

Februar 2017

QIAsymphony[®] DSP Circulating DNA Kit

Leistungsmerkmale

IVD

CE

MAT

937556

Inhaltsverzeichnis

Leistungsmerkmale	4
Grundlegende Leistungscharakteristik.....	4
Laufpräzision	6
Leistungsäquivalenz der Protokolle für 2 ml und 4 ml	6
Größenverteilung	7
Eluatstabilität	9

Das QIAsymphony DSP Circulating DNA System ist ein gebrauchsfertiges In-vitro-Diagnostikum zur qualitativen Aufreinigung von zirkulierender zellfreier Human-DNA (ccfDNA) aus Humanplasma und -urin.

Der QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit ist ausschließlich für den Gebrauch mit dem QIAsymphony SP Gerät vorgesehen.

Der QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit enthält Reagenzien für die vollautomatisierte und gleichzeitige Aufreinigung von humaner ccfDNA aus einer Vielzahl von Humanplasma-Arten (mit EDTA oder Citrat antikoaguliert sowie Plasma aus ccfDNA-stabilisierten Blutentnahmeröhrchen) sowie Humanurin (stabilisiert und unstabilisiert). Nicht für jedes Blutentnahmeröhrchen wurde eine Leistungscharakteristik erstellt, diese ist vielmehr vom Anwender zu validieren.

Die aufgereinigte ccfDNA ist mit einer Vielzahl von nachgelagerten Anwendungen kompatibel. Das QIAsymphony SP führt alle Schritte des Aufreinigungsprotokolls aus. Bis zu 96 Proben, jeweils in Chargen von bis zu 24 Stück, können in einem Lauf verarbeitet werden. Bei Urinproben kann eine manuelle Vorbehandlung erforderlich sein.

Leistungsmerkmale

Grundlegende Leistungscharakteristik

Die grundlegende Leistungscharakteristik des QIA-symphony DSP Circulating DNA Kits wurde anhand von ccfDNA von 48 Einzelspendern evaluiert, die aus 4 ml stabilisiertem Plasma sowie aus 4 ml EDTA-Plasma und 4 ml stabilisiertem Urin extrahiert wurde. Die ccfDNA-Ausbeute wurde mit einem hauseigenen Echtzeit-PCR-Assay für die RNA-Codiersequenz des Ribosoms 18S bestimmt.

Die in Abbildung 1 (4 ml stabilisiertes Plasma), Abbildung 2 (4 ml EDTA-Plasma) und Abbildung 3 (4 ml stabilisierter Urin) erkennbaren Unterschiede in der Ausbeute (\log_{10} Kopien/ml) spiegeln die starke Spenderabhängigkeit der ccfDNA-Konzentration bei gleichem Volumen des jeweiligen Probenmaterials wider. Der Vergleich der ccfDNA-Ausbeute von stabilisiertem und EDTA-Plasma zeigt eine hohe Korrelation der 48 Einzelspender bei Verwendung von Plasma aus zwei verschiedenen Arten von Blutentnahmeröhrchen (Abb. 1 und 2).

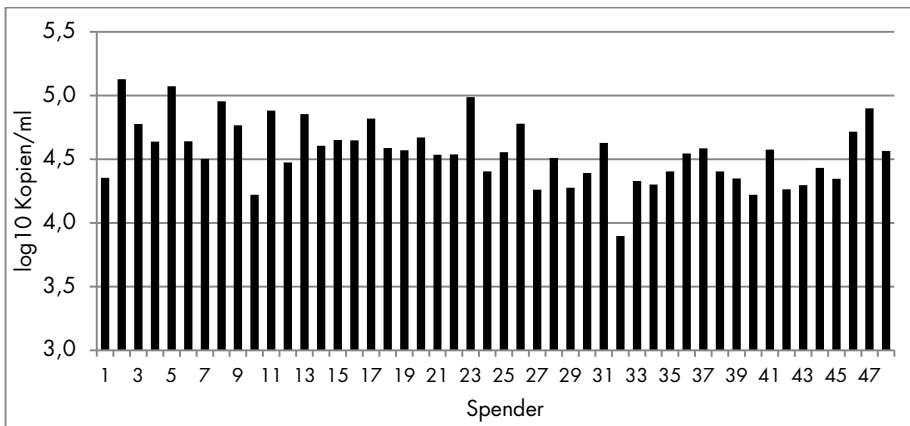


Abbildung 1. ccfDNA-Ausbeute aus Plasma von 48 Einzelspendern: ccfDNA-stabilisierte Blutentnahmeröhrchen. Die Blutspenden von 48 Einzelspendern wurden mit ccfDNA-stabilisierten

Blutentnahmeröhrchen entnommen. Die ccfDNA wurde mit dem QIASymphony DSP Circulating DNA Kit aus 4 ml Plasma extrahiert und mit einem hauseigenen Echtzeit-PCR-Assay für die 18S-Codiersequenz quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Zielkopien je ml Plasma-Aufgabevolumen berechnet.

