

Vznešený 2015

QIA Symphony[®] DSP DNA Kits: Charakteristika účinnosti

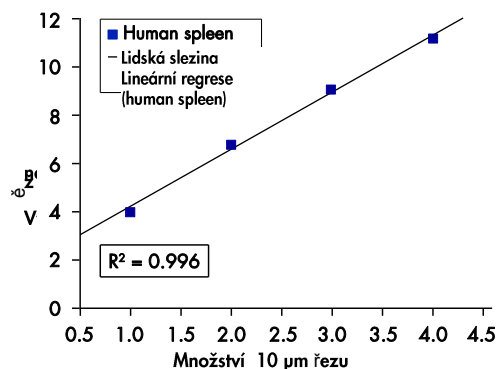
Tento dokument se nazývá *Sady QIA Symphony DSP DNA: Charakteristika účinnosti, R4, pro sady verze 1*

QIASymphony® DSP DNA Kity jsou určeny k použití pouze v kombinaci s QIASymphony SP. QIASymphony DSP DNA Mini Kity poskytují reagentie pro automatickou izolaci celkové DNA z lidské krve, buffy coat, tkání fixovaných formalinem, parafinových tkáňových řezů a virové DNA. QIASymphony DSP DNA Midi Kity poskytují reagentie pro automatickou izolaci celkové DNA z plně lidské krve a buffy coat.

Tkáně a FFPE tkáně

Lineární řada

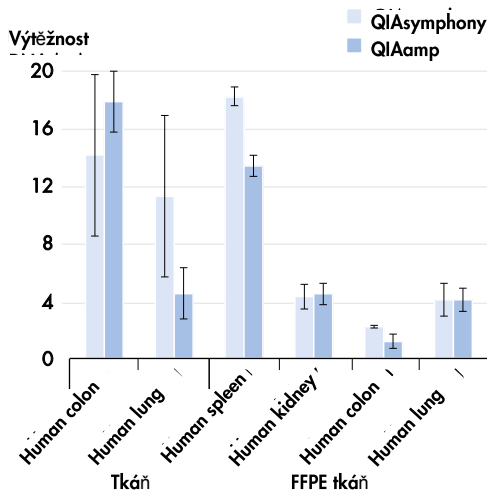
Lineární řada pro QIASymphony DSP DNA FFPE tissue aplikaci byla vyhodnocena provedením šesti opakování u vzorků 1-4 - 10 µm FFPE řezy z čerstvě odebrané lidské sleziny. Izolace DNA byla provedena s použitím QIASymphony DSP DNA Mini Kit v kombinaci s Tissue Low Content protokolem. Deparafinizace a lýza vzorku byly provedeny použitím xylenu/etanolu. DNA byla rozpuštěna v 50 µl elučního pufru a stanovena spektrofotomericky (obrázek 1).



obr.1 - lineární řada izolované DNA z FFPE tkáňových řezů. Šest opakování vzorků 1-4 - 10 µm FFPE tkáňové řezy z lidské sleziny byly deparafinizovány působením směsi xylenu/etanolu. Extrakce DNA byla provedena v přístroji QIASymphony SP pomocí sady QIASymphony DSP DNA Mini ve spojení s protokolem DSP pro nízký obsah tkání a elučním objemem 50 µl.

Porovnání výtěžnosti

Výtěžnost QIASymphony DSP DNA Mini Kitu byla porovnána s manuálním kitem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit a QIAamp DSP DNA Mini Kit při použití FFPE tkáně a čerstvé nebo zmražené tkáně. Manuální a automatická izolace stejně jako kvantifikace výtěžnosti DNA byla provedena souběžně. Výtěžnost DNA po izolaci z čerstvé nebo zmražené tkáně a FFPE tkáňových vzorků za použití QIASymphony DSP DNA Mini Kitu, QIAamp DSP DNA Mini Kitu a QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kitu jsou znázorněny na obrázku 2, strana 5.



