



2022. június

QIAamp[®] DSP DNA Blood Mini Kit Használati útmutató (Teljesítményjellemzők)

3. verzió



In vitro diagnosztikai használatra
A QIAamp DSP DNA Blood Mini Kittel való használatra



61104



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Németország

R1

A Teljesítményjellemzők elektronikus formában állnak rendelkezésre; a www.qiagen.com webhelyen, az adott termék oldalának termékdokumentációs lapfülén érhetők el.

Általános bevezetés

A QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit szilikagélmembrán-technológiát (QIAamp technológia) alkalmaz a genomiális DNS biológiai mintákból történő izolálásához és tisztításához.

A több vérminta párhuzamosan történő feldolgozására szolgáló QIAamp DSP DNA Blood Mini eljárások eredményeképp használtra kész, tisztított DNS keletkezik. Az eljárások friss vagy fagyasztott teljes véren, továbbá citráttal vagy EDTA-val kezelt véren is elvégezhetők.

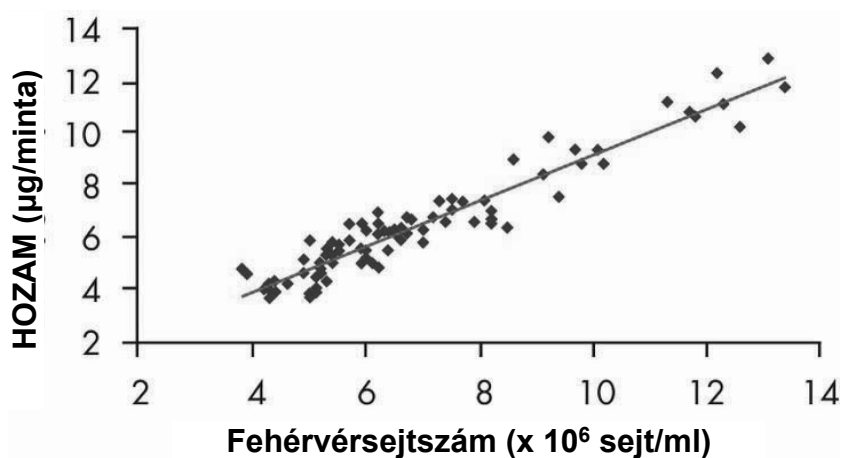
Az egyszerű QIAamp DSP spin oszlopos vagy vákuumos eljárások alkalmasak több minta párhuzamos feldolgozására. A standardizálás javítása és a használat megkönnyítése érdekében a QIAcube® Connect MDx készülékeken egyes QIAamp spin oszlopos eljárások teljes mértékben automatizálhatók. A QIAcube Connect MDx készülék a nukleinsavak automatizált izolálására és tisztítására szolgál. Futtatásonként legfeljebb 12 minta feldolgozására képes.

Teljesítményjellemzők

Megjegyzés: A teljesítményjellemzők több tényezőtől is nagymértékben függenek, és az adott downstream alkalmazáshoz kapcsolódnak. A QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit teljesítményjellemzőit szabályszerűen elvégzett downstream alkalmazásokkal együtt végezve határozták meg. Azonban többféle downstream alkalmazáshoz biológiai mintákból történő nukleinsav izolálási módszereket kell használni előzetes lépésként, és a downstream alkalmazás kialakítása során meg kell állapítani az ilyen munkafolyamatok teljesítményparamétereit, például a keresztszennyeződést vagy a futtatási precizitást. Ezért a felhasználó felelőssége, hogy a megfelelő teljesítményparaméterek meghatározásához a teljes munkafolyamatot validálja.

Alapteljesítmény és különböző downstream alkalmazásokkal való kompatibilitás

A QIAamp DSP DNA Blood Mini vákuumos eljárás alapvető teljesítményét milliliterenként $3,8 \times 10^6 - 1,34 \times 10^7$ fehérvérsejtszámmal rendelkező egészséges donoroktól nyert vérmintákon határozták meg (lásd 1. ábra).



1. ábra: Mért hozam 200 µl elúciós térfogattal végzett QIAamp DSP DNA Blood Mini vákuumos eljárással. Meghatározták az egészséges donorok fehérvérsejtszámát, ami a $3,8 \times 10^6 - 1,34 \times 10^7$ sejt/ml tartományba esett. A DNS tisztítása vérmintákból, 200 µl elúciós térfogattal végzett QIAamp DSP DNA Blood Mini vákuumos eljárással történt. Nyolcvanhét (87), három példányban meglévő minta került feldolgozásra.

