




Značilnosti

QIAamp® DSP Circulating NA Kit, različica 1 **REF** 61504

Upravljanje različice

  	Pred izvedbo preskusa preverite razpoložljivost novih revizij elektronskih oznak na strani www.qiagen.com pod številko izdelka in viri izdelka.
---	--

Splošni uvod

QIAamp DSP Circulating NA Kit je sistem, ki uporablja tehnologijo membrane na osnovi silicijevega dioksida (tehnologijo QIAamp) za izolacijo in čiščenje cirkulirajočega brezceličnega (circulating, cell-free, ccf) DNA in RNA iz vzorcev človeške krvne plazme.

Izdelek je namenjen za uporabo s strani profesionalnih uporabnikov, na primer tehnikov in zdravnikov, ki so usposobljeni za molekularno biološke tehnike.

QIAamp DSP Circulating NA Kit je namenjen za diagnostično uporabo in vitro.

Izkoristek očiščenih nukleinskih kislin (nucleic acids, NA)

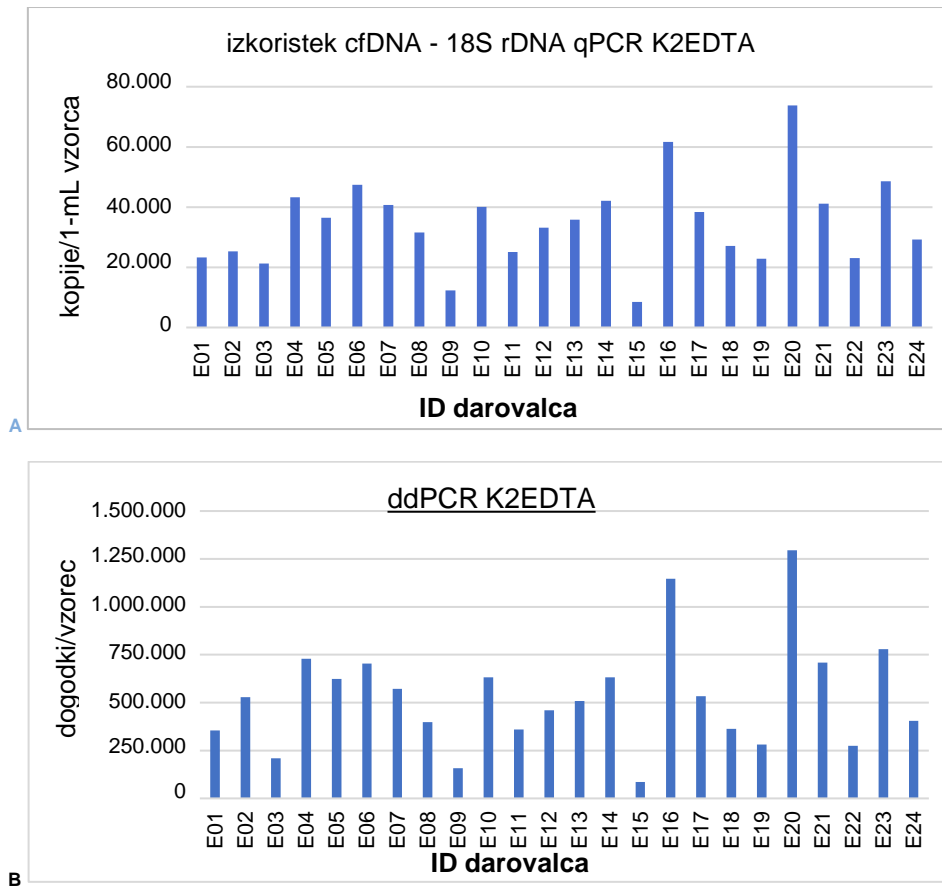
Vzorci plazme lahko kažejo veliko razliko v izkoristku očiščenih nukleinskih kislin. Zato bi morali uporabniki v svojem laboratoriju optimizirati vnos in elucijski volumen plazme za svoj specifični cilj in zaključni postopek.

Če boste komplet uporabljali v povezavi z zaključnim postopkom s kompletom znamke QIAGEN®, preberite navodila v zadevnem priročniku.

