

Únor 2017

# Sada QIAasymphony<sup>®</sup> DSP Circulating DNA

Charakteristiky chování

IVD

CE

MAT

937556

---

# Obsah

Charakteristiky chování .....	4
Základní chování .....	4
Přesnost chodu .....	6
Ekvivalentní chování 2 ml a 4 ml protokolů .....	6
Distribuce velikosti .....	7
Stabilita eluátů .....	9

---

Systém QIASymphony DSP Circulating DNA představuje in vitro systém připravený k použití pro kvalitativní purifikaci lidské cirkulující bezbuněčné DNA (ccfDNA) z lidské plazmy a moči.

Sada QIASymphony DSP Circulating DNA je určena pouze pro použití v kombinaci s přístrojem QIASymphony SP.

Sada QIASymphony DSP Circulating DNA zajišťuje reagentie pro plně automatizovanou simultánní purifikaci lidské ccfDNA z širokého spektra typů lidské plazmy (antikoagulanty EDTA nebo citrát, stejně tak plazma ze zkumavek na odběr stabilizované krve s ccfDNA) a lidské moči (stabilizované a nestabilizované). Charakteristika chování pro každou zkumavku na odběr krve nebyla stanovena a uživatel ji musí validovat sám.

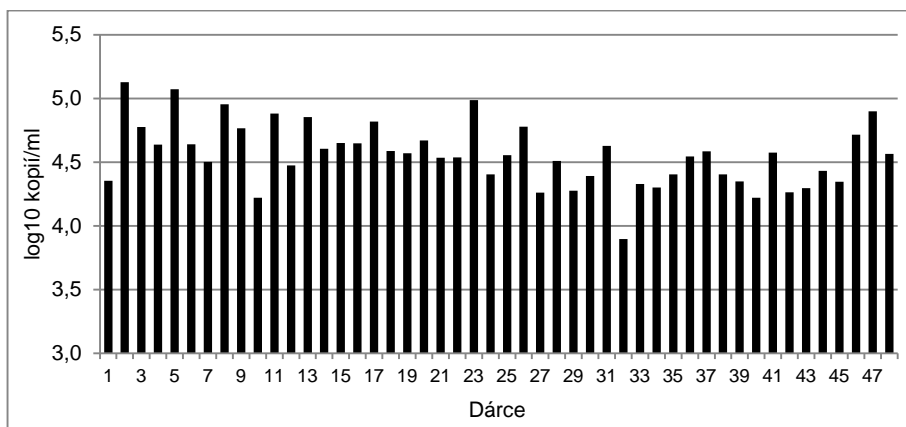
Purifikovaná ccfDNA je kompatibilní s celou řadou navazujících aplikací. QIASymphony SP provádí všechny kroky postupu purifikace. V jednom chodu se zpracovává až 96 vzorků v šaržích po 24. Vzorky moči mohou vyžadovat ruční předzpracování vzorku.

# Charakteristiky chování

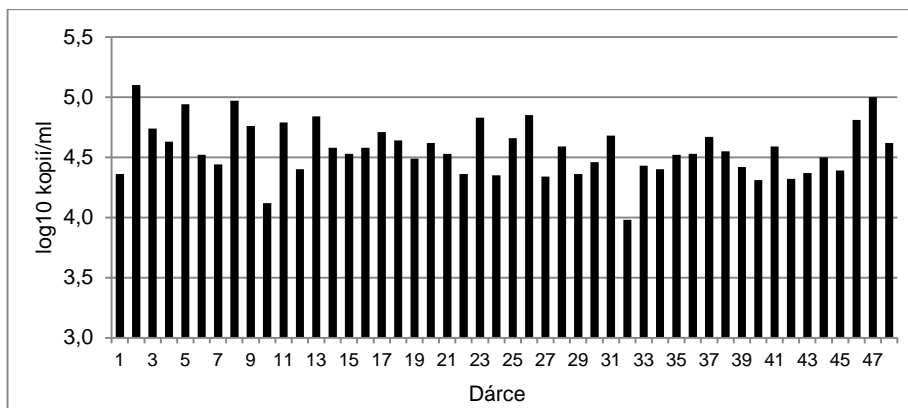
## Základní chování

Základní chování sady QIASymphony DSP Circulating DNA bylo hodnoceno pomocí 48 zdravých dárců ccfDNA extrahované ze 4 ml stabilizované plazmy a také ze 4 ml EDTA plazmy a 4 ml stabilizované moči. Výtěžek ccfDNA byl stanoven domácím real-time PCR testem pro kódující sekvenci 18S ribozomální RNA.

