

Şubat 2017

QIAsymphony® DSP Dolaşan DNA Kiti

Performans Özellikleri

IVD

CE

MAT

937556

İçindekiler

| | |
|--|---|
| Performans Özellikleri | 4 |
| Temel performans | 4 |
| Çalışma keskinliği | 5 |
| 2 ml ve 4 ml protokollerinin eşdeğer performansı | 6 |
| Büyüklik dağılımı | 7 |
| Elüt stabilitesi | 9 |

QIASymphony DSP Dolaşan DNA sistemi insan plazma ve idrarından insan dolaşan hücre dışı DNA'sının (ccfDNA) kalitatif saflaştırılması için kullanıma hazır bir in vitro sistem oluşturur.

QIASymphony DSP Dolaşan DNA Kitinin sadece QIASymphony SP cihazı ile kombinasyon halinde kullanılması amaçlanmıştır.

QIASymphony DSP Dolaşan DNA Kiti çok çeşitli insan plazma tipleri (EDTA veya sitratla antikoagölasyon yapılmış ve ayrıca ccfDNA stabilize edilmiş kan toplama tüplerinden plazma) ve insan idrarından (stabilize edilmiş ve edilmemiş) insan ccfDNA'sının tam otomatik ve eşzamanlı saflaştırılması için reaktifler sağlar. Her kan toplama tüpü için bir performans özelliği belirlenmemiştir ve kullanıcı tarafından doğrulanması gerekir.

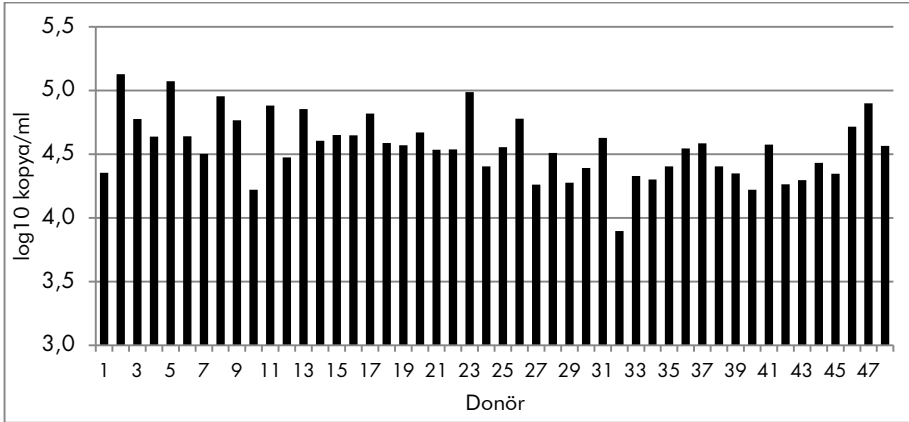
Saflaştırılmış ccfDNA çok çeşitli aşağı doğru uygulamalarla uyumludur. QIASymphony SP saflaştırma işleminin tüm adımlarını gerçekteştirir. Tek bir çalışmada 24'lük gruplar halinde 96 adede kadar örnek işlenir. İdrar örnekleri için manuel örnek ön muamelesi gerekebilir.

Performans Özellikleri

Temel performans

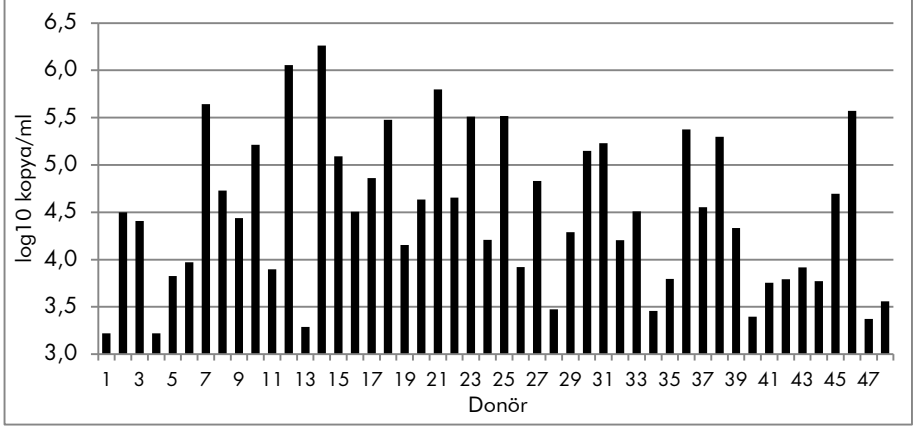
QIASymphony DSP Dolaşan DNA Kiti için temel performans 4 ml stabilize edilmiş plazma ve ayrıca 4 ml EDTA plazma ve 4 ml stabilize edilmiş idrardan ekstraksiyonu yapılmış ccfDNA açısından 48 ayrı donör kullanılarak değerlendirilmiştir. ccfDNA verimi 18S ribozomal RNA kodlama sekansı için tesis içi gerçek zamanlı PCR tahlili kullanılarak belirlenmiştir.

