

---

Augusti 2015

# QIASymphony<sup>®</sup> DSP DNA Kits: Prestandaegenskaper

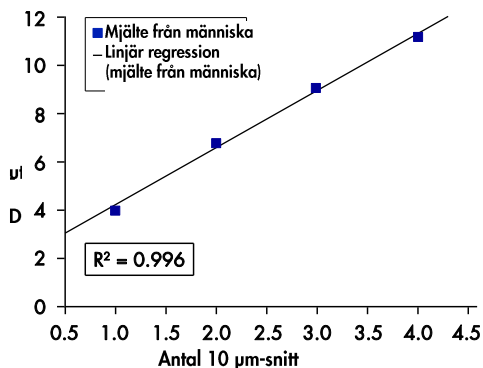
Detta dokument är *QIASymphony DSP DNA Kits: Prestandaegenskaper, R4*, för kit version 1

QIAasymp<sup>®</sup> DSP DNA Kits är avsedda att endast användas i kombination med QIAasymp SP. QIAasymp DSP DNA Mini Kits tillhandahåller reagenser för automatiserad rening av totalt DNA från humant helblod, buffy-coat, vävnad och formalinfixerade, paraffinbäddade (FFPE) vävnadsprover, liksom viralt DNA från humant helblod. QIAasymp DSP DNA Midi Kits tillhandahåller reagenser för automatiserad rening av totalt DNA från humant helblod och buffy-coat.

## Vävnad och FFPE-vävnad

### Linjärt område

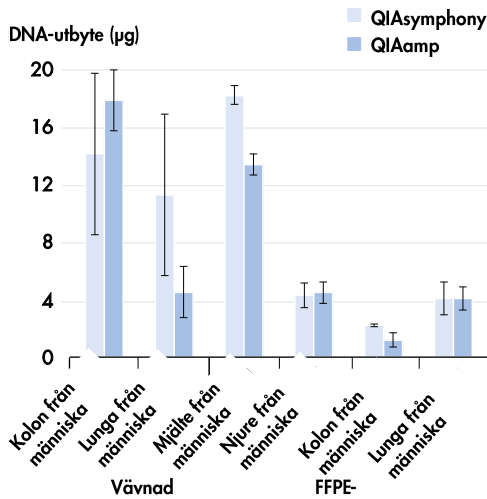
Det linjära området för QIAasymp DSP DNA FFPE-vävnadsapplicering utvärderades genom att man använde sex kopior av 1–4, 10 µm FFPE-snitt av färskt skuren mjälte från människa. DNA-extraktion utfördes med QIAasymp DSP DNA Mini Kit i kombination med DSP-protokollet för lågt vävnadsinnehåll. Avparaffinering och lysning utfördes med xylene-/etanolförbehandlingsmetoden. DNA eluerades i 50 µl elueringsbuffert och DNA-utbytet fastställdes med spektroskopisk analys (bild 1).



**Bild 1. Linjärt område för DNA som extraherats från FFPE-vävnadsnitt.** Sex replikat av 1–4, 10 µm FFPE-vävnadsnitt av mjälte från människa avparaffinerades med xylene-/etanolförbehandling. DNA-extraktion utfördes på QIAasymp SP med QIAasymp DSP DNA Mini Kit i kombination med DSP-protokollet för lågt vävnadsinnehåll och en elueringsvolym på 50 µl.

### Jämförande prestanda

Prestandan för QIAasymp DSP DNA Mini Kit jämfördes med prestandan för det manuella QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit och QIAamp DSP DNA Mini Kit med användning av FFPE-vävnad och färsk respektive frusen vävnad som provmaterial. Manuella och automatiserade provförberedelser samt kvantifiering av DNA-utbytena utfördes samtidigt. DNA-utbyten efter extraktion från färsk/frusna vävnadsprov och FFPE-vävnadsprov där man använde QIAasymp DSP DNA Mini Kit, QIAamp DSP DNA Mini Kit (vävnad) och QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (FFPE-vävnad) visas i bild 2, sida 5.