Obr.2 - Izolace DNA z tkáně a FFPE vzorku. Čerstvá/zmražená tkáň: vzorky lidských plic a tlustého stěva byly rozřezány na 6 25mg kousků. Tři kousky každého typu tkáně byly použity na přípravu vzorku s využitím přístroje QIAasymphony SP ve spojení s protokolem DSP pro vysoký obsah tkáně. Izolace DNA ze zbývajících vzorků byla provedena s použitím QIAamp DSP DNA Mini Kitu. DNA byla rozpuštěna ve 200 µl a výtěžnost DNA byla stanovena spektrofotometricky. Pro izolaci DNA z FFPE tkáně bylo připraveno 12 opakování obsahující 3 x 10 µm FFPE části tkání z různých lidských orgánů. Šest vzorků bylo použito pro přípravu vzorku s využitím přístroje QIAasymphony SP ve spojení s předběžnou přípravou deparafinizačním roztoku a protokolem DSP pro nízký obsah tkáně. Izolace DNA ze zbývajících vzorků byla provedena pomocí QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kitu. DNA byla rozpuštěna v 50 µl a výtěžnost DNA byla zjištěna spektrofotometricky. Sloupce zobrazují absolutní výtěžnost DNA se standardní odchylkou.

Analýza mutací biomarkerů pomocí Real-Time PCR

Analýza mutací biomarkerů bylo provedena pomocí DNA izolované z FFPE řezů lidského tračnicku a DNA izolované ze vzorků lidských plicních tkání.

Pro izolaci DNA z FFPE tkání byly použity 3 x 10 µm řezy lidského tračnicku. Extrakce DNA byla provedena pomocí deparafinizačního roztoku 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 KRAS RGQ PCR Kitu podle návodu soupravy. Hodnoty CT kontrolního testu byly ve vymezeném rozsahu a mutační analýza odhalila aminokyselinovou substituci v kodonu 12 (tabulka 1, strana 4).

Extrakce DNA ze zmražených vzorků tkáně: pro přípravu vzorku bylo použito 25 mg lidských plic s využitím protokolu DSP pro vysoký obsah tkáně a 200 µl elučního objemu. Kontrolní test a test pro detekci mutací byly připraveny dle návodu uvedeného v příručce k therascreen® EGFR RGQ PCR Kit. Výsledky odhalily delecí uvnitř EGFR genu, což bylo demonstrováno jako ΔCT s hodnotou 2.47, která je nižší než definovaná hodnota cut-off=12 pro detekci mutace (tabulka 2, strana 5).

Tab.1 - Výsledek FFPE tkáně KRAS biomarker mutačních analýz

Vzorek	Reakce	target CT	Interní kontrola CT	ΔCT^*
No template control	Control	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	Control	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 tkáň (lidský tračník)	Control	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	–

* $\Delta C_T = M C_T - C C_T$, where M = mutation and C = control; n.d. = not detected.

Table 2. Results of frozen tissue EGFR biomarker mutational analysis

Sample	Reaction	Target C _T	Internal control C _T	ΔC _T *
No template control	Control	0.00	31.71	–
	T790M	0.00	32.36	–
	Deletions	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	Control	28.78	31.05	–
	T790M	30.08	31.13	1.30
	Deletions	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)	Control	25.76	31.23	–
	T790M	n.d.	31.99	–
	Deletions	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, where M = mutace and C = kontrola; n.d. = nedetekováno.

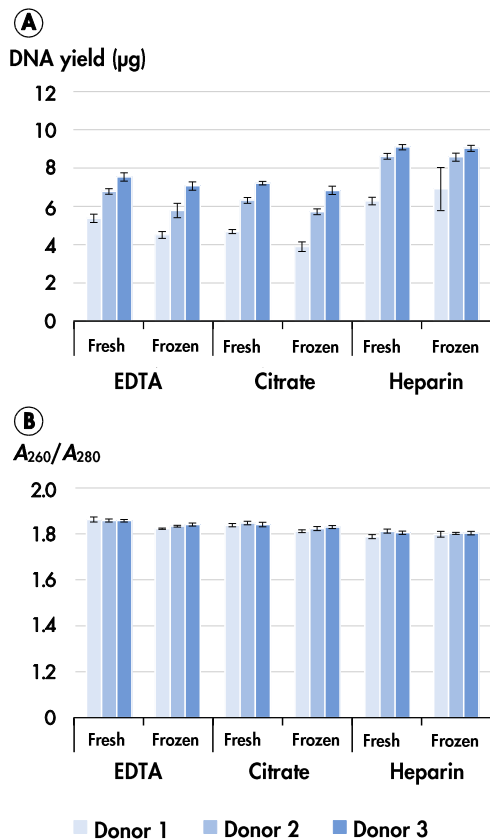
Krev a buffy coat

Charakterizace výtěžnosti izolace DNA z krve a buffy coat byla provedena pomocí vzorků krve dárců s počtem bílých krvinek v rozmezí od 4.0 do 11.0 x 10⁶ buněk/ml a buffy coat dárců s počtem buněk v rozmezí od 2.5 do 5.5 x 10⁷ buněk/ml.