Şekil 1 (4 ml stabilize edilmiş plazma), Şekil 2 (4 ml EDTA plazma) ve Şekil 3 (4 ml stabilize edilmiş idrar) içindeki verimlerdeki (log10 kopya/ml) farklılıklar ilgili örnek materyalinin aynı hacminde tipik olarak bulunan donöre kuvvetli şekilde bağımlı ccfDNA konsantrasyonlarını yansıtmaktadır. Stabilize edilmiş ve EDTA plazma arasındaki ccfDNA verimi iki farklı türde kan toplama tüplerinden plazma kullanılarak (Şekil 1 ve Şekil 2) 48 ayrı donörle yüksek bir korelasyon göstermektedir.



Şekil 1. 48 ayrı donörün plazmasından ccfDNA verimi: ccfDNA stabilize edilmiş kan toplama tüpleri. 48 ayrı donörden ccfDNA stabilize edilmiş kan toplama tüplerine kan alınmıştır. ccfDNA ekstraksiyonu 4 ml plazmadan QIASymphony DSP Dolaşan DNA Kiti kullanılarak yapılmış ve ccfDNA verimi 18S kodlama sekansı için bir tesis içi gerçek zamanlı PCR tahlili kullanılarak kantifiye edilmiştir. Sonuçlar ml plazma girişi başına hedef kopya olarak hesaplanmıştır.

Şekil 2. 48 ayrı donörün plazmasından ccfDNA verimi: EDTA kan toplama tüpleri. 48 ayrı donörden EDTA kan toplama tüplerine kan alınmıştır. ccfDNA ekstraksiyonu 4 ml plazmadan QIASymphony DSP Dolaşan DNA Kiti kullanılarak yapılmış ve ccfDNA verimi 18S kodlama sekansı için bir tesis içi gerçek zamanlı PCR tahlili kullanılarak kantifiye edilmiştir. Sonuçlar ml plazma girişi başına hedef kopya olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3. 48 ayrı donörden stabilize edilmiş idrardan ccfDNA verimi. 48 ayrı donörden idrar, toplamadan hemen sonra stabilize edilmiştir. ccfDNA ekstraksiyonu 4 ml idrardan QIASymphony DSP Dolaşan DNA Kiti kullanılarak yapılmış ve ccfDNA verimi 18S kodlama sekansı için bir tesis içi gerçek zamanlı PCR tahlili kullanılarak kantifiye edilmiştir. Sonuçlar ml idrar girişi başına hedef kopya olarak hesaplanmıştır.

Çalışma kesinliği

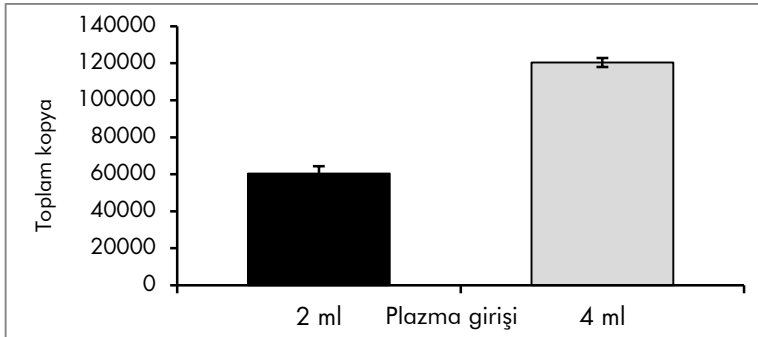
EDTA plazmadan insan ccfDNA'sı ekstraksiyonu için varyasyon katsayıları (CV'ler) belirlenmiştir. Kesinlik analizi için ccfDNA, 18S ribozomal kodlama sekansı için bir tesis içi gerçek zamanlı PCR tahlili kullanılarak kantifiye edilmiştir. Toplam olarak 4 grupta (grup başına 8 replikat) 10 QIASymphony çalışması yapılmıştır. Kesinlik verileri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Kesinlik tahminlerinin analizi