A QIAamp DSP DNA Blood Mini eljárás során keletkező tisztított DNS mennyisége függ az egyes vérminták fehérvérsejt-tartalmától. A spin oszlopos vagy a vákuumos eljárás segítségével egészséges donoroktól származó 200 µl vérmintából történt genomiális DNS tisztítása. Számos, különböző típusú elsődleges cső és antikoaguláns segítségével elvégezhető a QIAamp DSP DNA Blood Mini eljárásokhoz szükséges vérminták gyűjtése (1. táblázat).

1. táblázat: Különböző elsődleges csövek és antikoagulánsok felhasználásával gyűjtött vérminták átlagos relatív DNS-hozama

Elsődleges cső	Gyártó	Katalógusszám	Névleges térfogat	Átlagos hozam*
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

Egészséges donoroktól származó 200 µl vérmintából történt a genomiális DNS tisztítása (4,0–9,0 x 10⁶ sejt/ml).

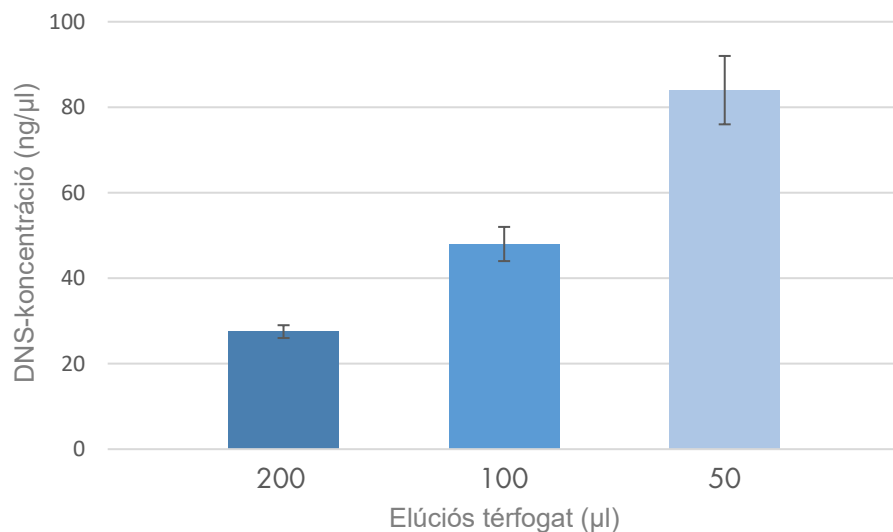
* Minden elsődleges csőtípus esetén az átlagos hozam meghatározása 11 különböző, három példányban meglévő minta alapján történt.

Az eluált genomiális DNS készen áll a különféle downstream assay-kben való felhasználásra.

Bevitt mintamennyiség / eluátumhozam tartományai és a DNS tisztasága

Különféle elúciós térfogatok választhatók a 200 µl teljes vérből végzett genomiális DNS izoláláshoz. A manuális eljárás esetében az elúciós térfogat 50–200 µl lehet. A teljesen automatizált spin munkafolyamatok esetében 100 µl vagy 200 µl a lehetséges elúciós térfogat, a (manuális lízist alkalmazó) részben automatizált spin munkafolyamat esetében pedig 100–200 µl között (10 µl-es lépésekben módosítható). A kisebb térfogatokkal végzett eluálás növeli a végső DNS-koncentrációt, de kissé csökkenti a teljes DNS-hozamot. A tervezett későbbi („downstream”) alkalmazáshoz megfelelő elúciós térfogat használatát javasoljuk.

Meghatározták, hogy milyen hatást gyakorolnak a különféle elúciós térfogatok a teljes DNS-koncentrációra. A 2. ábra mutatja, hogy az elúciós térfogat csökkenésével növekszik az eluátumok DNS-koncentrációja.



2. ábra: DNS-koncentráció a teljes vérből QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit készlet segítségével, különböző elúciós térfogatokkal nyert DNS-izolátumokban. A grafikonon feltüntetett minden oszlop 32 párhuzamos minta eredményét mutatja (átlag ± szórás).

Ezenkívül a DNS tisztaságának indikátoraként meghatározták a 260 és 280 nm hullámhosszon mért abszorbanciák arányát a különféle tesztelt elúciós térfogatokhoz. Nem találtak különbséget a különféle elúciós térfogatok között, az átlagos arány pedig alacsony fehérjekomtaminációt jelzett.