**Bild 2. DNA-extraktion från vävnadsprover och FFPE-vävnadsprover.** För färsk/frusen vävnad skars prover från human lunga och kolon i bitar på 6 x 25 mg. Tre bitar av varje vävnadstyp användes för provberedning med QIAasympphony SP i kombination med DSP-protokollet för högt vävnadsinnehåll. DNA-extraktionen från resterande prover utfördes med QIAamp DSP DNA Mini Kit. DNA eluerades i 200 µl och DNA-utbytet fastställdes med spektroskopisk analys. För DNA-extraktion från FFPE-vävnad förbereddes 12 replikat innehållande 3 x 10 µm FFPE-vävnadssnitt från olika organ från människa. Sex prover användes för provberedning med QIAasympphony SP i kombination med avparaffineringslösningen för förbehandling och DSP-protokollet för lågt vävnadsinnehåll. DNA-extraktionen från resterande prover utfördes med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. DNA eluerades i 50 µl och DNA-utbytet fastställdes med spektroskopisk analys. Staplarna visar det absoluta DNA-utbytet med standardavvikelse.

## Analys av biomarkörers mutationsstatus med realtids-PCR

Analys av biomarkörers mutationsstatus utfördes med användning av DNA som extraherats från FFPE-snitt av kolon från människa och DNA som extraherats från lungvävnadsprover från människa.

För DNA-extraktion från FFPE-vävnadsprover användes 3 x 10 µm kolonsnitt från människa för provförberedelse. DNA-extraktion utfördes med avparaffineringslösning för förbehandling och DSP-protokollet för lågt vävnadsinnehåll i kombination med 100 µl elueringsvolym. Mutationsanalysen av biomarkör KRAS utfördes med KRAS RGQ PCR Kit enligt kit-handboken. C<sub>T</sub>-värden för kontrollanalysen var inom det definierade området och mutationsdetektionsanalysen visade en aminosyrasubstitution i kodon 12 (tabell 1, sida 4).

För DNA-extraktion från frusna vävnadsprover användes 25 mg human lunga för provberedning med DSP-protokollet för högt vävnadsinnehåll och en elueringsvolym på 200 µl. Kontroll- och mutationsdetektionsanalyser utfördes enligt beskrivningen i handboken för *therascreen*<sup>®</sup> EGFR RGQ PCR Kit. Resultaten visade en deletion inom EGFR-genen som demonstreras av ett ΔC<sub>T</sub>-värde

på 2,47, vilket är under det definierade gränsvärdet på 12 för mutationsupptäckt (tabell 2, sida 5).

Tabell 1. Resultat av mutationsanalysen av KRAS-biomarkören från FFPE-vävnad

Prov	Reaktion	Mål C <sub>T</sub>	Intern kontroll C <sub>T</sub>	ΔC <sub>T</sub> *
Utan mallkontroll	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-vävnad (kolon från människa)	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<sub>T</sub> = M C<sub>T</sub> – C C<sub>T</sub>, där M = mutation och C = kontroll; n.d. = ej upptäckt (not detected).

Tabell 6. Resultat av mutationsanalysen av EGFR-biomarkören från frusen vävnad

Prov	Reaktion	M&I C <sub>T</sub>	Intern kontroll C <sub>T</sub>	ΔC <sub>T</sub> *
Utan mallkontroll	Kontroll	0.00	31.71	–
	T790M	0.00	32.36	–
	Deletioner	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
	Deletioner	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
Vävnad (lunga från människa)	Kontroll	25.76	31.23	–
	T790M	n.d.	31.99	–
	Deletioner	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	–

\* ΔCT = M CT – C CT, där M = mutation och C = kontroll; n.d. = ej upptäckt.