| Kesinlik | CV (%) |
|--------------------|--------|
| Grup içi | 11,67 |
| Tekrarlanabilirlik | 13,14 |
| Ara kesinlik | 13,14 |
| Toplam kesinlik | 14,12 |

2 ml ve 4 ml protokollerinin eşdeğer performansı

2 ml ve 4 ml örnek girişi için protokollerin eşdeğer performansı bir insan EDTA plazma havuzundan ekstraksiyonu yapılmış endojen ccfDNA kullanılarak QIASymphony DSP Dolaşan DNA Kiti için değerlendirilmiştir. Her çalışmada grup başına 8 replikatla 4 grup olacak şekilde toplam 8 bağımsız QIASymphony çalışması yapılmıştır. QIASymphony DSP Dolaşan DNA Kiti işleminin lineer aralığı 18S kodlama sekansı için bir tesis içi gerçek zamanlı PCR tahlili ile belirlenmiştir (Şekil 4). 2 ml ve 4 ml protokoller için farkın oranı Tablo 2'de gösterilmiştir. (Referans protokol 4 ml örnek giriştir).



Şekil 4. 2 ml ve 4 ml örnek girişi protokolü kullanılarak eşdeğer performans. ccfDNA protokolünün lineer aralığı 2 ml ve 4 ml protokolleri kullanılarak belirlenmiştir. ccfDNA verimi 18S kodlama sekansı için bir tesis içi gerçek zamanlı PCR tahlili kullanılarak kantifiye edilmiştir. Sonuçlar protokol başına toplam kopya olarak hesaplanmıştır.

Tablo 2. 2 ml ve 4 ml protokoller arasında fark (N = 256)

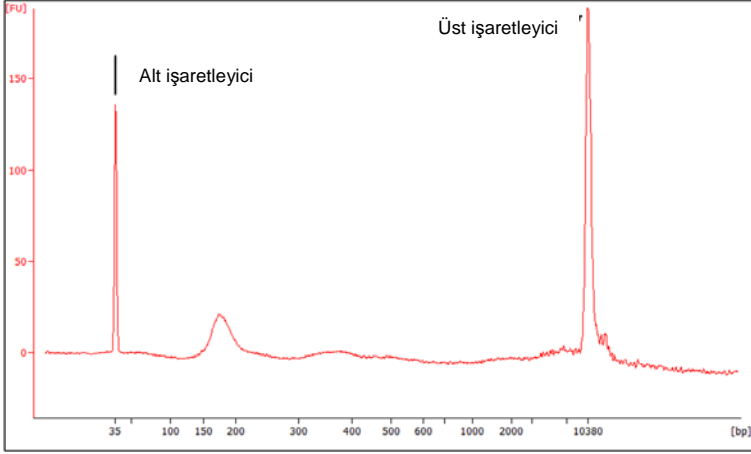
| Parametre | Değer |
|--|-------|
| Hesaplanan kopya/ml olarak geometrik ortalamanın tahmini oranı | 1,01 |
| Alt %95 güven limiti | 0,92 |
| Üst %95 güven limiti | 1,11 |

2 ml ve 4 ml örnek girişi için protokollerin performansı hesaplanan kopya/ml ile ölçüldüğü şekilde eşdeğerdir.

