

Helmikuu 2017

QIAsymphony[®] DSP Circulating DNA Kit

Suorituskykyominaisuudet

IVD

CE

MAT

937556

Sisällysluettelo

Suorituskykyominaisuudet	4
Perussuorituskyky.....	4
Ajon tarkkuus.....	6
2 ml:n ja 4 ml:n protokollien vastaavat suorituskyvyt.....	7
Kokojakauma.....	8
Eluaatin stabiilius.....	10

QIAsymphony DSP Circulating DNA -järjestelmä koostuu käyttövalmiista in vitro -järjestelmästä, joka on tarkoitettu ihmisen verenkierrassa olevan soluttoman DNA:n kvalitatiiviseen puhdistukseen ihmisen plasmasta ja virtsasta.

QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit on tarkoitettu käytettäväksi ainoastaan yhdessä QIAsymphony SP -laitteen kanssa.

QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit -tarvikesarjaan kuuluu reagensseja, jotka on tarkoitettu hyvin monentyypisen ihmisen plasman (EDTA:lla tai sitraatilla antikoaguloitun plasman sekä stabiloitujen ccfDNA-verinäyteputkien sisältämän plasman) sekä ihmisen virtsan (stabiloidun ja stabiloimattoman) sisältämän ihmisen ccfDNA:n täysin automaattiseen ja samanaikaiseen puhdistukseen. Jokaisen verinäyteputken suorituskykyominaisuuksia ei ole määritetty, vaan käyttäjän pitää varmistaa ne.

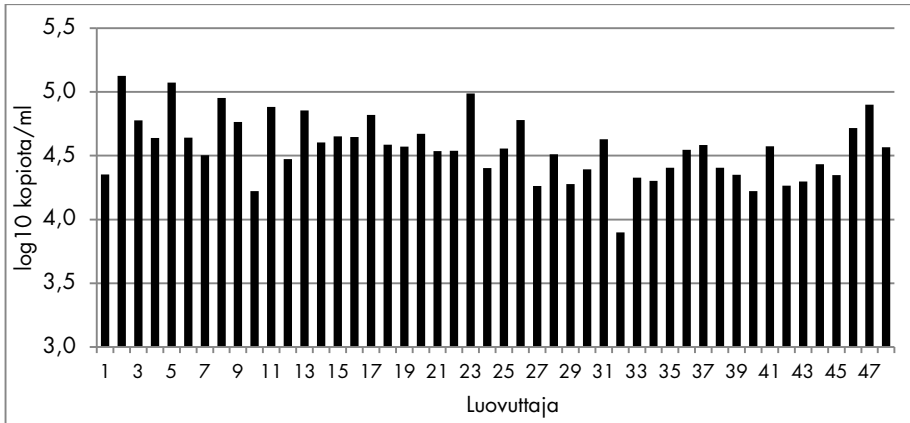
Puhdistettua ccfDNA:ta voidaan käyttää monenlaisissa jatkosovelluksissa. QIAsymphony SP suorittaa kaikki näytteen puhdistusmenetelmän vaiheet. Yhdessä ajossa voidaan käsitellä enintään 96 näytettä 24 näytteen erissä. Virtsanäytteille on mahdollisesti tehtävä manuaalinen näytteen esikäsitely.