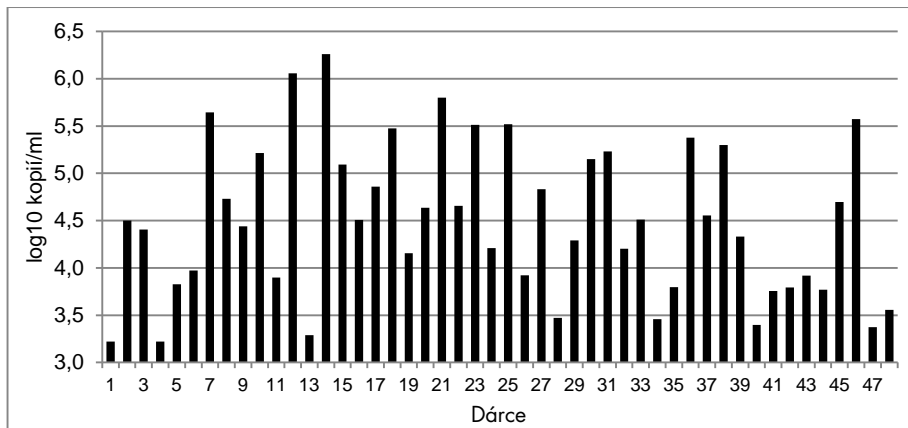
Rozdíly ve výtěžcích (log<sub>10</sub> kopií/ml) na obrázku 1 (4 ml stabilizované plazmy), na obrázku 2 (4 ml EDTA plazmy) a na obrázku 3 (4 ml stabilizované moči) odrážejí silné, na dárci závislé koncentrace ccfDNA, které se obvykle nacházejí ve stejném objemu příslušného materiálu vzorku. Výtěžek ccfDNA mezi stabilizovanou a EDTA plazmou ukazuje vysokou korelaci u použité plazmy od 48 zdravých dárců ze dvou odlišných typů BCT (obrázek 1 a obrázek 2).



**Obrázek 1. Výtěžek ccfDNA z plazmy od 48 zdravých dárců: zkumavky na odběr stabilizované krve s ccfDNA.** Darování krve od 48 zdravých dárců: zkumavky na odběr stabilizované krve s ccfDNA. ccfDNA byla extrahována ze 4 ml plazmy pomocí sady QIASymphony DSP Circulating DNA a výtěžek ccfDNA byl kvantifikován použitím domácího real-time PCR testu pro kódující sekvenci 18S rRNA. Výsledky byly vypočítány jako cílové kopie na ml vložené plazmy.



**Obrázek 2. Výtěžek cfDNA z plazmy od 48 zdravých dárců: EDTA zkumavky na odběr krve.** Darování krve od 48 zdravých dárců bylo provedeno v EDTA zkumavkách na odběr krve. cfDNA byla extrahována ze 4 ml plazmy pomocí sady QIASymphony DSP Circulating DNA a výtěžek cfDNA byl kvantifikován použitím domácího real-time PCR testu pro kódující sekvenci 18S. Výsledky byly vypočítány jako cílové kopie na ml vložené plazmy.



**Obrázek 3. Výtěžek cfDNA ze stabilizované moči od 48 zdravých dárců.** Moč od 48 zdravých dárců byla stabilizována ihned po odběru. cfDNA byla extrahována ze 4 ml plazmy pomocí sady QIASymphony DSP Circulating DNA a výtěžek cfDNA byl kvantifikován použitím domácího real-time PCR testu pro kódující sekvenci 18S. Výsledky byly vypočítány jako cílové kopie na ml vložené moči.