Výtěžnost a čistota DNA

Základní provedení s použitím QIASymphony DSP DNA Mini Kitu bylo vyhodnoceno pomocí různých sběrných zkumavek a antikoagulantů, stejně tak i čerstvých a zmražených vzorků lidské krve. Plná krev byla odebrána od tří zdravých dárců do tří různých typů zkumavek: EDTA = BD™ 10 ml Vacutainer® 16 x 100 mm, K2-EDTA; Citrate = BD 2.7 ml 9NC Tube 13 x 75 mm, Citrate; Heparin = Sarstedt® 7.5 ml S-Monovette® 15 x 92 mm, Li-Heparin. Krev byla použita buď čerstvá (skladovaná při 5°C) nebo zmražená (skladovaná při -20°C). Genomická DNA byla purifikována z 200 μl vzorků se 4 replikáty na dárce a typ zkumavky pomocí sady QIASymphony

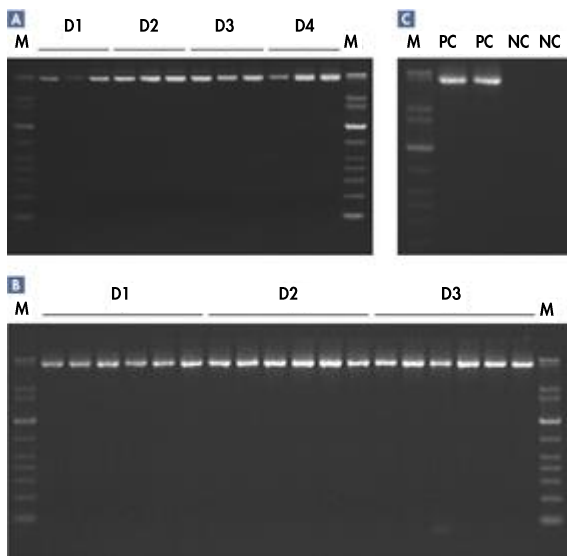
DSP DNA Mini a protokolu DNA Blood 200 DSP s elučním objemem 200 μ l. Výtěžky a čistota DNA byly stanoveny na základě spektroskopické analýzy (obrázek 3).



obr.3 - Odolnost systému používající různé sběrné zkumavky a antikoaguanty s čerstvou a zmrazenou lidskou krví. A Výtěžnost DNA, sloupce ukazují absolutní výtěžnost se standardní odchylkou. B Čistota DNA, sloupce představují čistotu DNA se standardní odchylkou.

DNA integrity

Long-range PCR produkty (5 kb) byly amplifikovány použitím QIAGEN LongRange PCR Kit (50 μ l/reakce). (obrázek 4, strana 7)



Obr.4 - Integrita DNA byla testována pomocí long-range PCR. 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 a protokolu DnA Blood 200 DSP s elučním objemem 200 μ l. D1 = dárce 1, D2 = dárce 2, D3 = dárce 3 a D4 = dárce 4. **B** Plná krev byla odebrána 3 zdravým dárčům do zkumavek BD K2E a byl připraven tzv. buffy coat (trombocyty + leukocyty). Genomická DNA byla purifikována z 200 μ l alikvotů v šesti replikátech pomocí sady QIASymphony DSP DNA Mini a protokolu Buffy Coat 200 DSP s elučním objemem 200 μ l. D1 = dárce 1, D2 = dárce 2 a D3 = dárce 3. **C** kontroly: PC = pozitivní kontrola; NC = negativní kontrola.

Opakovatelnost a reprodukovatelnost

Extrakce DNA byla provedena s využitím protokolu Blood 200 DSP s elučním objemem 200 μ l. Opakovatelnost byla hodnocena ve třech různých dnech na základě tří nezávislých běhů (v každém 96 vzorků), které prováděl jeden laborant, přičemž každý běh sestával ze 4 šarží o 24 vzorcích (tabulka 3 a 4, strana 8).

Reprodukovatelnost byla hodnocena ve třech různých dnech na základě tří nezávislých běhů (v každém 96 vzorků), které prováděli tři různí laboranti na třech různých přístrojích QIASymphony SP, přičemž každý běh sestával ze 4 šarží o 24 vzorcích (tabulka 5 a 6, strana 8 a 9).