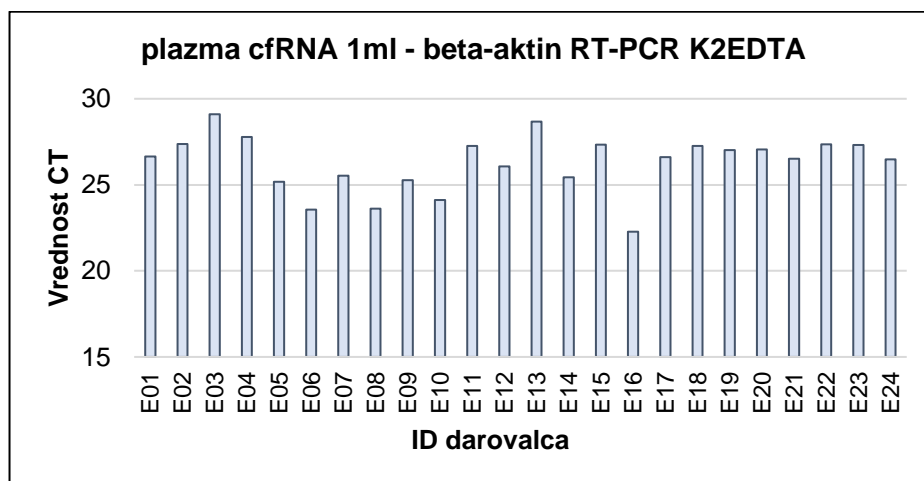
Analiza zaključnih postopkov

Nukleinske kisline, izolirane s kompletom QIAamp DSP Circulating NA Kit, so pripravljene za uporabo v različnih zaključnih postopkih. Za oceno uspešnosti smo izolirali nukleinske kisline iz človeške krvne plazme z enim darovalcem z uporabo treh različnih epruvet za odvzem krvi (BD Vacutainer® K2EDTA Tube, Becton Dickinson®; PAXgene® Blood ccfDNA Tube, PreAnalytiX; in Streck® Cell-Free DNA Blood Collection Tube (BCT)®, Streck; n = 24 darovalcev vsaka). Eluate iz 1 ml vnosa plazme smo preizkusili z uporabo kvantitativnega PCR (quantitative PCR, qPCR, Slika 1A), digitalnega kapljičnega PCR (digital droplet PCR, ddPCR, Slika 1B), ter z obratno

transkripcijo qPCR (reverse transcription qPCR, RT-qPCR) za RNA (samo plazma epruvete BD Vacutainer K2EDTA Tube, Slika 2).



Slika 1. Primerjava plazme posameznega darovalca (vnos 1 ml) med qPCR in ddPCR (Bio-Rad®)



Slika 2. Zaznavanje brezceličnega RNA v plazmi enega samega darovalca (vnos 1 ml) z uporabo analize za obratno transkripcijo qPCR za človeški gen beta-aktina (dolžina fragmenta 293 bp).

Za analizo sekvenciranja naslednje generacije (Next Generation Sequencing, NGS) so bili ustvarjeni eluati iz 5-ml vhodnega volumna plazme (epruvete BD Vacutainer K2EDTA Tube, PAXgene Blood ccfDNA Tube in Streck Cell-Free DNA BCT; n=8 darovalcev vsak). Skupni izkoristek DNA za 5-ml plazmo se je gibal med 50 ng do 150 ng DNA, zaznan z analizo Qubit® HS dsDNA. Analiza sekvenciranja naslednje generacije (Next Generation Sequencing, NGS) e bila izvedena z uporabo sistema GeneRead® QIAact Actionable Insights Tumor Panel in GeneReader™. Vsi vzorci so bili uspešno obogateni in ustvarjene so bile knjižnice. > 98 % ustvarjenih odčitkov je bilo preslikanih na človeški genom in > 99,8 % položajev v območij zanimanja je imelo bazno pokritost $\geq 500\times$.

Pri obeh vrstah nukleinskih kislin (DNA in RNA) je bila prikazana uspešna uporaba tehnologij zaključnih postopkov (Slika 3).

	qPCR	ddPCR	RT-qPCR	NGS
K2EDTA	✓	✓	✓	✓
PAXgene	✓	✓	ni preizkušeno	✓
Streck	✓	✓	ni preizkušeno	✓

Slika 3. Uspešna uporaba izoliranih nukleinskih kislin z različnimi zaključnimi postopki.

Uporabnik mora optimizirati vnos in elucijski volumen plazme za svoje ciljne molekule in vse nadaljnje postopke, uporabljene v svojem laboratoriju, ali pa se sklicevati na specifične lastnosti ustreznega zaključnega postopka.

Stabilnost eluata

Stabilnost eluata bo odvisna od vsebnosti in vrste izoliranih nukleinskih kislin, elucijskega volumna in pogojev shranjevanja. Priporočamo, da uporabniki določijo stabilnost eluata po potrebi, glede na svoje specifične potrebe.