Suorituskykyominaisuudet

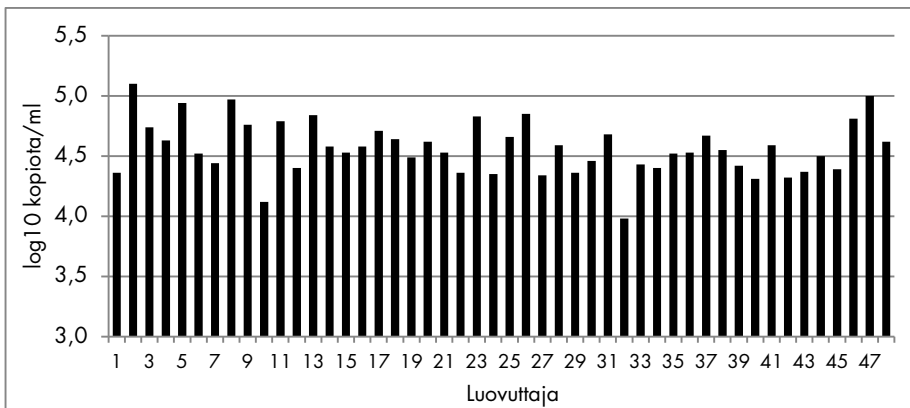
Perussuorituskyky

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit -tarvikesarjan perussuorituskyky arvioitiin käyttämällä 48 yksittäistä luovuttajaa. Suorituskyvyn arviointi tehtiin ccfDNA:sta, joka saatiin 4 ml:sta stabiloitua plasmaa sekä 4 ml:sta EDTA-plasmaa ja 4 ml:sta stabiloitua virtsaa. ccfDNA:n saanto määritettiin käyttämällä 18S-ribosomin RNA-koodaussekvenssin paikallista reaaliaikaista PCR-määrittystä.

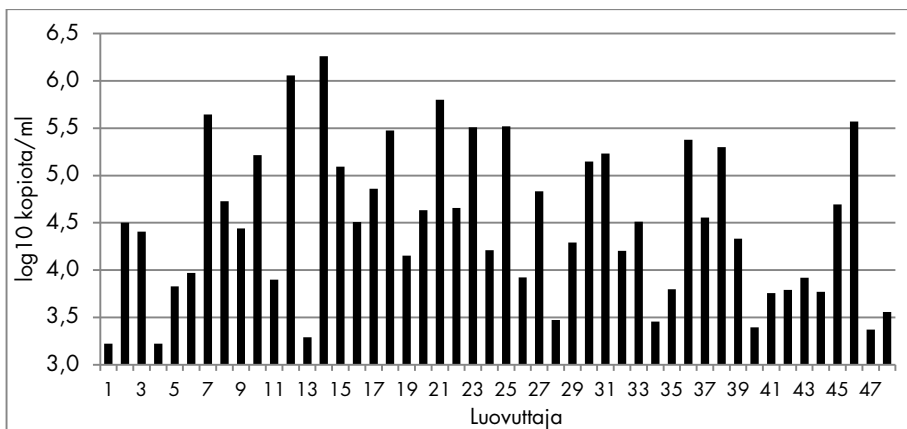
Kuvan 1 (4 ml stabiloitua plasmaa), kuvan 2 (4 ml EDTA-plasmaa) ja kuvan 3 (4 ml stabiloitua virtsaa) saantojen ero (\log_{10} kopiota/ml) johtuu pitkälti luovuttajan mukaan vaihtelevista ccfDNA-pitoisuuksista, joita havaitaan yleensä samasta määrästä vastaavaa näytemateriaalia. Stabiloitun ja EDTA-plasman välinen ccfDNA:n saannot korreloivat vahvasti 48 yksittäisellä luovuttajalla käytettäessä plasmaa kahdesta erityyppisestä BCT:stä (kuvat 1 ja 2).



Kuva 1. ccfDNA:n saanto 48 yksittäisen luovuttajan plasmasta: stabiloidut ccfDNA-verinäyteputket. 48 yksittäistä luovuttajaa luovutti vertaan stabiloituihin ccfDNA-verinäyteputkiin. ccfDNA saatiin 4 ml:sta plasmaa käyttäen QIASymphony DSP Circulating DNA Kit -tarvikesarjaa, ja ccfDNA:n saanto määritettiin käyttämällä 18S-koodaussekvenssin reaaliaikaista PCR-määrittystä paikan päällä. Tulokset laskettiin kopioiden tavoitemääränä laitteeseen asetettua plasmamillilitraa kohti.