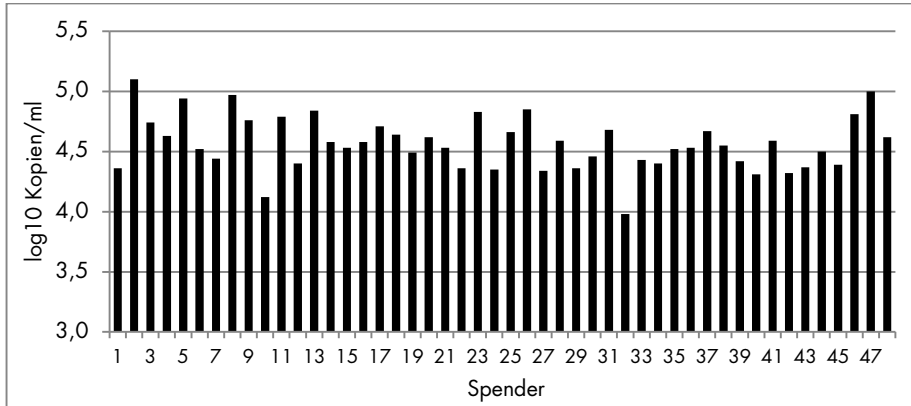


Abbildung 2. ccfDNA-Ausbeute aus Plasma von 48 Einzelspendern: EDTA-Blutentnahmeröhrchen. Die Blutspenden von 48 Einzelspendern wurden mit EDTA-Blutentnahmeröhrchen entnommen. Die ccfDNA wurde mit dem QIASymphony DSP Circulating DNA Kit aus 4 ml Plasma extrahiert und mit einem hauseigenen Echtzeit-PCR-Assay für die 18S-Codiersequenz quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Zielkopien je ml Plasma-Aufgabevolumen berechnet.

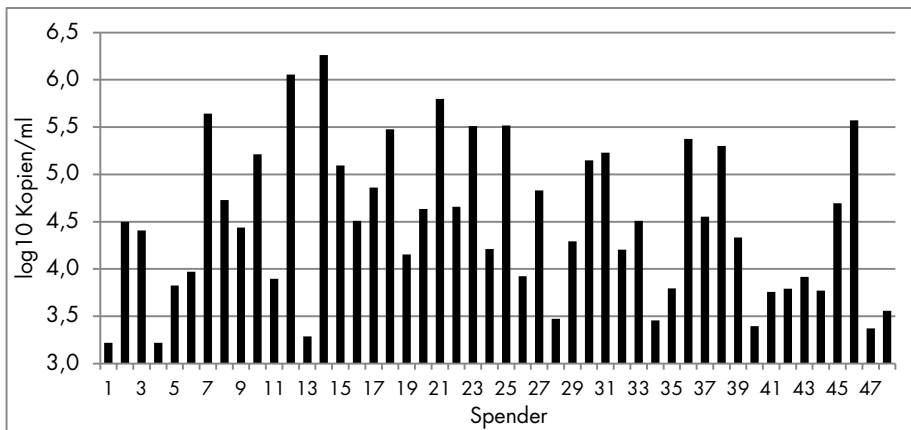


Abbildung 3. ccfDNA-Ausbeute aus stabilisiertem Urin von 48 Einzelspendern: Urin von 48 Einzelspendern wurde sofort nach der Entnahme stabilisiert. Die ccfDNA wurde mit dem QIASymphony DSP Circulating DNA Kit aus 4 ml Urin extrahiert und mit einem hauseigenen Echtzeit-PCR-Assay für die 18S-

Codiersequenz quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Zielkopien je ml Urin-Aufgabevolumen berechnet.

