



Červen 2022

# Návod k použití soupravy QIAamp<sup>®</sup> DSP DNA Blood Mini Kit (charakteristika funkčních vlastností)

Verze 3



Pro diagnostické použití in vitro

Pro použití se soupravou QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit



61104



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Německo

R1

Charakteristika funkčních vlastností je k dispozici elektronicky a lze ji nalézt pod kartou zdrojů na produktové stránce na webové stránce [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Obecný úvod

Souprava QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit využívá technologii silikátové membrány (technologie QIAamp) k izolaci a purifikaci genomové DNA z biologických vzorků.

Postup QIAamp DSP DNA Blood Mini, který je určen pro simultánní zpracování několika krevních alikvotů, umožňuje získat purifikovanou DNA připravenou k použití. Postupy jsou vhodné k použití s čerstvou nebo zmrazenou plnou krví a s krví ošetřenou citrátem nebo EDTA.

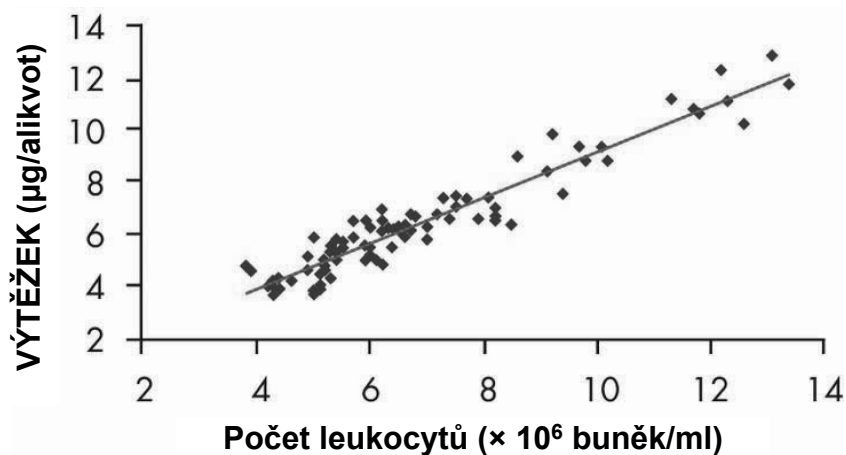
Jednoduché postupy QIAamp DSP s centrifugací i podtlakem jsou vhodné pro simultánní zpracování několika alikvotů. Některé centrifugační postupy QIAamp lze plně automatizovat na přístroji QIAcube® Connect MDx za účelem vyšší standardizace a snazšího použití. Přístroj QIAcube Connect MDx provádí automatizovanou izolaci a purifikaci nukleových kyselin. Přístroj může zpracovat až 12 alikvotů v jednom cyklu.

## Charakteristika funkčních vlastností

**Poznámka:** Charakteristika funkčních vlastností závisí na různých faktorech a souvisí s konkrétní následnou aplikací. Charakteristika funkčních vlastností byla stanovena pro soupravu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit ve spojení s příklady následných aplikací. Metody izolace nukleových kyselin z biologických vzorků se však používají jako předstupeň pro řadu následných aplikací a pro každý takový pracovní postup je třeba v rámci vývoje následné aplikace stanovit parametry funkčních vlastností, jako je křížová kontaminace nebo přesnost cyklu. Proto je povinností uživatele celý pracovní postup validovat a stanovit vhodné parametry funkčních vlastností.

### Základní funkční vlastnosti a kompatibilita s různými následnými aplikacemi

Základní funkční vlastnosti postupu QIAamp DSP DNA Blood Mini s využitím podtlaku byl stanoven pro krev od zdravých dárců s počtem leukocytů  $3,8 \times 10^6 - 1,34 \times 10^7$  buněk/ml (viz obr. 1).



**Obrázek 1. Pozorovaný výtěžek získaný pomocí postupu QIAamp DSP DNA Blood Mini s využitím podtlaku z 200 µl elučního objemu.** Stanovené počty leukocytů u zdravých dárců se pohybovaly v rozmezí  $3,8 \times 10^6 - 1,34 \times 10^7$  buněk/ml. DNA byla purifikována z krevních alikvotů pomocí postupu QIAamp DSP DNA Blood Mini s využitím podtlaku z 200 µl elučního objemu. Bylo zpracováno osmdesát sedm vzorků, každý ve třech opakováních.