Tabulka 3. Výsledky hodnocení opakovatelnosti

Běh	Šarže	N	Průměrný výtěžek 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	5,17	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 4. 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 5. Výsledky hodnocení reprodukovatelnosti

Běh	Šarže	N	Průměrný výtěžek 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.

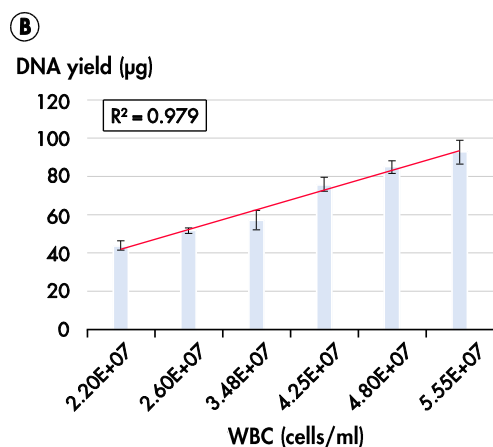
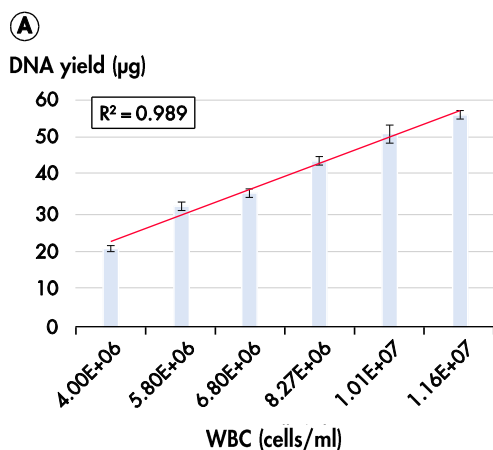
Tabulka 6. Údaje o přesnosti pro hodnocení reprodukovatelnosti

	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.

Lineární řada

Lineární řada pro QIAAsymphony DSP DNA Blood and Buffy Coat aplikace byla vyhodnocena pomocí krve a buffy coat vzorků s 6 různými počty bílých krvinek pro každý vzorek. Pro plnou krev se WBC pohybuje v rozmezí od 4×10^6 buněk/ml do 11.6×10^6 buněk/ml a pro buffy coat v rozmezí od 2.2×10^7 buněk/ml do 5.6×10^7 buněk/ml. Výtěžnost DNA byla určena spektrofotometricky a vztažena k počtu bílých krvinek (obrázek 5).

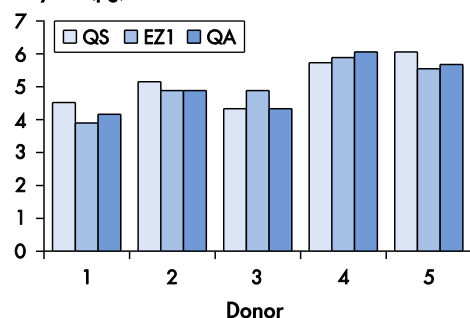


Obr.5 - Lineární řada DNA izolované z krve a buffy coat. A Genomická DNA byla purifikována z 1 ml plné lidské krve pomocí sady QIASymphony DSP DNA Midi a protokolu Blood 1000 DSP s elučním objemem 500 µl. Úsečky znázorňují absolutní výtěžek DNA se směrodatnou odchylkou. B Genomická DNA byla purifikována ze 400 µl vrstvy buffy coat (trombocyty + leukocyty) pomocí sady QIASymphony DSP DNA Midi a protokolu Buffy Coat 400 DSP s elučním objemem 400 µl. Úsečky znázorňují absolutní výtěžek DNA se směrodatnou odchylkou.

Porovnání výtěžnosti

Výtěžnost byla analyzována na QIASymphony DSP DNA Blood systému v porovnání s EZ1[®] DSP DNA Blood systémem a QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit manuální izolace. DNA byla izolována z různých krevních vzorků, analyzována kvůli výtěžnosti DNA (obrázek 6) s použitím CE-označeného kitu *artus*[®] MTHFR LC PCR (24) CE analysis (tabulka 7, strana 12).

