



2022 年 6 月

QIAsymphony[®] DSP Circulating DNA Kit 使用説明書 (性能特性)

バージョン 2

IVD

体外診断用医薬品

QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit 専用

CE

REF

937556



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ドイツ

R1

オンライン利用可能な性能特性は、www.qiagen.com の製品ページのリソースタブにあります。

導入・一般事項

QIAsymphony DSP Circulating DNA システムは、すぐに使用できる in vitro システムを構成し、ヒト血漿と尿から循環無細胞 DNA (circulating cell-free DNA、ccfDNA) を定性的に精製します。

QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit は、QIAsymphony SP 機器でのみの使用を目的としています。

QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit は、広範囲のヒト血漿タイプ (Streck®の無細胞 DNA BCT® など ccfDNA プロファイル安定剤を使用、EDTA チューブなどの ccfDNA プロファイル安定剤を非使用) とヒト尿 (ccfDNA プロファイル安定剤を使用または非使用) から ccfDNA を完全自動化同時精製する試薬を提供します。ただし、すべての血液採取チューブの性能特性が確立されているわけではなく、ユーザーが検証する必要があります。

精製した ccfDNA は、PCR 化学、蛍光ベースの定量アッセイ、NGS などの幅広いダウンストリームアプリケーションに対応しています。

QIAsymphony SP は、精製手順のすべてのステップを実行します。1 回のランで、24 バッチ、最大 96 個のサンプルを処理できます。尿サンプルには、手動のサンプル前処理が必要な場合があります。

注釈：性能特性は、さまざまな要因に大きく依存し、特定のダウンストリームアプリケーションに関連しています。これは、典型的なダウンストリームアプリケーションと組み合わせて QS DSP Circulating DNA Kit 用に確立されています。しかし、生物学的検体から核酸を分離する方法は、複数のダウンストリームアプリケーションの初期段階として使用され、性能パラメーター、例えば、クロスコンタミネーション、ラン精度は、ダウンストリームアプリケーション開発の一環としてこのようなワークフローに対して確立する必要があります。したがって、ワークフロー全体を検証して適切な性能パラメータを確立するのはユーザーの責任です。

基本的な性能

QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit の基本的性能は、48 人の単一ドナーを使用して、Streck 血漿 4 ml と安定化尿 4 ml から ccfDNA を抽出して評価しました。ccfDNA の収量は、18S リボソーム RNA コード配列に対する社内 real-time PCR アッセイで測定しました。

図 1 (血漿 4 ml) と図 2 (尿 4 ml) の収量 (\log_{10} コピー/ml) の差は、それぞれのサンプル材料の同じ量で一般的に認められる ccfDNA の強力なドナー依存濃度を反映しています。

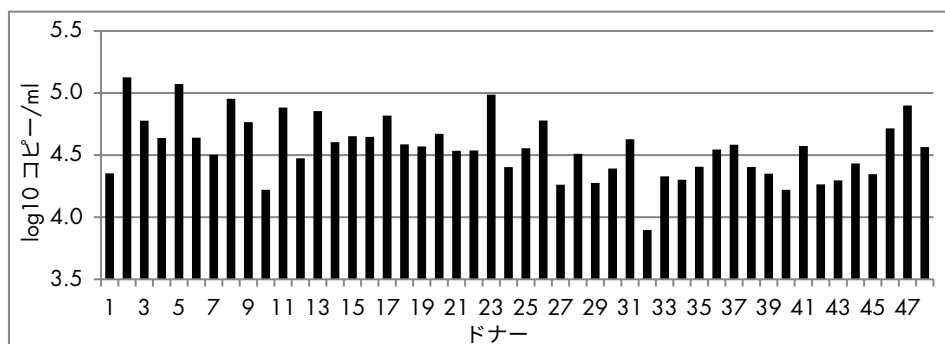


図 1. 48 単一ドナーの血漿からの ccfDNA 収量。48 単一ドナーから、Cell-Free DNA BCT (Streck) を用いて採血しました。QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit を使用して、血漿 4 ml から ccfDNA を抽出しました。18S コード配列に社内 real-time PCR アッセイを使用して、CcfDNA の収量を定量しました。結果は、血漿インプット 1 ml あたりの標的コピーとして計算しました。