Kuva 2. ccfDNA:n saanto 48 yksittäisen luovuttajan plasmasta: EDTA-verinäyteputket. 48 yksittäistä luovuttajaa luovutti vertaan EDTA-verinäyteputkiin. ccfDNA saatiin 4 ml:sta plasmaa käyttäen QIASymphony DSP Circulating DNA Kit -tarvikesarjaa, ja ccfDNA:n saanto määritettiin käyttämällä 18S-koodaussekvenssin reaaliaikaista PCR-määrittystä paikan päällä. Tulokset laskettiin kopioiden tavoitemääränä laitteeseen asetettua plasmamillilitraa kohti.



Kuva 3. ccfDNA:n saanto 48 yksittäisen luovuttajan stabiloidusta virtsasta. 48 luovuttajan virtsa stabiloitiin välittömästi virtsanäytteen ottamisen jälkeen. ccfDNA saatiin 4 ml:sta virtsaa käyttäen QIA Symphony DSP Circulating DNA Kit -tarvikesarjaa, ja ccfDNA:n saanto määritettiin käyttämällä 18S-koodaussekvenssin reaaliaikaista PCR-määrittystä paikan päällä. Tulokset laskettiin kopioiden tavoitemääränä käytettyä virtsamillilitraa kohti.

Ajon tarkkuus

Ihmisen ccfDNA:n talteenotolle EDTA-plasmasta määritettiin variaatiokertoimet (CV). Tarkkuuden analysoimiseksi ccfDNA määritettiin käyttämällä 18S-ribosomin koodaussekvenssin reaaliaikaista PCR-määrittystä paikan päällä. Kullekin neljästä erästä (8 replikaattia erää kohti) suoritettiin yhteensä 10 QIA Symphony-ajoa. Tarkkuustiedot esitetään taulukossa 1.

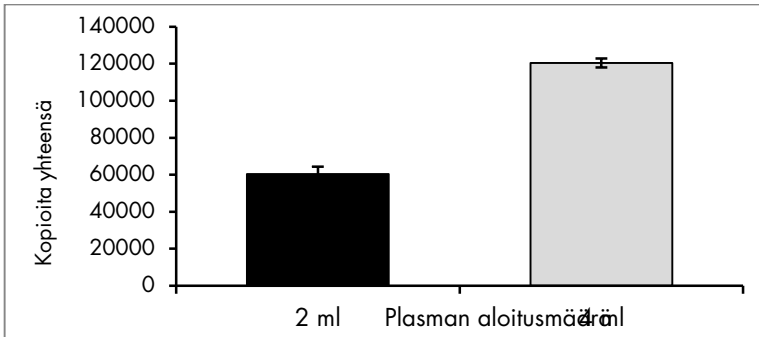
Taulukko 1. Tarkkuusarvioiden analysointi

Tarkkuus	CV (%)
Erän sisällä	11,67
Toistettavuus	13,14
Välitarkkuus	13,14

Tarkkuus	CV (%)
Kokonaistarkkuus	14,12

2 ml:n ja 4 ml:n protokollien vastaavat suorituskyvyt

2 ml:n ja 4 ml:n näytemäärien vastaavat protokollan suorituskyvyt arvioitiin QIASymphony DSP Circulating DNA Kit -tarvikesarjalle käyttämällä ihmisen EDTA-plasmapoolista saatua endogeenistä ccfDNA:ta. QIASymphony-ajoja tehtiin yhteensä 8 kappaletta; jokainen ajo tehtiin neljässä erässä käyttämällä 8 replikaattia erää kohti. 18S-koodaussekvenssille määritettiin QIASymphony DSP Circulating DNA Kit -tarvikesarjan toimenpiteen lineaarinen alue käyttämällä reaaliaikaista PCR-määrittystä paikan päällä (kuva 4). 2 ml:n ja 4 ml:n protokollien erojen suhde esitetään taulukossa 2. (Vertailuprotokollana toimi 4 ml:n näytemäärä.)