Množství DNA purifikované postupy QIAamp DSP DNA Blood Mini závisí na obsahu leukocytů v jednotlivých krevních alikvotech. Pomocí postupu s centrifugací nebo podtlakem se provádí purifikace genomové DNA ze vzorků krve o objemu 200 µl získaných od zdravých dárců. K odběru vzorků krve pro postupy QIAamp DSP DNA Blood Mini (Tabulka 1) je možné použít různé odběrové zkumavky a antikoagulační přípravky.

**Tabulka 1. Průměrné relativní výtěžky DNA z krevních alikvotů odebraných pomocí různých odběrových zkumavek a antikoagulačních přípravků**

Odběrová zkumavka	Výrobce	Kat. č.	Nominální objem	Průměrný výtěžek*
BD™ Vacutainer® 9NC	BD	366007	9 ml	6,4 µg
BD Vacutainer K3E	BD	36847	10 ml	6,6 µg
BD Vacutainer K2E	BD	367864	6 ml	6,4 µg
S-Monovette® EDTA	Sarstedt®	02.1066.001	9 ml	6,5 µg
S-Monovette CPDA1	Sarstedt	01.1610.001	8,5 ml	6,3 µg
Vacurette® K3E	Greiner Bio-One®	455036	9 ml	6,5 µg
Vacurette 9NC	Greiner Bio-One	454382	2 ml	6,3 µg

Genomová DNA byla purifikována z krevních alikvotů o objemu 200 µl získaných od zdravých dárců ( $4,0$  až  $9,0 \times 10^6$  buněk/ml).

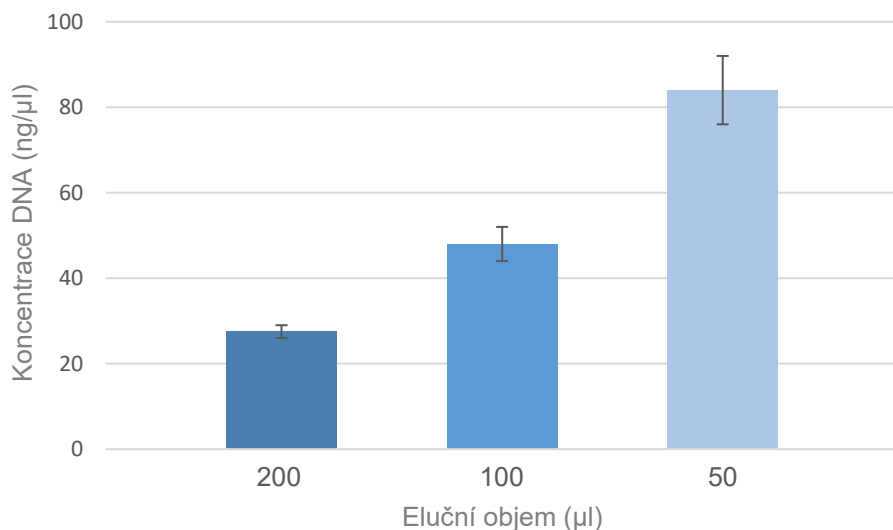
\* Pro každou odběrovou zkumavku byl stanoven průměrný výtěžek z 11 alikvotů měřených ve třech opakováních.

Eluovanou genomovou DNA lze použít v dalších následných analýzách.

## Rozsah vstupu alikvotu / výstupu eluátu a čistota DNA

Pro izolaci genomové DNA z 200 µl plné krve lze zvolit různé eluční objemy. Při manuálním postupu se eluční objemy pohybují od 50 do 200 µl. Pro plně automatizovaný pracovní postup centrifugace jsou možné eluční objemy 100 a 200 µl a pro částečně automatizovaný pracovní postup centrifugace (po manuální lýze) jsou možné eluční objemy 100–200 µl (v krocích po 10 µl). Eluce v nižších objemech zvyšuje konečnou koncentraci DNA v eluátu, ale mírně snižuje celkový výtěžek DNA. Doporučujeme používat eluční objem vhodný pro zamýšlenou aplikaci v dalších krocích.

Byl posouzen vliv různých elučních objemů na celkovou koncentraci DNA. Obrázek 2 ukazuje zvýšení koncentrace DNA v eluátech při snížení elučního objemu.



