




Charakteristiky funkčních vlastností

Sada QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue, verze 1 **REF** 60404

Správa verzí

Tento dokument je verzí 1, R3, Charakteristiky funkčních vlastností sady QIAamp DSP DNA FFPE Tissue.

  	<p>Před samotným testem si ověřte dostupnost nových revizí elektronického značení na adrese www.qiagen.com/HB-0414. Současný stav verze je vyznačen datem vydání (formát: měsíc/rok).</p>
---	---

Analýza následných testů

Eluovaná genomová DNA je připravena k použití v různých následných testech včetně řady následných testů pro diagnostické účely in vitro. Další informace o konkrétních funkčních vlastnostech systému jsou uvedeny v příručce k příslušné sadě QIAGEN.

Výtěžek purifikované DNA

Vzorky fixované formalínem a zalité do parafrínu (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) mohou vykazovat vysoký stupeň heterogenity tkáně. Povrch tkáně je kromě toho u vzorků FFPE velmi různorodý, což vede k proměnnému množství extrahované DNA. Uživatel by měl proto optimalizovat počet řezů, tloušťku řezů a plochu řezů podle zkoumaného vzorku a postupů používaných v dané laboratoři.

Jestliže se sada používá ve spojení s navazující aplikací QIAGEN, přečtěte si návod v příslušné příručce.

Nedostatečná dehydratace tkáně během přípravy tkáně FFPE, vložení příliš velkého množství parafrínu se vzorkem do extrakční zkumavky, použití etanolu nižší čistoty (nevhodného pro molekulární biologii) než se doporučuje, nebo ponechání xylenu či etanolu ve vzorku může vést

k suboptimální extrakci a malému množství DNA.

Opakovatelnost

Opakovatelnost byla hodnocena pomocí šesti buněčných linií FFPE získaných z lidských buněk fixovaných ve formalínu a zalitých do parafínu. Vzorke byly testovány pomocí QuantiTect® SYBR® Green master mix a genově specifických primerů pro β -aktin společně s cyklem PCR v reálném čase Rotor-Gene® Q. Reakce PCR byly provedeny pro fragment 174 bp a pro fragment 218 bp lidského genu pro β -aktin.

Pro statistickou analýzu bylo použito 72 datových bodů pro každou velikost fragmentu. Statistická analýza zahrnovala výpočet směrodatné odchylky (standard deviation, SD) a horní a dolní meze intervalu spolehlivosti na hladině 95 %. Variace byla odhadnuta analýzou složek rozptylu jako směrodatná odchylka pro fragment 218 bp (SD: 0,342 C_T ; dolní mez intervalu spolehlivosti na hladině 95 %: 0,291; horní mez intervalu spolehlivosti na hladině 95 %: 0,413). Tyto hodnoty lze použít jako odhad opakovatelnosti pro proces extrakce. Odhad variace pro fragment 174 bp byl 0,258 C_T ; dolní mez intervalu spolehlivosti na hladině 95 %: 0,220; horní mez intervalu spolehlivosti na hladině 95 %: 0,312.

Reprodukovatelnost

Posouzení reprodukovatelnosti bylo provedeno mezi třemi laboratořemi pomocí tří klinických vzorků FFPE obsahujících tkáň nemalobuněčného karcinomu plic (non-small cell lung cancer, NSCLC): jednoho s mutací delece 6223, jednoho s mutací L858R a jednoho vzorku divokého kmene (wild-type, WT). Klinické vzorky FFPE byly vybrány na základě známého stavu jejich mutace podle sekvenování Sangerovou metodou.

U každého mutantního klinického vzorku FFPE bylo 48 sekvenčních řezů FFPE randomizováno do párů, které byly použity při extrakci a rozděleny do tří šarží, jedna pro každé zkušební pracoviště.