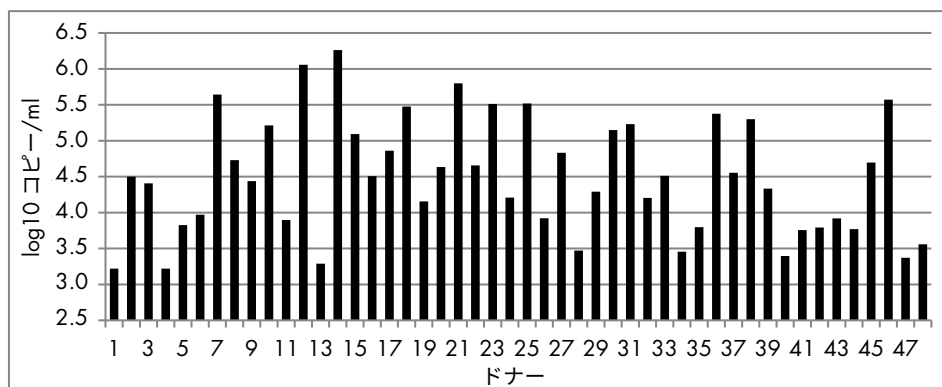


図 2.48 単一ドナーの尿からの cfDNA 収量 48 単一ドナーから採取した尿を、Cell-Free DNA Urine Preserve® (Streck) を使用して安定化しました。QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit を使用して、尿 4 ml から cfDNA を抽出しました。18S コード配列に社内 real-time PCR アッセイを使用して、cfDNA の収量を定量しました。尿インプット 1 ml あたりの目標コピー数として結果を計算しました。

ラン精度

EDTA 血漿からヒト cfDNA を抽出するために、変動係数 (Coefficients of Variations、CV) を決定しました。正確な分析を行うために、18S リボソームコード配列に社内 real-time PCR アッセイを使用して cfDNA を定量しました。合計で、4 つのバッチでそれぞれ 10 回、QIAAsymphony をランしました (1 バッチあたり 8 レプリケート)。精度データを表 1 に示します。

表 1. 精度推定値の分析

精度	CV (%)
バッチ内	11.67
反復性	13.14
中精度	13.14
全精度	14.12

同等の性能の 2 ml および 4 ml プロトコール

ヒト EDTA 血漿プールから抽出した内因性 cfDNA を使用して、QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit で、2 ml サンプルおよび 4 ml サンプルインプットに対するプロトコールの性能の同等性を評価しました。合計では、4 バッチそれぞれに対して 1 バッチあたり 8 レプリケートを用いて、8 回、独立した QIAAsymphony ランを行いました。QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit 手順の直線範囲は、社内 real-time PCR アッセイを使用して 18S コード配列に対して決定しました (図 3)。2 ml プロトコールと 4 ml プロトコールの差の比率を表 2 に示します (参照プロトコールは 4 ml サンプルインプット)。

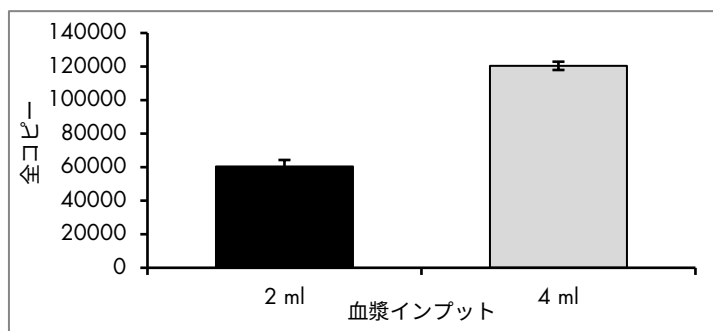


図 3. 2 ml および 4 ml のサンプルインプットプロトコルを使用する同等の性能。ccfDNA プロトコルの直線範囲は、2 ml および 4 ml プロトコルを使用して決定しました。ccfDNA の収量は、18S コード配列に社内 real-time PCR アッセイを使用して定量しました。結果は、プロトコルごとの全コピー数として計算しました。

表 2. 2 ml および 4 ml プロトコルの差 (N=256)

パラメーター	値
コピー/ml 計算値の幾何平均の推定比	1.01
95%信頼限界の下限	0.92
95%信頼限界の上限	1.11
全精度	14.12

1 ml あたりのコピー数計算値で測定した、2 ml と 4 ml のサンプルインプットに対するプロトコルの性能は同等です。

サイズ分布

サンプルアウトプットのサイズ分布を評価するには、QIASymphony DSP Circulating DNA Kit を使用して 4 ml のサンプルインプットから ccfDNA を抽出し、75 μ l で溶出した後、Agilent High Sensitivity DNA Chip を用いて、溶出液 1 μ l を Agilent® 2100 Bioanalyzer でサイズ分析しました。合計 5 つの独立したレプリケートを実行しました。図 4 に血漿、図 5 に尿の代表的な DNA プロファイルを 1 つ示します。