## Přesnost chodu

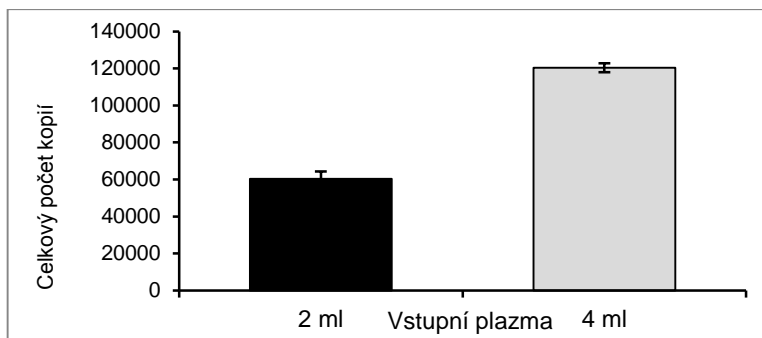
Variační koeficienty (VK) byly stanoveny pro extrakci lidské ccfDNA z EDTA plazmy. Pro přesnou analýzu byla ccfDNA kvantifikována pomocí domácího real-time PCR testu pro kódující sekvenci 18S ribozomální RNA. Celkově bylo provedeno 10 chodů přístroje QIASymphony, každý ve 4 šaržích (8 opakování na každou šarži). Přesné údaje jsou uvedeny v tabulce 1.

**Tabulka 1. Analýza přesného odhadu**

<b>Přesnost</b>	<b>CV (%)</b>
V rámci šarže	11,67
Opakovatelnost	13,14
Přesnost meziprojektu	13,14
Celková přesnost	14,12

## Ekvivalentní chování 2 ml a 4 ml protokolů

Ekvivalentní chování protokolů pro vstupní zkumavky byly pro sadu QIASymphony DSP Circulating DNA hodnoceny pomocí endogenní ccfDNA extrahované ze zásoby lidské plazmy. Celkově bylo provedeno 8 nezávislých chodů přístroje QIASymphony, každý chod ve 4 šaržích s 8 opakováními na každou šarži. Lineární oblast procedury sady QIASymphony DSP Circulating DNA byla stanovena pro kódující sekvenci 18S pomocí domácího real-time PCR testu (obrázek 4). Poměr rozdílu pro 2 ml a 4 ml protokoly je uveden v tabulce 2. (Referenční protokol činí 4 ml vstupního vzorku).



**Obrázek 4. Ekvivalentní chování při použití vstupního protokolu se 2 ml a 4 ml zkumavkami.** Lineární rozsah protokolu ccfDNA byl stanoven použitím 2 ml a 4 ml protokolu. Výtěžek ccfDNA byl kvantifikován domácím real-time PCR testem pro kódující sekvenci 18S ribozomální RNA. Výsledky byly vypočítány jako celkové kopie na protokol.

**Tabulka 2. Rozdíl mezi 2 ml a 4 ml protokoly (N=256)**

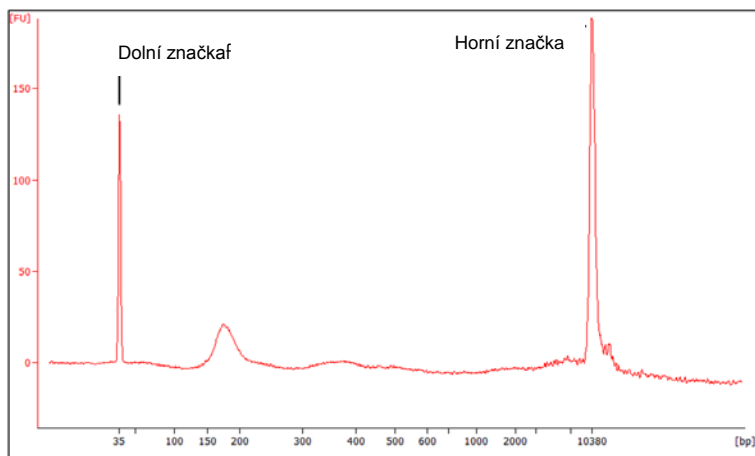
Parametr	Hodnota
Odhadovaný poměr geometrického průměru ve vypočítaných kopiích/ml	1,01
Dolní 95 % interval spolehlivosti	0,92
Horní 95 % interval spolehlivosti	1,11

Chování protokolů pro 2 ml a 4 ml vstupní zkumavky je ekvivalentní, měřené ve vypočítaných kopiích/ml.