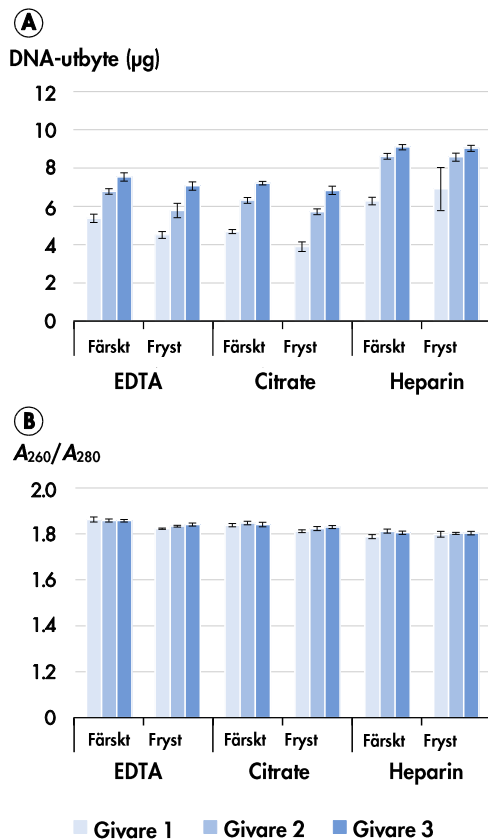
## Blod och buffy-coat

Prestandaegenskaper för blod- och buffy-coat-appliceringar utfördes med användning av prover från blodgivare med ett leukocytantal från 4,0 till 11,0 × 10<sup>6</sup> celler/ml och buffy-coat-givare med ett leukocytantal från 2,5 till 5,5 × 10<sup>7</sup> celler/ml.

## DNA-utbyte och -renhet

Grundläggande prestanda för QIASymphony DSP DNA Mini Kit utvärderades med användning av olika provtagningsrör och antikoagulanter, såväl som färskt och fruset humant helblod. Helblod tappades från 3 friska givare i 3 olika typer av rör: EDTA = BD™ 10 ml Vacutainer® 16 x 100 mm, K2-EDTA; Citrat = BD 2,7 ml 9NC-rör 13 x 75 mm, citrat; Heparin = Sarstedt® 7,5 ml S-Monovette® 15 x 92 mm, li-heparin. Blod användes antingen färskt (förvarat vid 5 °C) eller fryst (förvarat vid -20 °C). Genomiskt DNA renades från 200 µl-prover, med 4 replikat per givare och rörtyper, med användning av QIASymphony DSP DNA Mini Kit och Blood 200 DSP-protokoll med

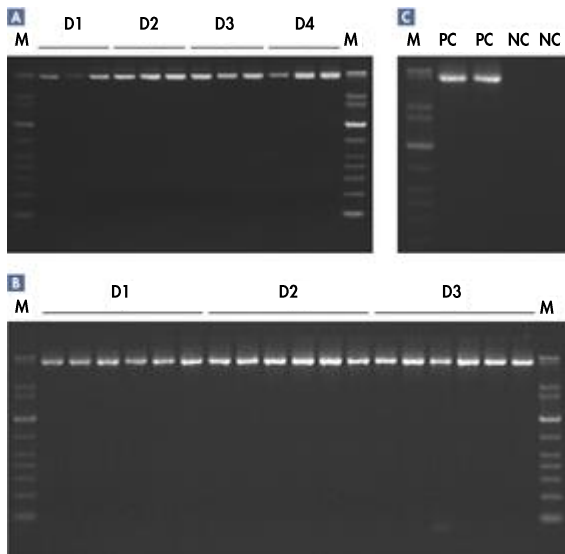
en elueringsvolym på 200 µl. DNA-utbyten och -renhet fastställdes med spektroskopianalys (figur 3).



**Bild 3. Systemets robusthet med användning av olika provtagningsrör och antikoagulanter med färskt och fryst humant helblod. A** DNA-utbyte, staplarna visar det absoluta DNA-utbytet med standardavvikelse. **B** DNA-renhet, staplarna visar DNA-renheten med standardavvikelse.

### DNA-integritet

Long-range PCR-produkter (5 kb) amplifierades med användning av QIAGEN LongRange PCR Kit (50 µl reaktion). (figur 4, sidan 7).