Laufpräzision

Es wurden Variationskoeffizienten (VK) für die Extraktion von humaner ccfDNA aus EDTA-Plasma bestimmt. Für die Präzisionsanalyse wurde die ccfDNA mit einem hauseigenen Echtzeit-PCR-Assays für die RNA-Codiersequenz des Ribosoms 18S quantitativ bestimmt. Es wurden insgesamt je 10 QIASymphony Läufe in 4 Chargen (8 Replikate je Charge) durchgeführt. Die Präzisionsdaten sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Auswertung der Präzisionsuntersuchungen

Präzision	VK (%)
Innerhalb einer Charge	11,67
Wiederholbarkeit	13,14
Laborpräzision	13,14
Gesamtpräzision	14,12

Leistungsäquivalenz der Protokolle für 2 ml und 4 ml

Die Leistungsäquivalenz der Protokolle für 2 ml und 4 ml Probenaufgabevolumen wurde für den QIASymphony DSP Circulating DNA Kit anhand von endogener ccfDNA evaluiert, die aus einem EDTA-Humanplasmapool extrahiert wurde. Es wurden insgesamt 8 unabhängige QIASymphony Läufe durchgeführt, jeder Lauf in 4 Chargen mit 8 Replikaten je Charge. Der lineare Bereich des Verfahrens mit dem QIASymphony DSP Circulating DNA Kit wurde mit einem hauseigenen Echtzeit-PCR-Assay für die 18S-Codiersequenz bestimmt (Abb. 4). Der Differenzquotient für die Protokolle für 2 ml und 4 ml ist in Tabelle 2 dargestellt. (Das Referenzprotokoll gilt für 4 ml Probenaufgabevolumen.)

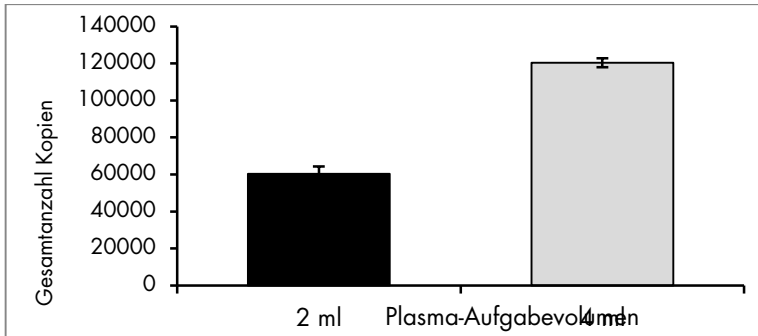


Abbildung 4. Leistungäquivalenz bei Anwendung der Protokolle für 2 ml und 4 ml Probenaufgabevolumen. Der lineare Bereich des ccfDNA-Protokolls wurde anhand der Protokolle für 2 ml und 4 ml bestimmt. Die ccfDNA-Ausbeute wurde mit einem hauseigenen Echtzeit-PCR-Assay für die 18S-Codiersequenz quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Kopien-Gesamtanzahl je Protokoll berechnet.

Tabelle 2. Differenz zwischen den Protokollen für 2 ml und 4 ml (N = 256)

Parameter	Wert
Geschätzter Quotient des als Kopien/ml berechneten geometrischen Mittelwerts	1,01
Untere 95%-Vertrauensgrenze	0,92
Obere 95%-Vertrauensgrenze	1,11

Die Leistungscharakteristik, gemessen in berechneten Kopien/ml, der Protokolle für 2 ml und 4 ml Probenaufgabevolumen ist äquivalent.

Größenverteilung

Zur Evaluierung der Größenverteilung der Probenausgabe wurde ccfDNA mit dem QIASymphony DSP Circulating DNA Kit aus einer Probenaufgabe von 4 ml extrahiert und in 75 µl eluiert, anschließend wurde 1 µl des Eluats einer Größenanalyse auf dem Agilent 2100 Bioanalytiker mit dem Agilent High Sensitivity DNA Chip unterzogen. Es wurden insgesamt 5

unabhängige Replikate durchgeführt. Ein repräsentatives DNA-Profil für Plasma ist in Abbildung 5, eines für stabilisierten Urin in Abbildung 6 dargestellt.

Das Elektropherogramm für Plasma in Abbildung 5 zeigt den häufig beobachteten Peak bei ca. 160 bp, der von 145 bp bis 196 bp reicht, was in den Längenbereich der histonegebundenen DNA im Nukleosom fällt. Im Elektropherogramm für Urin in Abbildung 6 ist der vorherrschende Peak bei ca. 160 bp breiter und reicht von ca. 145 bp bis 250 bp. Zudem ist bei Urin ein zweiter Peak im Bereich von ca. 20 bp bis 100 bp (auf Höhe des unteren Marker-Peaks) vorhanden, was darauf hindeutet, dass eine stärker fragmentierte ccfDNA-Fraktion vorliegt. Außerdem zeigt Abbildung 6 eine hohe Zahl von langen DNA-Fragmenten ab ca. 2.000 bp. Solche genomischen DNA-Fragmente sind bei Urinproben häufig in großer Menge zu beobachten, höchstwahrscheinlich, weil im Urin vorhandene Zellen genomische DNA freisetzen.