Extrakce byly na každém zkušebním pracovišti provedeny dvojmo. Na každém pracovišti byla pro extrakci použita jedinečná šarže sad QIAamp FFPE DNA DSP. Posouzení vzorků a mutací bylo na všech třech pracovištích provedeno pomocí sady *therascreen* EGFR RGQ PCR. Vzorke byly testovány ve třech dnech nejdoucích za sebou v období šesti dnů. Každý vzorek byl na každém pracovišti testován šestkrát s výslednými 18 datovými body na každý vzorek.

U všech vzorků na všech třech pracovištích byla prokázána 100% správnost přiřazení mutací.

Linearita

Sadu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue lze použít k izolování DNA z různých typů tkání. Podle požadavků zákazníka je nutné stanovit lineární rozsah a validovat jej pro konkrétní použití. U různých typů tkání se předpokládají různé lineární rozsahy v závislosti na množství a charakteristikách tkáně vložené do systému.

Interferující látky

Sadu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue lze použít k izolování DNA z různých typů tkání. Potenciálně interferující látky mohou pocházet z různých zdrojů, např. z přirozených metabolitů specifických pro daný typ tkáně a orgán, metabolitů produkovaných za patologických podmínek, látek zavedených při léčbě pacienta nebo látek, které pacient zkonsumoval. Vzhledem ke složitosti potenciálně interferujících látek a různé citlivosti konkrétních navazujících aplikací doporučujeme, aby uživatelé posoudili účinek interferujících látek ve svých systémech a validovali metodu kontroly interference v konkrétní navazující diagnostické aplikaci.

Další informace o interferujících látkách v konkrétních navazujících aplikacích QIAGEN naleznete v příručkách k sadám.

Zkřížená kontaminace

K posouzení úrovně zkřížené kontaminace byly použity dvě buněčné linie FFPE vzorků NSCLC: vzorek divokého kmene a vzorek buněčné linie FFPE s mutací L858R na 21. exonu. Cílem studie bylo napodobit situaci, kdy by vzorky obsahující vysoký stupeň mutace mohly během extrakce zkříženě kontaminovat jiné vzorky. Byla provedena purifikace DNA za účelem čelenže postupu purifikací DNA ze vzorků s mutací L858R umístěných vedle vzorků divokého kmene s použitím jedné šarže reagentů. Zkřížená kontaminace byla posouzena pomocí sady *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR. Z výsledků vyplývá, že v celém systému nedošlo k žádné zkřížené kontaminaci.

Funkční charakteristiky eluátu QIAamp DSP DNA FFPE DNA v testu Pyrosequencing[®]

DNA izolovaná z tkáně FFPE byla zředěna na koncentraci DNA 2 ng/μl pro analýzu pomocí testu *therascreen* EGFR Pyro. Ve všech cyklech použitých ke stanovení funkčních charakteristik byl signál u všech kodonů větší než 30 RLU (relativních světelných jednotek) a všechny vzorky měly správný lékařský výsledek analýzy mutace.

Stabilita eluátů

Stabilita eluátů bude záviset na obsahu a druhu souběžně odstraňovaných nečistot (podle typu tkáně), na elučním objemu a podmínkách skladování. Doporučujeme, aby si uživatelé stanovili stabilitu eluátů podle svých konkrétních požadavků.

Jestliže se sada používá ve spojení s navazující aplikací QIAGEN, přečtěte si návod v příslušné příručce k sadě.

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příslušné příručce pro sadu QIAGEN® nebo v příručce uživatele. Příručky k sadám QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na stránkách www.qiagen.com nebo si je lze vyžádat od technických služeb společnosti QIAGEN nebo místního distributora.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QuantiTect®, Pyrosequencing®, Rotor-Gene®, *therascreen*® (skupina QIAGEN); SYBR® (Thermo Fisher Scientific Inc).

© 2017 QIAGEN, všechna práva vyhrazena. 02/2017 HB-0414-D01

Objednávky www.qiagen.com/contact | Technická podpora support.qiagen.com | Webová stránka www.qiagen.com