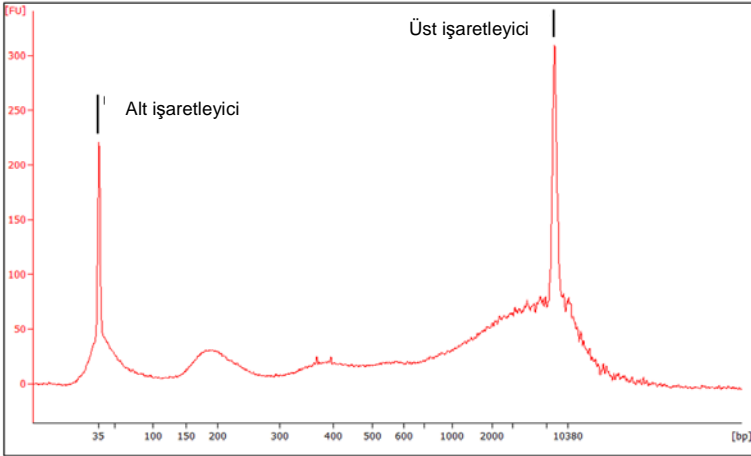
Büyüklük dağılımı

Örnek çıkışının büyüklük dağılımını değerlendirmek için 4 ml örnek girişinden ccfDNA ekstraksiyonu QIASymphony DSP Dolaşan DNA Kiti kullanılarak yapılmış, 75 μ l içinde elüsyonu yapılmış ve sonra 1 μ l elüt bir Agilent High Sensitivity DNA Chip kullanılarak Agilent 2100 Bioanalyzer ile büyüklük analizine tabi tutulmuştur. Toplam 5 bağımsız replikat kullanılmıştır. Şekil 5'te plazma ve Şekil 6'da stabilize edilmiş idrar için bir temsili DNA profili gösterilmiştir.

Şekil 5'te plazma için elektroferogram 145 bp ile 196 bp aralığında ~160 bp'de sık gözlenen tepeyi göstermektedir ve bu da nükleozomda histona bağlı DNA uzunluğu aralığındadır. Şekil 6'da idrar için elektroferogram ~145 bp ile 250 bp aralığında, ~160 bp'deki temel tepenin daha geniş olduğunu göstermektedir. Ayrıca idrar için ~20 bp ile 100 bp aralığında ikinci bir tepe (alt işaretleyici tepesi seviyesinde) mevcuttur ve daha yüksek bir fragmentasyon derecesi olan bir ccfDNA fraksiyonuna işaret eder. Ayrıca Şekil 6, ~2 kb değerinden yüksek sayıda uzun DNA fragmanı göstermektedir. İdrar örneklerinde sıklıkla bulunan bu tür genomik DNA fragmanlarının en büyük olasılıkla nedeni idrarda bulunan hücrelerden genomik DNA'nın serbest kalmasıdır.



Şekil 5. Plazmadan ccfDNA'nın büyüklük dağılımı (Bioanalyzer profili). ccfDNA ekstraksiyonu 4 ml EDTA plazmadan QIASymphony DSP Dolaşan DNA Kiti kullanılarak yapılmıştır; 1 μ l elüt Agilent High Sensitivity DNA Chip analizine tabi tutulmuştur. X eksen: baz çifti büyüklüğü (bp); Y eksen: floresans üniteleri (FU).

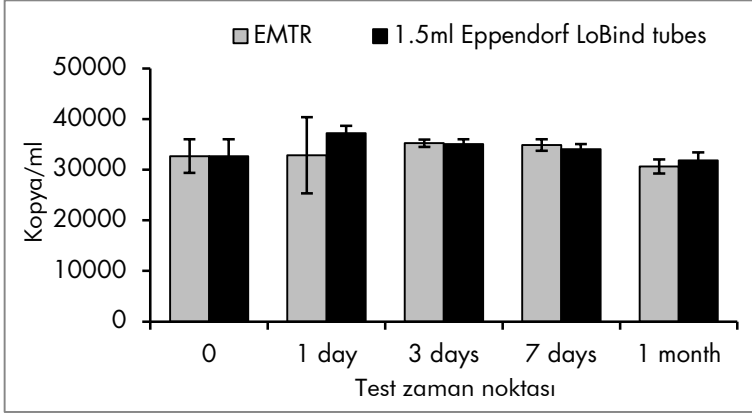


Şekil 6. İdrardan ccfDNA büyüklük dağılımı (Bioanalyzer profili). ccfDNA ekstraksiyonu 4 ml stabilize edilmiş idrardan QIASymphony DSP Dolaşan DNA Kiti kullanılarak yapılmıştır; 1 μ l elüt Agilent High Sensitivity DNA Chip analizine tabi tutulmuştur. X eksen: baz çifti büyüklüğü (bp); Y eksen: floresans üniteleri (FU).