Precizitás

Meghatározták a teljes vérből QIAcube Connect MDx készüléken, QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit készlettel végzett automatizált humán genomialis DNS extrakció variációs koefficienseit (Coefficients of Variations, CV). A teljes DNS-hozamot az OD mérésével határozták meg.

Meghatározták a megismételhetőséget (futtatáson belüli variabilitás egyetlen tisztítási futtatás során) és a laboratóriumon belüli precizitást (futtatások közötti variabilitás különböző kezelők által különböző készülékeken és különböző napokon végzett különböző tisztítási futtatások során). A precizitási adatok a 2. táblázatban láthatók.

2. táblázat: A precizitásbecslések elemzése

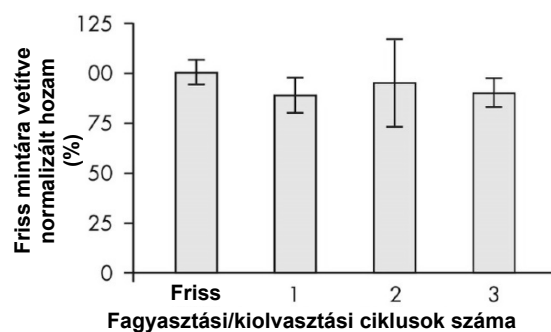
Precizitás	CV (%)
Laboratóriumon belüli precizitás	1,65
Megismételhetőség	6,09
Teljes precizitás	6,24

A manuális vákuumos eljárás esetében meghatározták az átlagos hozamok és a CV-k értékét, majd elvégezték a köztes precizitás, megismételhetőség és reprodukálhatóság értékelését. Emellett egy házon belüli real-time PCR assay DNS-integritását és teljesítményét is elemezték.

A minták stabilitása

Megjegyzés: A minták stabilitása nagymértékben függ különféle tényezőktől, és összefügg az adott downstream alkalmazással. Ezt szabályszerűen elvégzett downstream alkalmazásokkal értékelték. A felhasználó felelőssége, hogy elolvassa a laboratóriumban használt adott downstream alkalmazás használati útmutatóját, és/vagy validálja a teljes munkafolyamatot a megfelelő tárolási feltételek megállapításához.

Meghatározták, hogy milyen hatást gyakorol az EDTA-val kezelt vérminták fagyasztási-kiolvasztási ciklusa a QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit felhasználásával végzett DNS-tisztításra. Nem figyeltek meg jelentős csökkenést a downstream assay-k hozamában (lásd 3. ábra) vagy teljesítményében.



3. ábra: A vérminták fagyasztásának és kiolvasztásának hatásai. Az EDTA-val kezelt vérminták legfeljebb 3 alkalommal fagyasztási/kiolvasztási cikluson, majd a QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit felhasználásával DNS-tisztításon estek át. A számított DNS-hozamot friss mintára vetítve normalizálták (100%). A grafikonon feltüntetett minden oszlop 32 párhuzamos minta eredményét mutatja (átlag ± szórás).

Az eluátum stabilitása

Megjegyzés: Az eluátum stabilitása több tényezőtől is nagymértékben függ, és az adott downstream alkalmazáshoz kapcsolódik. A QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit készlettel nyert eluátum stabilitását szabályszerűen elvégzett downstream alkalmazásokkal együtt végezve értékelték. A felhasználó felelőssége, hogy elolvassa a laboratóriumban használt adott downstream alkalmazás használati útmutatóját, és/vagy validálja a teljes munkafolyamatot a megfelelő tárolási feltételek megállapításához.

A humán vérből QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit készlettel extrahált nukleinsav eluátum stabilitását spektrofotometriával és egy házon belüli real-time PCR assay segítségével végezték. Az eluát DNS 2–8 °C közötti hőmérsékleten legfeljebb 4 hétig tárolható. Hosszú távú tároláshoz –20 °C-on való tárolást javasolunk.

Zavaró anyagok

A betegek teljes vérében potenciálisan jelen lévő különféle exogén és endogén zavaró anyagokat adtak hozzá vérmintákhoz, és QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit készlettel végzett gDNS izolálást követően szabályszerűen végzett downstream assay-kben tesztelték az említett anyagok hatását.