Stabilnost eluata je bila preizkušena za DNA in eluate, pridobljene iz človeške plazme, ustvarjene iz epruvete BD Vacutainer K2EDTA Tube (Becton Dickinson) in stabilizacijskih epruvet za odvzem krvi (PAXgene Blood ccfDNA Tube in Streck Cell-Free DNA BCT). Eluati so bili shranjeni pri -30 do -15 °C in -90 do -60 °C. Do 4 tedne ni bilo opaziti poslabšanja. Eluati, shranjeni pri 2 do 8 °C in pri sobni temperaturi (18 do 25 °C), so bili stabilni do 48 ur. Vsi pogoji so bili ocenjeni z uporabo qPCR, usmerjenega na človeški gen 18S rDNA.

Stabilnost eluata je bila preizkušena za RNA in eluate, pridobljene z človeške plazme, ustvarjene iz epruvete BD Vacutainer K2EDTA Tubes (Becton Dickinson). Eluati so bili shranjeni pri -30 do -15 °C in -90 do -60 °C. Do 4 tedne ni bilo opaziti poslabšanja. Eluati so bili shranjeni pri 2 do 8 °C in pri sobni temperaturi (18 do 25 °C) in so bili stabilni do 48 ur. Vsi pogoji so bili ocenjeni z uporabo RT-qPCR, usmerjenega na človeški gen beta-aktina.

Če boste komplet uporabljali v povezavi z zaključnimi postopki s kompletom znamke QIAGEN, preberite navodila v priročniku za zadevni komplet.

Natančnost izolacije NA

Natančnost je bila ocenjena s pomočjo človeške plazme, pogoji pa so bili ocenjeni z uporabo qPCR, usmerjenega na človeški gen 18S rDNA.

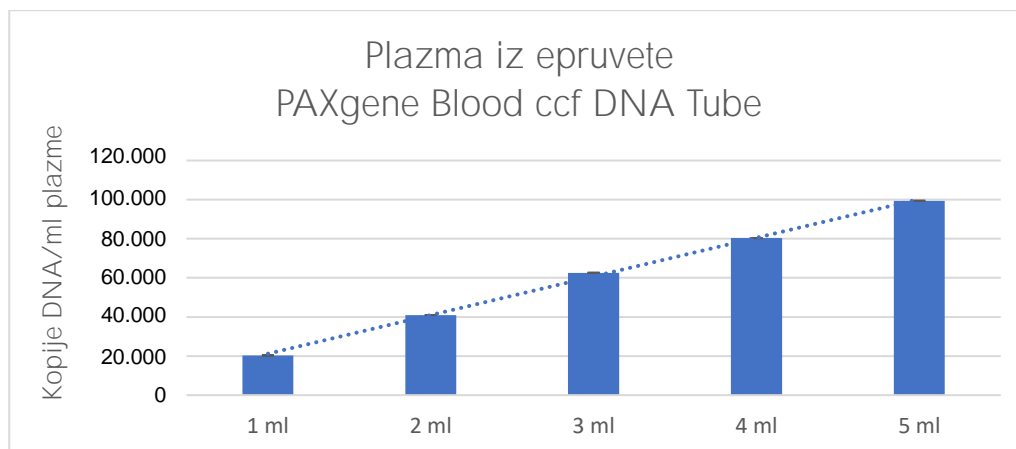
Eksperiment je obsegal 12 postopkov čiščenja z 12 ponovitvami vsak (skupaj 144 čiščenj). Postopki čiščenja so bile organizirani s tremi različnimi operaterji v treh različnih dneh s tremi različnimi instrumenti z uporabo treh različnih serij kompleta QIAamp DSP Circulating NA Kit. Standardni odklon (standard deviation, SD) in koeficient variacije (coefficient of variation, CV) sta bila določena za vsak posamezen parameter in za splošno spremenljivost (skupno) kompleta QIAamp DSP Circulating NA Kit. (Preglednica 1).

Preglednica 1. Natančnost rezultatov

Natančnost			
Parameter	Povprečne kopije/ml	SD	CV (%)
Od postopka do postopka	25894	1392	1,78
Od operaterja do operaterja		228	5,36
Od instrumenta do instrumenta		2095	0,88
Od dneva do dneva		968	8,09
Od serije do serije		2429	3,74
Skupaj		3120	12,05

Linearnost

Podatki so bili ustvarjeni za vnos od 1 do 5 ml vhodnega volumna plazme iz krvi, shranjene v epruveh BD Vacutainer K2EDTA Tubes, PAXgene Blood ccfDNA Tubes, in Streck Cell-Free DNA BCT. Pri vseh BCT je bilo opaženo linearno povečanje izkoristka DNA (glejte Slika 4); pri epruveh BD Vacutainer K2EDTA Tubes, je to veljalo tudi za RNA.