## Distribuce velikosti

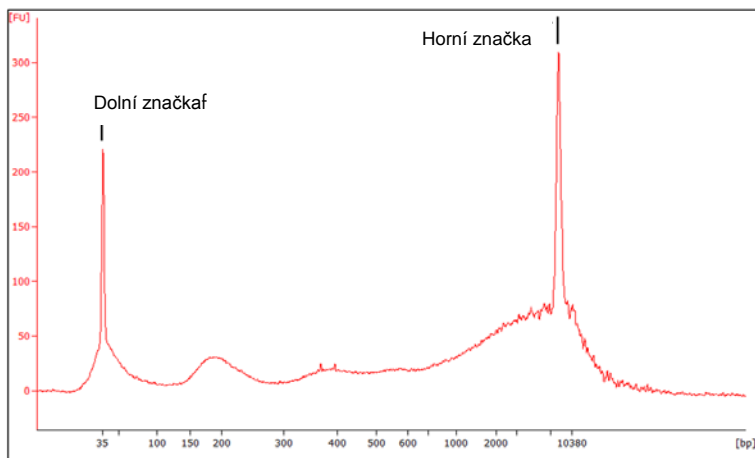
Pro vyhodnocení distribuce velikosti výstupního vzorku byla extrahována ccfDNA z 4 ml vstupního vzorku pomocí sady QIASymphony DSP Circulating DNA, eluované v 75  $\mu$ l. Potom bylo 1  $\mu$ l eluátu podrobeno analýze velikosti na bioanalyzáru Agilent 2100 za použití čipu Agilent High Sensitivity DNA. Bylo provedeno celkem 5 nezávislých opakování. Jeden reprezentativní profil DNA je ukázán na obrázku 5 pro plazmu a na obrázku 6 pro stabilizovanou moč.

Elektroforeogram plazmy na obrázku 5 ukazuje často pozorovaný vrchol na ~160 bp, v rozmezí od 145 bp do 196 bp, což je v rozmezí délky DNA s navázanými histony v nukleozomu. Elektroforeogram moči na obrázku 6 ukazuje, že převažující vrchol na ~160 bp je širší, a to v rozmezí od ~145 bp do 250 bp. Kromě toho se pro moč vyskytuje i druhý vrchol v rozsahu od ~20 bp do 100 bp (na úrovni spodního vrcholu značky), což indikuje frakci ccfDNA s vyšším stupněm fragmentace. Obrázek 6 navíc ukazuje vysoký počet dlouhých fragmentů DNA od ~ 2 kb. Velké množství takových fragmentů genomické DNA se s největší pravděpodobností často nachází ve vzorku moči kvůli genomické DNA uvolněné z buněk obsažených v moči.



**Obrázek 5. Distribuce velikosti ccfDNA z plazmy (profil bioanalyzáru).** ccfDNA byla extrahována ze 4 ml EDTA plazmy pomocí sady QIASymphony DSP Circulating DNA; 1  $\mu$ l eluátu bylo podrobena analýze pomocí čipu Agilent High Sensitivity DNA. X-osa: velikost bázových párů (bp); Y-osa: fluorescenční jednotka (FU).



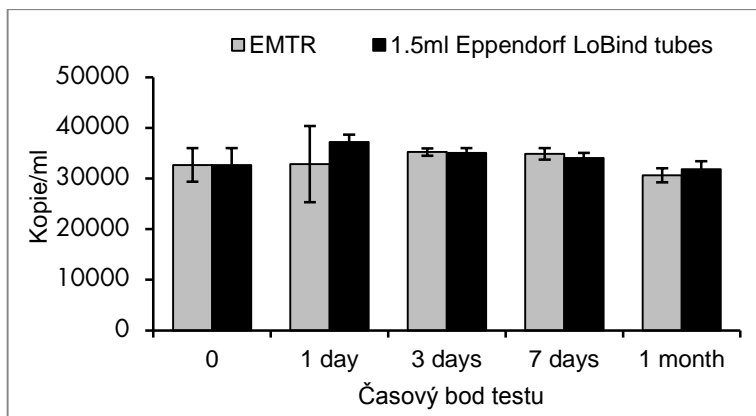


**Obrázek 6. Distribuce velikosti ccfDNA z moči (profil bioanalyzáru).** ccfDNA byla extrahována ze 4 ml stabilizované moči pomocí sady QIASymphony DSP Circulating DNA; 1  $\mu$ l eluátu bylo podrobena analýze pomocí čipu Agilent High Sensitivity DNA. X-osa: velikost básových párů (bp); Y-osa: fluorescenční jednotka (FU).