**Obrázek 2. Koncentrace DNA získaná po izolaci DNA z plné krve pomocí soupravy QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit s různými elučními objemy.** Každý sloupec grafu představuje výsledky ze 32 opakování (průměr ± směrodatná odchylka).

Kromě toho byl jako ukazatel čistoty DNA změřen poměr mezi absorbancí při vlnové délce 260 a 280 nm pro různé testované eluční objemy. Nebyl pozorován žádný rozdíl mezi různými elučními objemy a celkově průměrný poměr naznačoval nízkou kontaminaci proteiny.

## Přesnost

Pro automatizovanou extrakci lidské genomové DNA z plné krve pomocí soupravy QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit na přístroji QIAcube Connect MDx byly stanoveny variační koeficienty (coefficient of variation, CV). Celkový výtěžek DNA byl stanoven měřením OD.

Byla stanovena opakovatelnost (variabilita v rámci cyklu purifikace) a mezilehlá přesnost (variabilita mezi různými cykly purifikace, s různými operátory, na různých přístrojích a v různých dnech). Údaje o přesnosti jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2. Analýza odhadů přesnosti

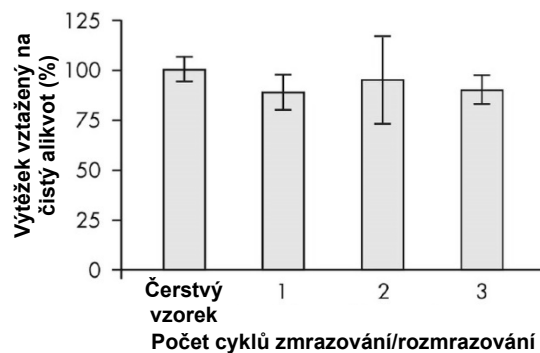
Přesnost	CV (%)
Střední přesnost	1,65
Opakovatelnost	6,09
Celková přesnost	6,24

U manuálního postupu s podtlakem byly stanoveny průměrné výtěžky a hodnoty CV a vyhodnoceny za účelem posouzení mezilehlé přesnosti, opakovatelnosti a reprodukovatelnosti. Dále byla analyzována integrita DNA a funkční vlastnosti ve vlastní analýze real-time PCR.

## Stabilita alikvotu

**Poznámka:** Stabilita alikvotu vysoce závisí na různých faktorech a souvisí s konkrétní následnou aplikací. Byla vyhodnocena na základě příkladů následných aplikací. Uživatel je povinen prostudovat si návod k použití konkrétní následné aplikace používané v jeho laboratoři a/nebo ověřit celý pracovní postup za účelem stanovení vhodných podmínek skladování.

Byl prokázán vliv zmrazování a rozmrazování krevních alikvotů ošetřených EDTA na purifikaci DNA pomocí soupravy QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Nebylo pozorováno žádné významné snížení výtěžku (viz obrázek 3) ani funkčních vlastností v následných analýzách.



**Obrázek 3. Vliv zmrazování a rozmrazování krevních alikvotů.** Krev ošetřená EDTA byla zamrzána a rozmrzána celkem 3krát, poté byla použita k purifikaci DNA pomocí sady QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Vypočítané výtěžky DNA jsou vztaženy na výtěžek z čerstvého vzorku (100 %). Každý sloupec grafu představuje výsledky ze 32 opakování (průměr ± směrodatná odchylka).

## Stabilita eluátů

**Poznámka:** Stabilita eluátů závisí na různých faktorech a souvisí s konkrétní následnou aplikací. Byla vyhodnocena pro soupravu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit ve spojení s příklady následných aplikací. Uživatel je povinen prostudovat si návod k použití konkrétní následné aplikace používané v jeho laboratoři a/nebo ověřit celý pracovní postup za účelem stanovení vhodných podmínek skladování.

Stabilita eluátu u soupravy QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit byla hodnocena po extrakci nukleové kyseliny z lidské krve pomocí spektrofotometrie a vlastní analýzy real-time PCR. Eluovanou DNA lze uchovávat při teplotě 2–8 °C po dobu až 4 týdnů. Při dlouhodobém skladování doporučujeme skladování při teplotě –20 °C.