Slika 4. Linearno povečanje skupnega izkoristka DNA (kopije DNA/ml vhodne plazma) za različne vhodne volumne plazme. Prikazani podatki za plazmo, pridobljeno iz epruveh PAXgene Blood ccfDNA Tube so enakovredni rezultatom za plazmo, pridobljeno iz epruveh BD Vacutainer K2EDTA Tube (DNA/RNA) in Streck Cell-Free DNA BCT.

Ekvivalenca protokolov (Breeze/klasični protokoli)

Ekvivalenca učinkovitosti med Breeze protokolom in klasičnim protokolom je bila določena s prikazom, da je bila ustrezna 95-% razlika intervala zaupanja v povprečni vrednosti Ct (RNA) ali povprečnih kopijah/ml (DNA) znotraj $\pm 2 \times \text{SD}$, pri čemer je SD bil opažena natančnost klasičnega protokola (referenčni pogoj). Uporabljeni so bili trije kompleti serije in trije operaterji, ki so izvajali eksperimente.

Skupna natančnost (SD) vrednosti Ct, ustvarjenih za Breeze protokol, je bila nižja od zgornje meje dvostranskega 95-% intervala napovedi za skupno natančnost (SD) klasičnega protokola, pri čemer je bil interval napovedi izračunan v okviru študije z uporabo podatkov iz klasičnega protokola (n =143) in z uporabo števila podatkovnih točk za Breeze protokol (n =144) v študiji.

Moteče snovi

Potencialno moteče snovi lahko izvirajo iz različnih virov, npr. naravni presnovki, snovi, vnesene med zdravljenjem bolnika, ali snovi, ki jih bolnik zaužije. Za komplet QIAamp DSP Circulating NA Kit so bili hemoglobin, trigliceridi, EDTA, kofein, albumin, konjugirani bilirubin in nekonjugirani bilirubin preizkušeni kot endogene komponente. Pri uporabi qPCR kot zaključnim postopkom ni bilo najdenih nobenih motenj. Poleg tega med obdelavo vzorca in ekstrakcijo nukleinske kisline ni bilo opaziti motenj, ki bi izhajale iz komponent kompleta QIAamp DSP Circulating NA Kit (proteinaza K, Buffer ACL, Buffer ACB, Buffer ACW1, Buffer ACW2 in etanol).

Zaradi kompleksnosti možnih motečih snovi in različne občutljivosti posameznih zaključnih postopkov priporočamo, da uporabniki ocenijo vpliv motečih snovi, ki so specifične za njihov potek dela in validirajo metodo nadzora motenj v njihovem specifičnem zaključnem postopku.

Za več informacij o motečih snoveh v specifičnih zaključnih postopkih QIAGEN® glejte priročnike kompleta.

Navzkrižno onesnaženje

Za oceno stopnje navzkrižnega onesnaženja je bilo 10^5 kopij virusa HBV nabrizganih v 5 ml ali 2 ml človeške krvne plazme (pozitivni vzorci): Ti vzorci so bili izolirani poleg vzorcev, ki ne vsebujejo virusov (negativni vzorci), v postavitvi šahovnice, ki se izmenjuje pri postopkih ekstrakcije, ki vsebujejo samo negativne vzorce (za oceno navzkrižnega onesnaženja v in med postopkom ekstrakcije). Namen študije je bil posnemati stanje, ko vzorci, ki vsebujejo visoko stopnjo ciljnih molekul nukleinske kisline, med postopkom ekstrakcije lahko navzkrižno kontaminirajo druge vzorce. Čiščenje NA je bilo izvedeno z uporabo ene serije reagentov. Navzkrižno onesnaženje je bilo ocenjeno z uporabo kompleta *artus*® HBV RG CE PCR Kit. Rezultati so pokazali, da v nobenem delu sistema ni prišlo do navzkrižnega onesnaženja.

Opombe

Zgodovina revizij

Datum	Spremembe
R1 09/2019	Začetna izdaja

Posodobljene informacije o licenciranju in zavrnitve odgovornosti za izdelek so na voljo v priročniku ali navodilih za uporabo zadevnega kompleta znamke QIAGEN. Priročniki in navodila za uporabo kompletov znamke QIAGEN so na voljo na spletni strani **www.qiagen.com**, lahko pa jih tudi naročite pri Oddelku za tehnične storitve družbe QIAGEN ali lokalnem distributerju.

Blagovne znamke: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, artus®, GeneRead®, GeneReader™ (QIAGEN Group); BD Vacutainer®, Becton Dickinson® (Becton Dickinson and Co.); Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); PAXgene® (Preanalytix GmbH); Streck®, Cell-Free DNA BCT® (Streck Inc.); Qubit® (Thermo Fisher Scientific ali njegove podružnice).

HB-0466-D01© 2019 QIAGEN, vse pravice pridržane.