Kuva 4. 2 ml:n ja 4 ml:n näytemäärien protokollien vastaavat suorituskyvyt. ccfDNA-protokollan lineaarinen alue määritettiin käyttämällä 2 ml:n ja 4 ml:n protokollia. ccfDNA:n saanto määritettiin käyttämällä 18S-koodaussekvenssin reaaliaikaista PCR-määrittystä paikan päällä. Tulokset laskettiin kopioiden kokonaismääränä protokollaa kohti.

Taulukko 2. 2 ml:n ja 4 ml:n protokollien välinen ero (N = 256)

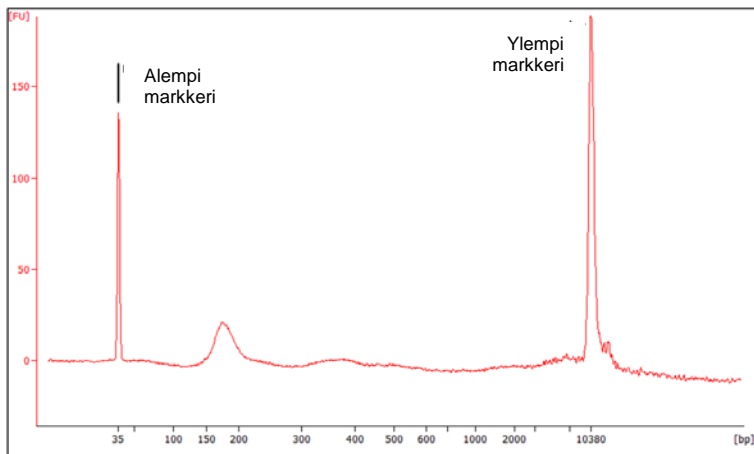
Parametri	Arvo
Geometrisen keskiarvon arvioitu suhde laskettuina kopioina / ml.	1,01
95 %:n luottamusvälin alaraja	0,92
95 %:n luottamusvälin yläraja	1,11

2 ml:n ja 4 ml:n näytemäärien protokollien suorituskyvyt olivat yhtäläiset kopioina millilitraa kohti.

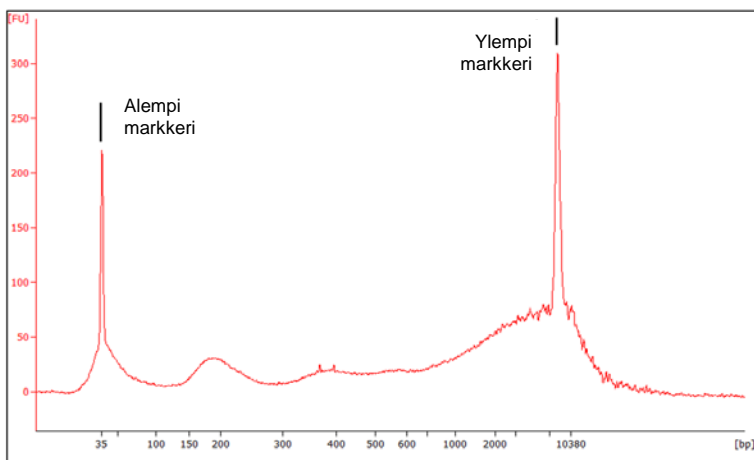
Kokojakauma

Jotta voitiin arvioida näytemäärän kokojakauma, 4 ml:n näytemäärästä otettiin ccfDNA:ta käyttämällä QIASymphony DSP Circulating DNA Kit -tarvikesarjaa, ja tämä ccfDNA eluoiitiin 75 µl:aan ja sitten 1 µl:aan eluaattia, ja sille tehtiin kokoanalyysi käyttämällä Agilent 2100 Bioanalyzer -analysointia ja Agilent High Sensitivity DNA Chip -DNA-sirua. Arvioinnissa suoritettiin yhteensä viisi itsenäistä replikaattia. Kuvassa 5 esitetään yksi edustavana esimerkkinä toimiva DNA-profiiliplasmalle ja kuvassa 6 vastaavasti stabiloidulle virtsalle.