**Bild 4. DNA-integritet testad med long-range PCR.** M = QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder.

**A** Helblod tappades från 4 friska givare (D, donor) i BD K2E-rör. Genomiskt DNA för long-range PCR renades från alikvoter om 200 µl i triplikat med användning av QIASymphony DSP DNA Mini Kit och Blood 200 DSP-protokollet med en elueringsvolym på 200 µl. D1 = Givare 1,

D2 = Givare 2, D3 = Givare 3 och D4 = Givare 4. **B** Helblod tappades från 3 friska givare i BD K2E-rör och buffy coat bereddes. Genomiskt DNA renades från alikvoter om 200 µl i sex replikat med användning av QIASymphony DSP DNA Mini Kit och buffy coat 200 DSP-protokollet med en elueringsvolym på 200 µl. D1 = Givare 1, D2 = Givare 2 och D3 = Givare 3. **C** Kontroller: PC = positiv kontroll och NC = negativ kontroll.

## Repeterbarhet och reproducerbarhet

DNA-extraktion utfördes med Blood 200 DSP-protokollet med en elueringsvolym på 200 µl. Repeterbarhet utvärderades av en enskild operatör som utförde tre oberoende körningar (96 prover var) på tre olika dagar, där varje körning bestod av 4 satser med 24 prover (tabell 3 och 4, sidan 8).

Reproducerbarhet utvärderades genom att tre oberoende körningar (96 prover var) utfördes på tre olika dagar av tre olika operatörer på olika QIASymphony SP-instrument, där varje körning bestod av 4 satser med 24 prover (tabell 5 och 6, sidan 8 och 9).

Tabell 3. Resultat av utvärdering av repeterbarhet

Körning	Sats	N	Medelvärde för DNA-utbyte (µg)	SD	CV (Variationskoefficient)
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
Totalt	–	288	4,96	–	–

\* N = Antal replikat; SD = Standardavvikelse; CV = Variationskoefficient.

Tabell 4. Precisionsdata för utvärdering av repeterbarhet

	SD	CV (Variationskoefficient)
Sats till sats inom samma körning	0,25	4,95
Generell repetitionsprecision	0,26	5,18

\* SD = Standardavvikelse; CV = Variationskoefficient.

Tabell 5. Resultat av utvärdering av reproducerbarhet

Körning	Sats	N	Medelvärde för DNA-utbyte (µg)	SD	CV (Variationskoefficient)
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
Totalt	–	288	5,38	–	–



\* N = Antal replikat; SD = Standardavvikelse; CV = Variationskoefficient.

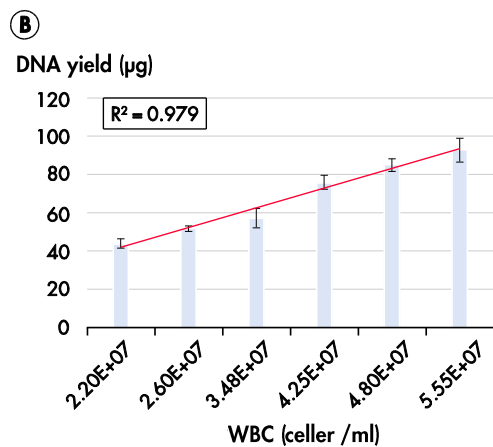
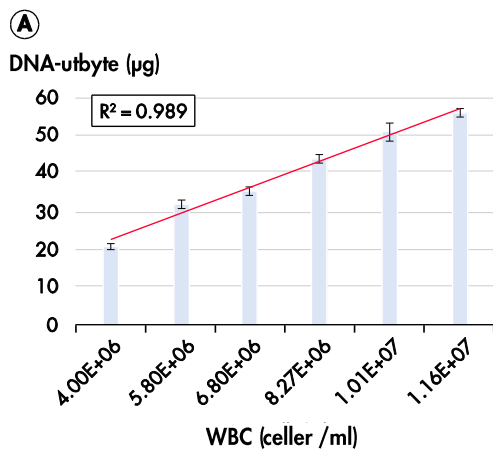
**Tabell 6. Precisionsdata för utvärdering av reproducerbarhet**

	<b>SD</b>	<b>CV (Variationskoefficient)</b>
<b>Sats till sats inom samma körning</b>	0,25	4,73
<b>Generell repetitionsprecision</b>	0,38	7,03

\* SD = Standardavvikelse; CV = Variationskoefficient.