図 4 の血漿のエレクトロフェログラムは、ヌクレオソームのヒストン結合 DNA の長さの範囲である 145~196 bp の約 165 bp で頻繁に観察されるピークを示しています。図 5 の尿のエレクトロフェログラムは、約 160 bp に主要ピークがあり、約 145~250 bp の範囲です。さらに、尿では、約 20~100 bp 範囲に第 2 ピーク（低いマーカーピークのレベル）が存在します。これは、断片化程度が高い ccfDNA 画分を示しています。さらに、図 5 は、約 2 kb の多数の長い DNA フラグメントを示しています。このようなゲノム DNA フラグメントが大量に尿サンプルに見られるのは、尿中に存在する細胞からのゲノム DNA 放出に起因する可能性が最も高いと思われます。

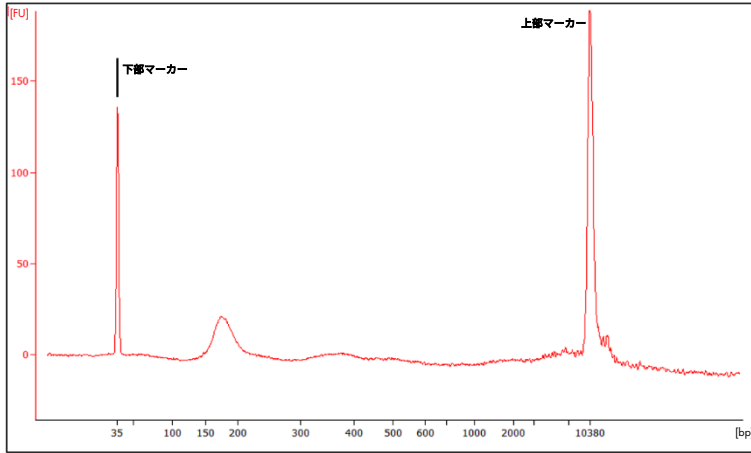


図 4. 血漿由来 cfDNA のサイズ分布 (バイオアナライザープロファイル) QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit を使用して、EDTA 血漿 4 ml から cfDNA を抽出しました。溶出液 1 μ l を Agilent High Sensitivity DNA Chip 分析に供しました。x 軸：塩基対サイズ (base pair、bp)、y 軸：蛍光単位 (Fluorescence Units、FU)。

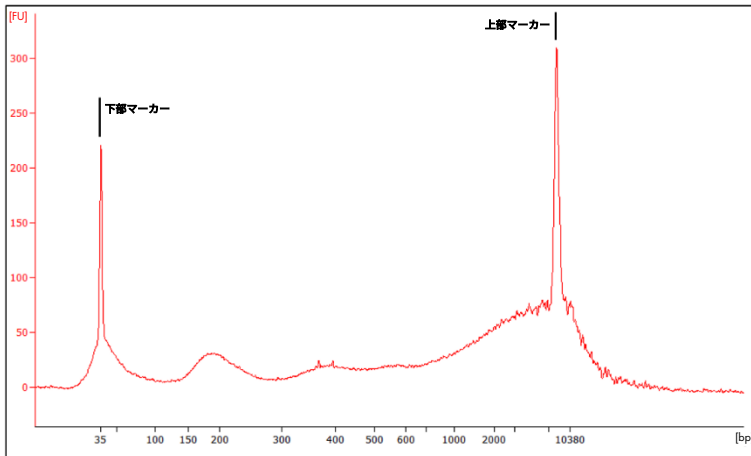


図 5. 尿由来 cfDNA のサイズ分布 (バイオアナライザープロファイル) QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit を使用して、尿 4 ml から cfDNA を抽出しました。溶出液 1 μ l を Agilent High Sensitivity DNA Chip 分析に供しました。x 軸：塩基対サイズ (base pair、bp)、y 軸：蛍光単位 (Fluorescence Units、FU)。

溶出の安定性

ヒト EDTA 血漿プールから抽出した cfDNA を使用して、QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit の溶出液安定性を評価しました。溶出液を 2 つの異なる溶出ラックフォーマットで保存しました。QIAGEN® EMTR (Elution Microtubes CL 96、カタログ番号 19588) と 1.5 ml Eppendorf® LoBind® Snap Cap Safe-Lock チューブです。溶出液の 8 レプリケートを分析しました。溶出液中の DNA の安定性は、18S リボソーム RNA コード配列に対する社内 real-time PCR アッセイで測定しました。

2~8°C では溶出液の安定性は、最長 1 カ月の保存期間、または保存フォーマットの影響を受けませんでした (図 6)。LoBind チューブ内の DNA の安定性は、-15°C~-30°C での保存の影響を受けませんでした。これには、7 日後、1 ヶ月後、2 カ月後の 3 回の凍結融解サイクルが含まれます (図 7)。