Kuvassa 5 esitetyssä plasman elektroferogrammissa näkyy usein havaittu huippu noin 160 emäsparin kohdalla; tämän huipun koko on noin 145–196 emäsparia, mikä vastaa histoniin sidotun DNA:n pituusjakaumaa nukleosomissa. Kuvassa 6 esitetystä virtsan elektroferogrammista nähdään, että noin 160 emäsparin kohdalla oleva päähuippu on leveämpi, sillä sen koko on noin 145–250 emäsparia. Lisäksi virtsan tapauksessa nähdään toinen huippu, jonka koko on 20–100 emäsparia (alemman markkerin tasolla), mikä viittaa enemmän pirstaloituneeseen ccfDNA-jakeeseen. Lisäksi kuvassa 6 nähdään olevan suuri määrä pitkiä DNA-fragmenteja, joiden pituus alkaa noin 2 kiloemäksestä. Tällaisten genomien DNA-fragmenttien suuria määriä on usein virtsanäytteissä, mikä johtuu todennäköisesti genomien DNA:n vapautumisesta virtsassa olevista soluista.



Kuva 5. Plasmasta saadun ccfDNA:n kokojakauma (Bioanalyzer-profiili). ccfDNA saatiin 4 ml:sta EDTA-plasmaa käyttäen QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit -tarvikesarjaa; 1 µl:lle eluattia suoritettiin Agilent High Sensitivity DNA Chip -analyysi. X-akseli: emäsparin koko (bp); Y-akseli: fluoresenssiyksiköt (FU).

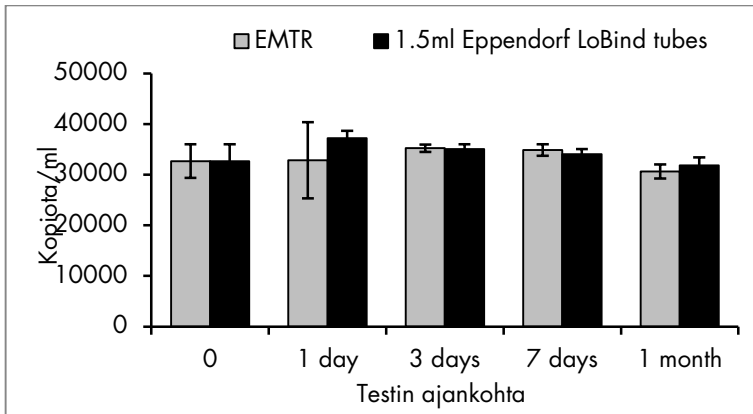


Kuva 6. Virtasta saadun ccfDNA:n kokojakauma (Bioanalyzer-profiili). ccfDNA saatiin 4 ml:sta stabiloitua virtsaa käyttäen QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit -tarvikesarjaa; 1 µl:lle eluattia suoritettiin Agilent High Sensitivity DNA Chip -analyysi. X-akseli: emäsparin koko (bp); Y-akseli: fluoresenssiyksiköt (FU).