DNA yield (µg)



Obr.6 - Porovnání výtěžnosti DNA mezi rozdílnými DNA izolačními systémy. Plná krev byla odebrána od 5 zdravých dárců do BD K2E zkumavek. Pro všechny metody bylo použito 200 µl vzorku a eluční objem 200 µl QS = sada QIASymphony DSP DNA Mini a protokol Blood 200 DSP; EZ1 = EZ1 Advanced XLpoužívající EZ1 DSP DNA Blood Kit; QA = QIAamp DNA Blood Mini Kit. Sloupce představují absolutní výtěžnost DNA pro každý vzorek.

Tab.7 - Polymorfismus nukleotidů (nt) 667 a 1298 v genu MTHFR detekovaný pomocí kitu artus MTHFR LC PCR.

Donor	Method	nt 677	nt 1298	Genotype result
1	QS	Homozygous wt wt677/wt677	Heterozygous variant wt1298/var1298	wt677/wt677 wt1298/var1298 heterozygous variant
	EZ1	Homozygous wt wt677/wt677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
	QA	Homozygous wt wt677/wt677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
2	QS	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	wt677/var677 wt1298/var1298 heterozygous variant
	EZ1	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
	QA	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
3	QS	Homozygous wt wt677/wt677	Heterozygous variant wt1298/var1298	wt677/wt677 wt1298/var1298 heterozygous variant
	EZ1	Homozygous wt wt677/wt677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
	QA	Homozygous wt wt677/wt677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
4	QS	Homozygous variant var677/var677	Homozygous wt wt1298/wt1298	var677/var677 wt1298/wt1298 homozygous variant
	EZ1	Homozygous variant var677/var677	Homozygous wt wt1298/wt1298	
	QA	Homozygous variant var677/var677		
5	QS	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	wt677/var677 wt1298/var1298 heterozygous variant
	EZ1	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
	QA	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
6	QS	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	wt677/var677 wt1298/var1298 heterozygous variant
	EZ1	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
	QA	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	

Donor	Method	nt 677	nt 1298	Genotype result
7	QS	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygous wt wt1298/wt1298 Homozygous wt wt1298/wt1298	wt677/wt677 wt1298/wt1298 homozygous wild-type
	EZ1	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygous wt wt1298/wt1298	
	QA	Homozygous wt wt677/wt677		
8	QS	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygous wt wt1298/wt1298 Homozygous wt wt1298/wt1298	wt677/wt677 wt1298/wt1298 homozygous wild-type
	EZ1	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygous wt wt1298/wt1298	
	QA	Homozygous wt wt677/wt677		
9	QS	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	wt677/var677 wt1298/var1298 heterozygous variant
	EZ1	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
	QA	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
10	QS	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygous wt wt1298/wt1298 Homozygous wt wt1298/wt1298	wt677/wt677 wt1298/wt1298 homozygous wild-type
	EZ1	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygous wt wt1298/wt1298	
	QA	Homozygous wt wt677/wt677		

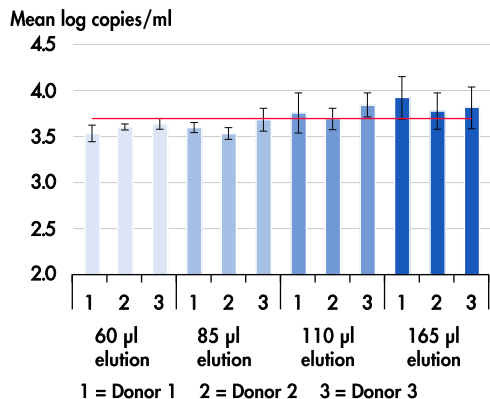
Genetické rozdíly v MTHFR genu byly analyzovány na dvou nukleotidových pozicích (nt 677 a nt 1298) pomocí analýzy křivky tání na LightCycler[®]. Plná krev byla odebrána od 10 zdravých dárců do BD K2E zkumavek. Pro všechny metody bylo použito 200 µl vzorku a eluční objem 200 µl. QS = sada QIASymphony DSP DNA Mini a protokol Blood 200 DSP; EZ1 = EZ1 Advanced XL používající EZ1 DSP DNA Blood Kit; QA = QIAamp DNA Blood Mini Kit. wt = wild-type alela na příslušném místě MTHFR genu; var = obměna alely příslušném místě MTHFR genu.