## Linjärt område

De linjära områdena för QIASymphony DSP DNA Blood- och Buffy Coat-apPLICERINGARNA utvärderades med användning av blod- och buffy-coat-prover med sex olika leukocytantal (WBC) för varje provtyp. För helblod varierade WBC-talen från  $4 \times 10^6$  celler/ml till  $11,6 \times 10^6$  celler/ml och för buffy-coat varierade talen från  $2,2 \times 10^7$  celler/ml till  $5,6 \times 10^7$  celler/ml. DNA-utbyten fastställdes med spektroskopisk analys och ritades upp som en kurva mot WBC-talet (bild 5).

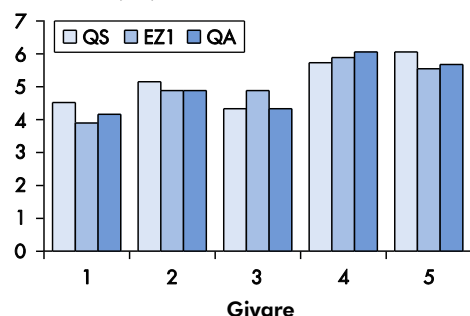


**Bild 5. Linjärt område för DNA extraherat från blod och buffy-coat** A Genomiskt DNA renades från 1 ml humant helblod med användning av QIASymphony DSP DNA Midi Kit och Blood 1000 DSP-protokollet med en elueringsvolym på 500 µl. Staplarna visar det absoluta DNA-utbytet med standardavvikelse. B Genomiskt DNA renades från 400 ml buffy coat med användning av QIASymphony DSP DNA Midi Kit och Buffy Coat 400 DSP-protokollet med en elueringsvolym på 400 µl. Staplarna visar det absoluta DNA-utbytet med standardavvikelse.

### Jämförande prestanda

Prestanda analyserades för QIASymphony DSP DNA Blood-systemet jämfört med EZ1® DSP DNA Blood-systemet och den manuella provförberedelseproceduren för QIAamp® DNA Blood Mini Kit. DNA renades från olika blodprover, analyserades avseende DNA-utbyte (bild 6) och användes i den CE-märkta *artus*® MTHFR LC PCR Kit (24) CE-analysen (tabell 7, sida 12).

### DNA-utbyte (µg)



tappades från 5 friska givare i BD K2E-rör. För samtliga metoder användes provtillförselvolymer på 200 µl och elueringsvolymer på 200 µl.

QS = QIAasymphony DSP DNA Mini Kit och Blood 200 DSP-protokoll; EZ1 = EZ1 Advanced XL med användning av EZ1 DSP DNA Blood Kit; QA = QIAamp DNA Blood Mini Kit. Staplarna visar det absoluta DNA-utbytet för varje prov.

**Tabell 7. Polymorfismer vid nukleotid (nt) 667 och nt 1298 hos MTHFR-genen, som detekterats med användning av artus MTHFR LC PCR Kit**

Givare	Metod	nt 677	nt 1298	Genotypresultat
1	QS	Homozygot vt vt677/vt677	Heterozygot variant vt1298/var1298	vt677/vt677 vt1298/var1298 heterozygot variant
	EZ1	Homozygot vt vt677/vt677	Heterozygot variant vt1298/var1298	
	QA	Homozygot vt vt677/vt677	Heterozygot variant vt1298/var1298	
2	QS	Heterozygot variant vt677/var677	Heterozygot variant vt1298/var1298	vt677/var677 vt1298/var1298 heterozygot variant
	EZ1	Heterozygot variant vt677/var677	Heterozygot variant vt1298/var1298	
	QA	Heterozygot variant vt677/var677	Heterozygot variant vt1298/var1298	
3	QS	Homozygot vt vt677/vt677	Heterozygot variant vt1298/var1298	vt677/vt677 vt1298/var1298 heterozygot variant
	EZ1	Homozygot vt vt677/vt677	Heterozygot variant vt1298/var1298	
	QA	Homozygot vt vt677/vt677	Heterozygot variant vt1298/var1298	
4	QS	Homozygot variant var677/var677	Homozygot vt vt1298/vt1298	var677/var677 vt1298/vt1298 homozygot variant
	EZ1	Homozygot variant var677/var677	Homozygot vt vt1298/vt1298	
	QA	Homozygot variant var677/var677	Homozygot vt vt1298/vt1298	
5	QS	Heterozygot variant vt677/var677	Heterozygot variant vt1298/var1298	vt677/var677 vt1298/var1298 heterozygot variant
	EZ1	Heterozygot variant vt677/var677	Heterozygot variant vt1298/var1298	
	QA	Heterozygot variant vt677/var677	Heterozygot variant vt1298/var1298	