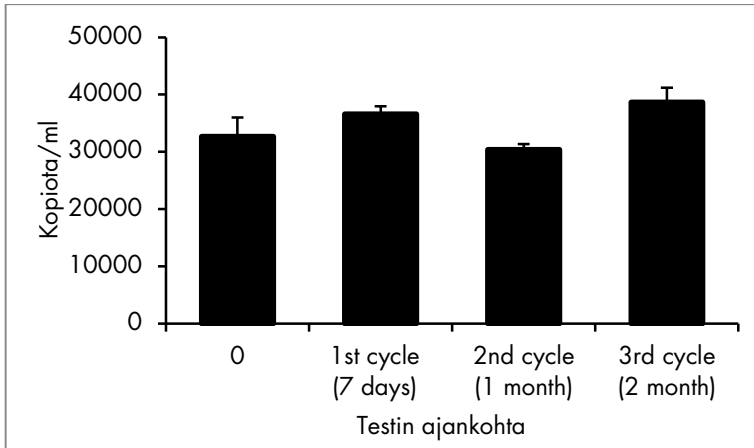
Eluaatin stabiilius

QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit -tarvikesarjan eluaatin stabiilius arvioitiin käyttämällä ihmisen EDTA-plasmapoolista saatua ccfDNA:ta. Eluaatteja säilytettiin kahdessa erilaisessa eluointilinjassa: QIAGEN EMTR (Elution Microtubes CL 96; tuotenro 19588) - eluointimikroputkissa ja 1,5 ml:n Eppendorf® LoBind Snap Cap Safe-Lock -putkissa. Eluaatit analysoitiin 8 replikaattina. Eluaattien DNA:n stabiilius määritettiin käyttämällä 18S-ribosomin RNA-koodaussekvenssille reaaliaikaista PCR-määrittystä paikan päällä.

Enintään kuukauden kestävä säilytys tai säilytystapa eivät vaikuttaneet eluaatin stabiiliuteen 2–8 °C:ssa (kuvat 7). –15 °C:ssa...–30 °C:ssa säilytys, johon kuului kolme jäädytys-latuskiertoa, ei heikentänyt LoBind-putkissa olevan DNA:n stabiiliutta 7 päivän, yhden ja kahden kuukauden säilytyksen jälkeen (kuva 8).



Kuva 7. 2–8 °C:ssa kahdenlaisessa putkessa säilytettyjen eluaattien ccfDNA:n stabiilius. ccfDNA saatiin EDTA-plasmasta käyttäen QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit -tarvikesarjaa, ja sitä säilytettiin 2–8 °C:ssa kaikkiin testiajankohtiin saakka. ccfDNA:n saanto määritettiin käyttämällä 18S-koodaussekvenssin reaaliaikaista PCR-määrittystä paikan päällä. Tulokset laskettiin kopioiden tavoitemääränä laitteeseen asetettua plasmanmillilitraa kohti.



Kuva 8. –15 °C:ssa...–30 °C:ssa säilytettyjen ja kolmelle jäädytys-sulatuskierrolle altistettujen eluattien ccfDNA:n stabiilius. ccfDNA saatiin EDTA-plasmasta käyttäen QIASymphony DSP Circulating DNA Kit -tarvikesarjaa, ja sitä säilytettiin –15 °C:ssa...–30 °C:ssa 1,5 ml:n Eppendorf LoBind -putkissa. ccfDNA:n saanto määritettiin kolmena testiajankohtana käyttäen samaa eluattia, jolle tehtiin kolme jäädytys-sulatuskiertoa. ccfDNA:n saanto määritettiin käyttämällä 18S-koodaussekvenssin reaaliaikaista PCR-määrittystä paikan päällä. Tulokset laskettiin kopioiden tavoitemääränä laitteeseen asetettua plasmamillilitraa kohti.

Katso päivitettyt lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet vastaavan QIAGEN-tarvikesarjan käsikirjasta tai käyttöoppaasta. QIAGEN-tarvikesarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat ovat saatavissa verkko-osoitteesta www.qiagen.com, ja ne voi myös tilata QIAGENin tekniseltä asiakaspalvelulta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Tavaramerkit: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIAsymphony[®] (QIAGEN Group); Eppendorf[®] (Eppendorf AG).

Tässä asiakirjassa mainittuja rekisteröityjä nimiä, tavaramerkkejä jne. on pidettävä lain suojaamina, vaikkei niitä olisi erityisesti sellaisiksi merkitty.

02/2017 HB-2309-D01-001

© 2017 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