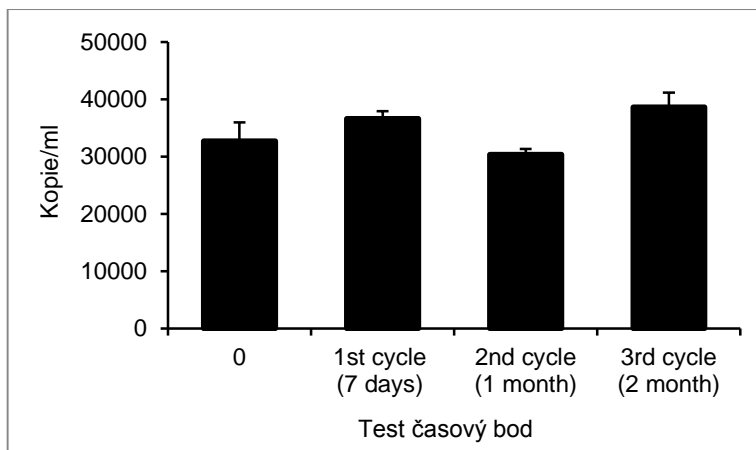
## Stabilita eluátů

Eluační stabilita pro sadu QIASymphony DSP Circulating DNA byla hodnocena pomocí extrahované ccfDNA z lidské ADTA plazmy. Eluáty byly uskladněny ve 2 odlišných formátech stojáneků: QIAGEN EMTR (eluční mikrozkušavky CL 96; katalog. č. 19588) a 1,5 ml zkumavky Eppendorf® LoBind Snap Cap - s bezpečnostním zacvakávacím uzávěrem. Eluáty byly analyzovány v 8 opakováních. Stabilita ccfDNA v eluátech byla stanovena domácím real-time PCR testem pro kódovací sekvenci 18S ribozomální RNA.

Eluační stabilita nebyla ovlivněna ani dobou trvání uskladnění při 2–8 °C až do jednoho měsíce, ani formátem pro skladování (obrázek 7). Stabilita DNA v LoBind zkumavkách nebyla ovlivněna skladováním při –15 do –30 °C, které zahrnovalo 3 cykly zmrazení a rozmrazování po 7 dnech, po jednom měsíci a po dvou měsících (obrázek 8).



**Obrázek 7. Stabilita ccfDNA v eluátech skladována při 2–8 °C ve dvou formátech zkumavek.** ccfDNA byla extrahována z EDTA plazmy pomocí sady QIASymphony DSP Circulating DNA a skladována při 2–8 °C pro různé časové body testu. Výtěžek ccfDNA byl kvantifikován domácím real-time PCR testem pro kódující sekvenci 18S ribozomální RNA. Výsledky byly vypočítány jako cílové kopie na ml vložené plazmy.



**Obrázek 8. Stabilita ccfDNA v eluátech skladována při -15-30 °C včetně 3 cyklů zmrazení-rozmrazení.** ccfDNA byla extrahována z EDTA plazmy pomocí sady QIASymphony DSP Circulating DNA a skladována při -15 až -30 °C v 1,5 ml zkumavkách Eppendorf LoBind. Výtěžek ccfDNA byl stanoven při 3 testovacích časových bodech při použití stejného eluátu ve 3 cyklech zmrazení-rozmrazení. Výtěžek ccfDNA byl kvantifikován pomocí domácího real-time PCR testu pro kódovací sekvenci 18S rRNA. Výsledky byly vypočítány jako cílové kopie na ml vložené plazmy.

---

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro sadu QIAGEN nebo příručce uživatele. Příručky k sadám a uživatelské příručky k produktům QIAGEN jsou dostupné na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) nebo na požádání u technických služeb QIAGEN nebo místního distributora.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Eppendorf® (Eppendorf AG).  
Registrované názvy, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, a to i v případě, že takto nejsou výslovně označeny, nejsou považovány za zákonem nechráněné.

02/2017 HB-2309-D01-001  
© 2017 QIAGEN, všechna práva vyhrazena



---

Objednávky: [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Technická podpora: [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Webové stránky: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

---