Givare	Metod	nt 677	nt 1298	Genotypresultat
6	QS	Heterozygot variant vt677/var677	Heterozygot variant vt1298/var1298	vt677/var677 vt1298/var1298
	EZ1	Heterozygot variant vt677/var677	Heterozygot variant vt1298/var1298	heterozygot
	QA	Heterozygot variant vt677/var677	Heterozygot variant vt1298/var1298	variant
7	QS	Homozygot vt vt677/vt677	Homozygot vt vt1298/vt1298	vt677/vt677 vt1298/vt1298 homozygot
	EZ1	Homozygot vt vt677/vt677	Homozygot vt vt1298/vt1298	vildtyp
	QA	Homozygot vt vt677/vt677	Homozygot vt vt1298/vt1298	
8	QS	Homozygot vt vt677/vt677	Homozygot vt vt1298/vt1298	vt677/vt677 vt1298/vt1298 homozygot
	EZ1	Homozygot vt vt677/vt677	Homozygot vt vt1298/vt1298	vildtyp
	QA	Homozygot vt vt677/vt677		
9	QS	Heterozygot variant vt677/var677	Heterozygot variant vt1298/var1298	vt677/var677 vt1298/var1298
	EZ1	Heterozygot variant vt677/var677	Heterozygot variant vt1298/var1298	heterozygot
	QA	Heterozygot variant vt677/var677	Heterozygot variant vt1298/var1298	variant
10	QS	Homozygot vt vt677/vt677	Homozygot vt vt1298/vt1298	vt677/vt677 vt1298/vt1298 homozygot
	EZ1	Homozygot vt vt677/vt677	Homozygot vt vt1298/vt1298	vildtyp
	QA	Homozygot vt vt677/vt677	Homozygot vt vt1298/vt1298	

Den genetiska variansen av genen för metylenetetrahydrofolatreduktas (MTHFR) analyserades vid två nukleotidpositioner (nt 677 och nt 1298) via en smältkurvsanalys på ett LightCycler®-instrument. Helblod tappades från 10 friska givare i BD K2E-rör. För samtliga metoder användes provtillförselvolymerna på 200 µl och elueringsvolymerna på 200 µl.

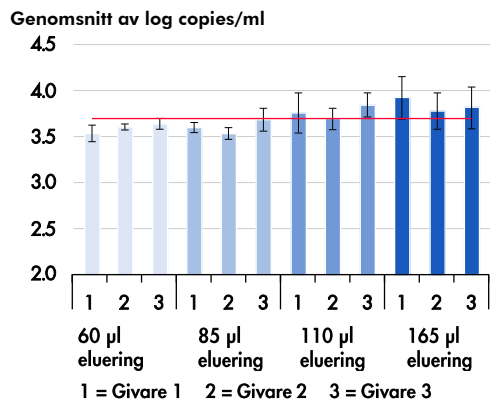
QS = QIASymphony DSP DNA Mini Kit och Blood 200 DSP-protokoll; EZ1 = EZ1 Advanced XL med användning av EZ1 DSP DNA Blood Kit; QA = QIAamp DNA Blood Mini Kit. vt = vildtypsallel vid respektive position för MTHFR-gen; var = variantallel vid respektive position för MTHFR-gen.

## Virusblod

Prestandaegenskaper för virusblodappliceringar utfördes med användning av prover från blodgivare med ett leukocyttal från 4,0 till 11,0 x 10<sup>6</sup> celler/ml.