A hemolízist (humán hemoglobin), lipémiát (trigliceridek) és sárgaságot (nem konjugált bilirubin) jelző, gyakorta előforduló, lehetséges zavaró anyagokat értékelték. Emellett értékelték a vérvételi csövekben már jelen lévő K2-EDTA, K3-EDTA és Na2-EDTA antikoagulánsok háromszor magasabb koncentrációjának zavaró hatását is értékelték. Nem mutattak ki jelentős negatív hatást sem a fenti zavaró anyagok, sem további 20, potenciális zavaró anyag, mint a gyakorta használt gyógyszerek esetében (például daganatellenes gyógyszerek, amelyek jelen lehetnek a betegek mintáiban).

Megjegyzés: Downstream mintaalkalmazásokkal vizsgálatot végeztünk az extrahált nukleinsavak minőségének kiértékelése céljából. A különböző downstream alkalmazásoknak azonban eltérőek lehetnek a tisztaságra (vagyis a potenciálisan zavaró anyagok távollétére vagy koncentrációjára) vonatkozó követelményei, ezért a QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit készletet alkalmazó bármely munkafolyamat downstream alkalmazásának kialakítása során azonosítani és tesztelni kell a releváns anyagokat és megfelelő koncentrációjukat.

Bármely potenciálisan zavaró anyag (pl. gyógyszerek) és a koncentrációja nagymértékben specifikus a downstream alkalmazás és a betegnél korábban alkalmazott orvosi kezelések szempontjából, és ezért be kell vonni a vizsgálatba a QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit készletet alkalmazó downstream alkalmazások ellenőrzése során.





Megjegyzés: Az ISO 20186-2:2019(E) értelmében a vérvételi csövekből származó heparin befolyásolhatja az izolált nukleinsavak tisztaságát, és az eluátumba való esetleges átkerülése néhány downstream alkalmazás esetében gátlást eredményezhet. Ezért a plazma előkészítéséhez antikoagulánsként EDTA-val kezelt vérminták használatát javasoljuk.

Keresztszennyeződés

A QIAcube Connect MDx készüléken végzett automatizált nukleinsav-tisztítás keresztszennyeződési kockázatát öt, egyenként 12 mintából álló futtatással elemezték sakktábla-mintázatú (felváltva elhelyezkedő pozitív és negatív mintákkal) tételekkel és szabályszerűen alkalmazott QIAamp munkafolyamattal (QIAamp DSP Virus Spin, 1,00E+07 kópia/ml DNS vírust tartalmazó plazma- és szérummintákkal). A negatív mintáknak az extrakciós futtatások során bekövetkező potenciális szennyeződését az eluátumok házon belüli real-time PCR-assay útján történő további elemzésével értékelték. Nem mutattak ki keresztszennyeződést sem a minták, sem a futtatások közötti átszennyezés esetében.

Szimbólumok

A dokumentumban az alábbi szimbólumok fordulnak elő. A használati útmutatóban, csomagoláson és címkéken szereplő szimbólumok teljes listája a kézikönyvben található.

Szimbólum	Szimbólum definíciója
	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

3. verzió, 1. átdolgozás

- Frissítés a 3. verzióra az IVDR-nek való megfelelés érdekében
- Teljesítményjellemzők áthelyezése (és frissítése) a kit kézikönyvből a jelen dokumentumba:
 - A tisztított DNS hozama fejezet és az A további assay-ken mért teljesítmény fejezet áthelyezése az Alapvető teljesítmény és kompatibilitás különféle downstream alkalmazásokkal fejezetbe
 - Bevitt mintamennyiség / eluátumhozam tartományai és a DNS tisztaságára vonatkozó szakasz hozzáadva
 - Precizitás fejezet hozzáadása
 - Az eluátum stabilitása fejezet frissítése
 - A minták stabilitása fejezet hozzáadása
 - Zavaró anyagok fejezet hozzáadása
 - Keresztszennyeződés fejezet hozzáadása
 - Szimbólumok fejezet hozzáadása
 - Átdolgozási előzmények fejezet 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®, QIAamp®, QIAcube®, Pyrosequencing® (QIAGEN Group); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.); Vacuette® (Greiner Bio-One GmbH);
A dokumentumban használt bejegyzett nevek, védjegyek stb. akkor sem tekinthetők a törvény védelméen kívül esőnek, ha nincsenek külön jelöléssel ellátva.
HB-3030-D01-001 © 2022 QIAGEN, minden jog fenntartva.