Izolace virů z krve

Charakteristiky pro izolaci virové DNA z krve byly stanoveny na základě použití vzorků krve s obsahem bílých krvinek v rozmezí 4.0 až 11.0 x 10⁶ buněk/ml.

Izolace virové DNA

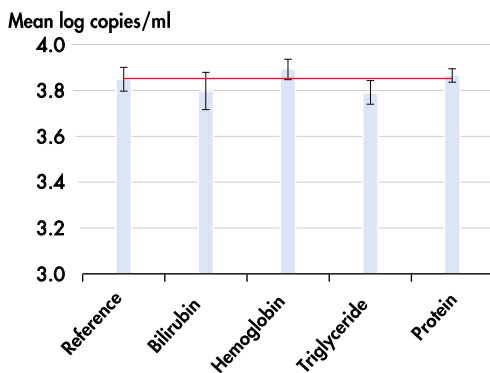
Plná krev byla odebrána od tří zdravých dárců do BD K2E zkumavek a smíchána s CMV standardním materiálem (titr 3.7 log kopií/ml). Virová DNA byla purifikována ze 7 replikátů ve všech případech pomocí sady QIASymphony DSP DNA Mini a protokolu Virus Blood 200 DSP se 4 různými elučními objemy (obrázek 7).



Obr.7 - Porovnání kvantifikace virové DNA z různých elučních objemů. Eluáty z každého dárcovského vzorku a eluční objemy (60 µl, 85 µl, 110 µl, a 165 µl) byly analyzovány s použitím kitu artus CMV RG PCR. Červená řada představuje cílený titr a sloupce znamenají log kopií na mililitr se standardní odchylkou.

Inhibiční látky

Vliv inhibičních látek, které mohou být obsaženy v plné krvi, na účinnost protokolu Virus Blood 200 DSP byl testován přidáním následujících látek: hemoglobin (200 g/l) a bílkovin (120 g/l), stávající hladiny v krevních vzorcích byly stanoveny a další hemoglobin nebo bílkovina byly přidány po dosažení indikované koncentrace 200 g/l nebo 120 g/l. Pro bilirubin (200 mg/l) a triglyceroly (30 g/l), celkové množství každé látky bylo přidáno do vzorku k dosažení indikované koncentrace.



Obr.8 - Test inhibičních látek. Plná krev byla odebrána z jednoho zdravého dárcce do BD K2E zkumavek a smíchána s CMV standardním materiálem (titr 4.0 log kopií/ml). Pět vzorků bylo testováno přidáním potencionálních inhibitorů a virová DNA byla izolována ze čtyř opakování každého vzorku použitím QIASymphony DSP DNA Mini Kit a DSP Virus Blood 200 protocol s elučním objemem 165 µl. Eluáty byly analyzovány pomocí artus CMV RG PCR. Červená řada představuje cílený titr pro referenční vzorek, který není smíchán s žádnou inhibiční látkou a sloupce znamenají log kopií/mi se standardní odchylkou.

Senzitivita

Studium míry efektivity bylo připraveno zředěním kvantifikovaného CMV WHO standardního materialu v CMV-negativní lidské krvi. Detekční hladina 100% byla pozorována u vzorků s koncentrací viru 90 IU CMV/ml.

Tab.8 - Senzitivita QIASymphony DSP Virus Blood application

CMV (IU/ml)	opakování	efektivita	efektivita %
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 krev byla odebrána ze zdravého CMV-negativního dárce do BD K2E zkumavek a smíchána s CMV WHO standardním materiálem za použití různých titrů. Virová DNA byla izolována použitím QIASymphony DSP DNA Mini Kit a DSP Virus Blood 200 protocol s elučním objemem 60 µl. Eluáty byly analyzovány kitem *artus* CMV RG PCR.

Aktuální licenční informace a právní doložky specifické pro produkty naleznete v příslušných příručkách a uživatelských manuálech QIAGENU. Příručky a uživatelské manuály QIAGENU jsou dostupné na www.qiagen.com nebo na vyžádání u QIAGEN Technical Services nebo u Vašeho místního distributora.

Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony®, *artus*®, EZ1®, *therascreen*® (QIAGEN Group); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.); BD™, Vacutainer®, (Becton Dickinson and Company); LightCycler® (Roche Group). Registered names, trademarks, etc. used in this document, even when not specifically marked as such, are not to be considered unprotected by law. 08/2015 HB-0977-D01-004 © 2012–2015 QIAGEN, all rights reserved.