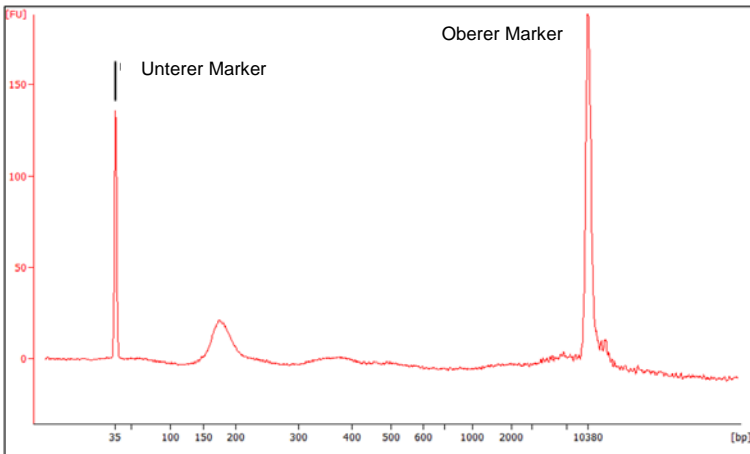


Abbildung 5. Größenverteilung von ccfDNA aus Plasma (auf Bioanalyser ermitteltes Profil). Die ccfDNA wurde mit dem QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit aus 4 ml EDTA-Plasma extrahiert; 1 µl Eluat wurde mit dem Agilent High Sensitivity DNA Chip analysiert. X-Achse: Größe in Basenpaaren (bp); y-Achse: Fluoreszenzenheiten (FE).

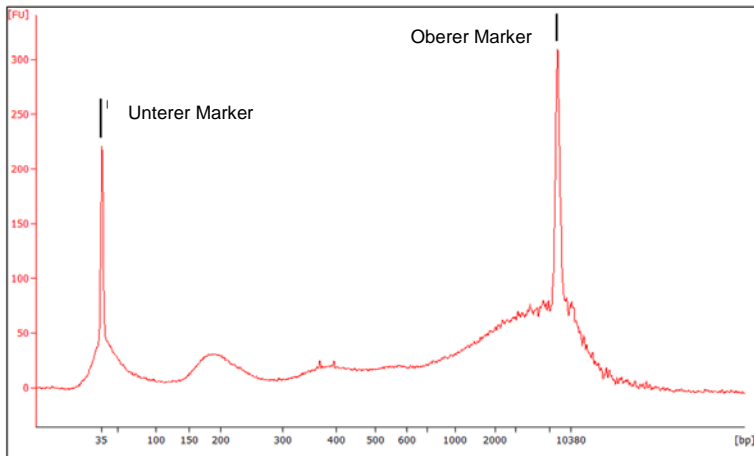


Abbildung 6. Größenverteilung von ccfDNA aus Urin (auf Bioanalyzer ermitteltes Profil). Die ccfDNA wurde mit dem QIASymphony DSP Circulating DNA Kit aus 4 ml stabilisiertem Urin extrahiert; 1 μ l Eluat wurde mit dem Agilent High Sensitivity DNA Chip analysiert. X-Achse: Größe in Basenpaaren (bp); y-Achse: Fluoreszenzeinheiten (FE).

Eluatstabilität

Die Eluatstabilität des QIASymphony DSP Circulating DNA Kits wurde anhand von extrahierter ccfDNA aus einem humanen EDTA-Plasmapool evaluiert. Die Eluate wurden in zwei verschiedenen Elutionsrackformaten gelagert: QIAGEN EMTR (Elution Microtubes CL 96; Kat.-Nr. 19588) und 1,5-ml-Röhrchen vom Typ Eppendorf® LoBind Snap Cap Safe-Lock Tube. Die Eluate wurden in 8 Replikaten analysiert. Die Stabilität der DNA in den Eluaten wurde mit einem hauseigenen Echtzeit-PCR-Assay für die RNA-Codiersequenz des Ribosoms 18S bestimmt.