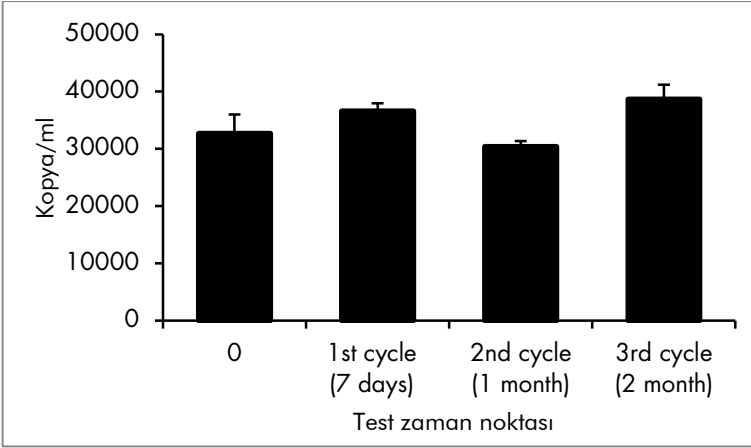
Elüt stabilitesi

QIAsymphony DSP Dolaşan DNA Kiti için elüt stabilitesi bir insan EDTA plazma havuzundan ekstraksiyonu yapılmış ccfDNA kullanılarak değerlendirilmiştir. Elütler 2 farklı elüsyon askısı formatında saklanmıştır: QIAGEN EMTR (Elüsyon Mikrotüpleri CL 96; kat. no. 19588) ve 1,5 ml Eppendorf® LoBind Snap Cap Safe-Lock tüpleri. Elütler 8'li replikatlar halinde analiz edilmiştir. DNA'nın elütlerde stabilitesi 18S ribozomal RNA kodlama sekansı için bir tesis içi gerçek zamanlı PCR tahlili kullanılarak belirlenmiştir.

2–8°C'de elüt stabilitesi bir aya kadar saklama süresinden veya saklama formatından etkilenmemiştir (Şekil 7). DNA'nın LoBind tüplerde stabilitesi 7 gün, bir ay ve iki ay sonrasında 3 dondurma/çözme döngüsü içerecek şekilde –15 ila –30°C'de saklamadan etkilenmemiştir (Şekil 8).



Şekil 7. 2 tüp formatında 2–8°C'de saklanan elütlerde ccfDNA stabilitesi. ccfDNA ekstraksiyonu EDTA plazmadan QIAsymphony DSP Dolaşan DNA Kiti kullanılarak yapılmış ve farklı test zaman noktaları için 2–8°C'de saklanmıştır. ccfDNA verimi 18S kodlama sekansı için bir tesis içi gerçek zamanlı PCR tahlili kullanılarak kantifiye edilmiştir. Sonuçlar ml plazma girişi başına hedef kopya olarak hesaplanmıştır.



Şekil 8. 3 dondurma-çözme döngüsü dahil -15 ila -30°C'de saklanan elütlerde ccfDNA stabilitesi. ccfDNA ekstraksiyonu EDTA plazmadan QIASymphony DSP Dolaşan DNA Kiti kullanılarak yapılmış ve 1,5 ml Eppendorf LoBind tüplerde -15 ila -30°C'de saklanmıştır. ccfDNA verimi 3 dondurma-çözme döngüsünde aynı elüt kullanılarak 3 test zaman noktasında belirlenmiştir. ccfDNA verimi 18S kodlama sekansı için bir tesis içi gerçek zamanlı PCR tahlili kullanılarak kantifiye edilmiştir. Sonuçlar ml plazma girişi başına hedef kopya olarak hesaplanmıştır.

Güncel lisanslama bilgisi ve ürüne spesifik red beyanları için ilgili QIAGEN kiti el kitabı veya kullanım kılavuzuna bakınız. QIAGEN kit el kitapları ve kullanım kılavuzları www.qiagen.com adresinde bulunabilir veya QIAGEN Technical Services veya yerel distribütörünüzden istenebilir.

Ticari markalar: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Eppendorf® (Eppendorf AG).

Bu belgede kullanılan tescilli isimler, ticari markalar vs. bu şekilde işaretlenmemiş olsalar bile kanunen koruma altında olmadıkları düşünülmemelidir.

02/2017 HB-2309-D01-001

© 2017 QIAGEN, tüm hakları saklıdır

