần sửa đổi Hướng dẫn Sử dụng và n là số sửa đổi
	Nhà sản xuất

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 các phần về Các chất gây nhiễu, Nhiễm bản chéo, Độ ổn định của dịch rửa giải và Độ tương thích với các ứng dụng xuôi dòng

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®, QIAsymphony®, QIAamp®, EZ1®, UltraRun® (Tập đoàn QIAGEN); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.). 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.
06/2022 HB-3029-D01-001 © 2022 QIAGEN, tất cả quyền được bảo lưu.