Die Stabilität des Eluats bei 2–8 °C wurde weder durch eine Lagerdauer von bis zu 1 Monat noch durch das Lagerformat beeinträchtigt (Abb. 7). Die Stabilität von DNA in LoBind Tubes wurde durch eine Lagerung bei –15 °C bis –30 °C, die 3-maliges Einfrieren und Auftauen nach 7 Tagen, 1 Monat und 2 Monaten umfasste (Abb. 8).

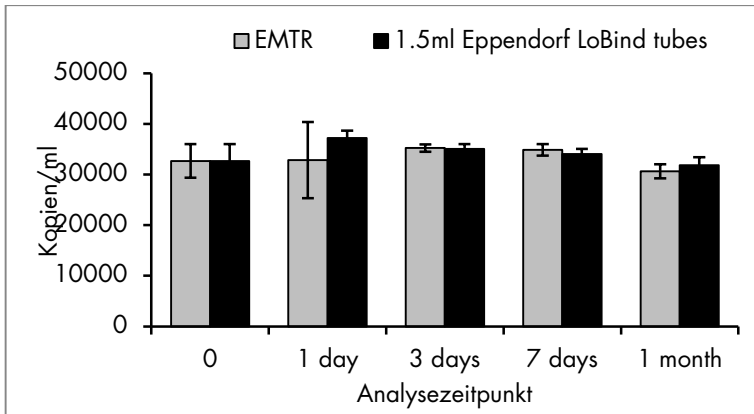


Abbildung 7. Stabilität der ccfDNA in Eluaten, die bei 2–8 °C in zwei Röhrenformaten gelagert wurden. Die ccfDNA wurde mit dem QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit aus EDTA-Plasma extrahiert und danach bei 2–8 °C gelagert und zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Die ccfDNA-Ausbeute wurde mit einem hauseigenen Echtzeit-PCR-Assay für die 18S-Codiersequenz quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Zielkopien je ml Plasma-Aufgabevolumen berechnet.

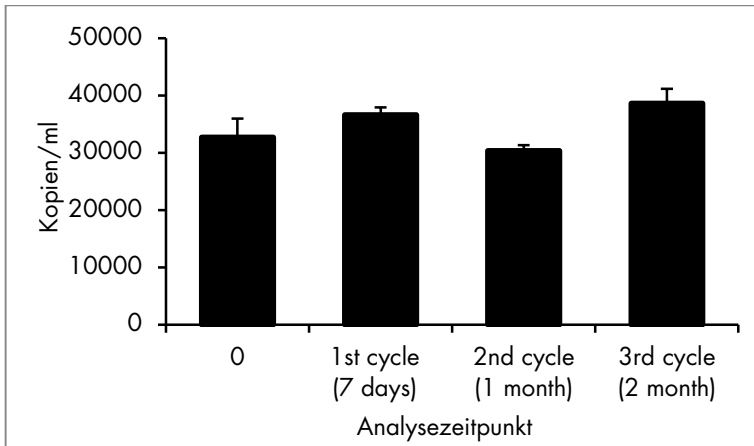


Abbildung 8. Stabilität der ccfDNA in Eluaten, die bei –15 °C bis –30 °C gelagert und 3-mal eingefroren und aufgetaut wurden. Die ccfDNA wurde mit dem QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit aus EDTA-Plasma extrahiert und dann in 1,5 ml Eppendorf LoBind Tubes bei –15 °C bis –30 °C gelagert. Die ccfDNA-Ausbeute wurde zu 3 Analysezeitpunkten anhand desselben Eluats unter 3-maligem Einfrieren und Auftauen bestimmt. Die ccfDNA-Ausbeute wurde mit einem hauseigenen Echtzeit-PCR-Assay für die

18S-Codiersequenz quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Zielkopien je ml Plasma-Aufgabevolumen berechnet.

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Hinweise finden Sie im Handbuch des jeweiligen QIAGEN Kits. Handbücher und Gebrauchsanweisungen zu QIAGEN Kits finden Sie im Internet unter www.qiagen.com oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder bei Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

Marken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (QIAGEN Gruppe); Eppendorf® (Eppendorf AG).
Eingetragene Marken, Warenzeichen usw., die in diesem Dokument verwendet werden, auch wenn sie nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet sind, gelten als gesetzlich geschützt.

02/2017 HB-2309-D01-001
© 2017 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

Bestellungen www.qiagen.com/contact | Technische Beratung support.qiagen.com | Internetseite www.qiagen.com