## Interferující látky

Do krevních alikvotů byly přidány různé potenciální exogenní a endogenní interferující látky přítomné v plné krvi pacientů, aby se otestoval jejich vliv na příklady následných analýz po izolaci gDNA pomocí soupravy QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

Hodnotily se běžné relevantní potenciální interferující látky pro hemolýzu (lidský hemoglobin), lipémii (triglyceridy) a žloutenku (nekonjugovaný bilirubin). Kromě toho byl hodnocen rušivý účinek třikrát vyšší koncentrace antikoagulancií K2-EDTA, K3-EDTA a Na2-EDTA, než jaká byla přítomna v odběrové zkumavce. U těchto potenciálních interferujících látek a přibližně 20 dalších potenciálních interferujících látek, jako jsou léky, které se obvykle používají například při léčbě rakoviny a které se tak pravděpodobně vyskytují v alikvotech od pacientů, nebyl zjištěn žádný významný negativní dopad.

**Poznámka:** Testování bylo provedeno pomocí příkladů následných aplikací pro posouzení kvality extrahovaných nukleových kyselin. Různé následné aplikace však mohou mít různé požadavky na čistotu (tj. nepřítomnost nebo koncentraci potenciálních interferujících látek), takže identifikace a testování příslušných látek a odpovídajících koncentrací musejí být rovněž stanoveny jako součást vývoje následné aplikace pro jakýkoli pracovní postup zahrnující soupravu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

Jakékoli potenciálně interferující látky (např. léky) a odpovídající koncentrace jsou velmi specifické pro následnou aplikaci a případně předchází lékařská ošetření pacienta a je třeba je prozkoumat při ověřování takové následné aplikace pomocí soupravy QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.





**Poznámka:** Podle normy ISO 20186-2:2019(E) může heparin ze zkumavek pro odběr krve ovlivnit čistotu izolovaných nukleových kyselin a případný přenos do eluátů by mohl způsobit inhibici v některých následných aplikacích. Proto doporučujeme pro přípravu plazmy používat krevní alikvoty ošetřené EDTA nebo citrátem jako antikoagulantem.

## Křížová kontaminace

Riziko křížové kontaminace při automatizované purifikaci nukleové kyseliny na přístroji QIAcube Connect MDx bylo analyzováno provedením pěti cyklů s 12 alikvoty se střídavými šachovnicovými šaržemi (střídavě pozitivní a negativní alikvoty) s použitím příkladu pracovního postupu QIAamp (centrifugace QIAamp DSP Virus Spin spolu s vzorky plazmy a séra s koncentrací 1,00E+07 kopií/ml DNA viru). Potenciální kontaminace negativních alikvotů během extrakce byla vyhodnocena následnou analýzou eluátů pomocí vlastní analýzy real-time PCR. Nebyla zjištěna žádná křížová kontaminace mezi jednotlivými alikvoty ani přenos z jednoho cyklu do druhého.

## Symboly

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

Symbol	Definice symbolu
	Tento výrobek splňuje požadavky evropského nařízení 2017/746 pro diagnostické zdravotnické prostředky in vitro.
	Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro
	Katalogové číslo
Rn	R označuje revizi návodu k použití a n je číslo revize
	Výrobce

## Historie revizí

Revize	Popis
R1, červen 2022	<p>Verze 3, revize 1</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Aktualizace na verzi 3 kvůli souladu s nařízením IVDR</li><li>• Přenesení a aktualizace charakteristik funkčních vlastností z příručky pro soupravu do tohoto dokumentu:<ul style="list-style-type: none"><li>○ Přenos oddílu Výtěžek purifikované DNA a oddílu Funkční vlastnosti v následné analýze do oddílu Základní funkční vlastnosti a kompatibilita s různými následnými aplikacemi</li><li>○ Přidání oddílu Rozsah vstupu alikvotu / výstupu eluátu a čistota DNA</li><li>○ Přidání oddílu Přesnost</li><li>○ Aktualizace oddílu Stabilita eluátů</li><li>○ Přidání oddílu Stabilita alikvotu</li><li>○ Přidání oddílu Interferující látky</li><li>○ Přidání oddílu Křížová kontaminace</li><li>○ Přidání oddílu Symboly</li><li>○ Přidání oddílu Historie revizí</li></ul></li></ul>

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

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAcube®, Pyrosequencing® (QIAGEN Group); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.); Vacuette® (Greiner Bio-One GmbH). Registrované názvy, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, i když nejsou výslovně takto označeny, nelze považovat za nechráněné zákonem.  
HB-3030-D01-001 © 2022 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.