### Återvinning av viralt DNA

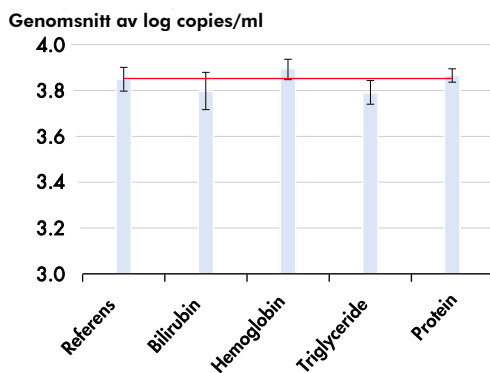
Helblod tappades från 3 friska givare i BD K2E-rör och fick en tillsats av CMV-standardmaterial (titer 3,7 log copies/ml). Viralt DNA renades från 7 replikat, vart och ett med användning av QIASymphony DSP DNA Mini Kit och Virus Blood 200 DSP-protokollet med 4 olika elueringsvolymerna (figur 7).



**Bild 7. Jämförelse av kvantifiering av viralt DNA för olika elueringstvolymer.** Eluat från varje givarprov och elueringstvolymer (60 µl, 85 µl, 110 µl och 165 µl) analyserades med *artus* CMV RG PCR Kit. Den röda linjen representerar måltitern och staplarna visar genomsnitt av log copies per milliliter med standardavvikelse.

## Hämmande substanser

Påverkan av hämmande substanser, vilka kan finnas i helblod, på prestandan för Virus Blood 200 DSP-protokollet testades genom tillsats av följande substanser: För hemoglobin (200 g/l) och protein (120 g/l) fastställdes befintliga nivåer i blodprovet och ytterligare hemoglobin eller protein tillsattes för att uppnå de indikerade koncentrationerna, 200 g/l respektive 120 g/l. För bilirubin (200 mg/l) och triglycerider (30 g/l) tillsattes den totala mängden av varje substans till proven för att uppnå de indikerade koncentrationerna.



**Bild 8. Test av hämmande substanser.** Helblod tappades från 1 frisk givare i BD K2E-rör och fick en tillsats av CMV-standardmaterial (titer 4,0 log copies/ml). Fem prover testades genom tillsats av möjliga hämmare och viralt DNA renades från fyra replikat av varje prov med användning av protokollet för QIA Symphony DSP DNA Mini Kit och DSP Virus Blood 200 med en elueringstvolymer på 165 µl. Eluatet analyserades med *artus* CMV RG PCR Kit. Den röda linjen representerar den fastställda titern för referensprover, vilka inte hade fått någon tillsats av hämmande ämnen och staplarna visar genomsnitt för log copies per milliliter med standardavvikelse.

## Känslighet

Studier av träffkvot (hit-rate) utfördes genom spädning av i förväg kvantifierat CMV WHO-standardmaterial i CMV-negativt humant helblod. En detekteringskvot på 100 % sågs för prover med virusbelastningar på 90 IE av CMV per milliliter.

Tabell 8. Känslighet för QIAasymphony DSP Virus Blood-applicering

CMV (IE/ml)	Replikat	Träffar	Träff-%
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

Humant helblod tappades från 1 frisk CMV-negativ givare i BD K2E-rör och fick en tillsats av CMV WHO-standardmaterial med användning av olika titrar. Viralt DNA renades med användning av protokollet för QIAasymphony DSP DNA Mini Kit och DSP Virus Blood 200 med en elueringsvolym på 60 µl. Eluatet analyserades med *artus* CMV RG PCR Kit.

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler: se respektive QIAGEN-satshandbok eller användarhandbok. QIAGEN-satshandböcker och användarhandböcker finns att tillgå på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) eller kan beställas från QIAGEN teknisk support eller från lokal återförsäljare.

Varumärken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAasymphony®, *artus*®, EZ1®, *therascreen*® (QIAGEN Group); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); LightCycler® (Roche Group). Registrerade namn, varumärken osv. som används i detta dokument, även när de inte uttryckligen har markerats som sådana, får inte betraktas som oskyddade i lag. 08/2015 HB-0977-D01-004

© 2012–2015 QIAGEN, all rights reserved.