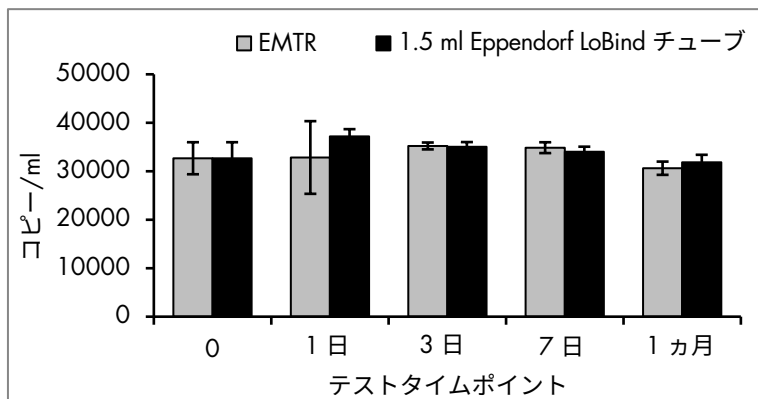


図 6. 2つのチューブフォーマットで2~8°Cで保存した溶出液中の cfDNA の安定性。QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit を使用して EDTA 血漿から cfDNA を抽出し、さまざまなテストタイムポイントで2~8°Cで保存しました。cfDNA の収量は、18S コード配列に社内 real-time PCR アッセイを使用して定量しました。結果は、血漿インプット 1 ml あたりの目標コピー数として計算しました。

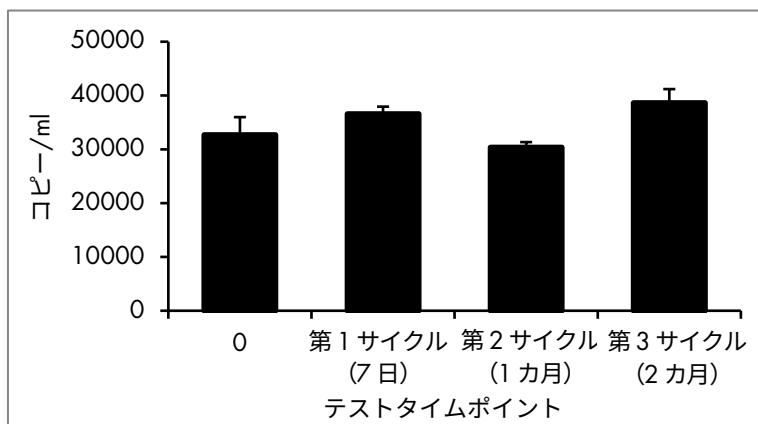


図 7. -15°C~-30°C で保存した溶出液中の cfDNA の安定性 (3 回の凍結融解サイクルを含む)。QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit を使用して EDTA 血漿から cfDNA を抽出し、1.5 ml Eppendorf LoBind チューブに-15°C~-30°C で保存しました。cfDNA の収量は、3 回の凍結融解サイクルで、同じ溶出液を使用して 3 テストタイムポイントで測定しました。cfDNA の収量は、18S コード配列に社内 real-time PCR アッセイを使用して定量しました。結果は、血漿インプット 1 ml あたりの標的コピーとして計算しました。

妨害物質

ヒト血漿と尿にさまざまな潜在的妨害物質をスパイクして（表 3 参照）、QS DSP Circulating DNA Kit の ccfDNA 抽出性能に対する影響とその後の典型的なダウンストリームアッセイとの適合性をテストしました。溶出液は、18S コード配列に対する社内 real-time PCR と、高感度 dsDNA アッセイを使用する Qubit® フルオロメーターで分析しました。

表 3. 潜在的妨害物質の試験濃度

妨害物質	血漿	尿
ビリルビン	200 mg/L*	200 mg/L*
ヘモグロビン	2 g/L†	-
BSA とガンマグロブリン	最大 120 g/L*	1 g/L†
トリグリセリド	5 g/L*	-
グルコース	10 g/L*	10 g/L*
血液	-	1%†
pH	-	pH 4 および pH 9†

* CLSI EP7-A2 Vol. 25 No. 27

† FDA ドラフトガイダンス (11.05.2011)

高濃度のガンマグロブリン (> 30 g/L) を含む血漿サンプルに循環無細胞 DNA の回収率を低下させる可能性があることを除いて、表 3 に記載する物質はいずれも妨害物質ではありません。

注釈: 抽出した核酸の品質の評価に典型的なダウンストリームアプリケーションを使用して試験を行いました。ただし、ダウンストリームアプリケーションが異なれば、純度に関して要件も異なる可能性があるため（つまり、潜在的妨害物質が存在しない）、QIAsymphony DSP Circulating DNA kit が関与するワークフローのダウンストリームアプリケーション開発の一環として、関連物質の同定とテストも確立する必要があります。

クロスコンタミネーション

QIAsymphony DSP Circulating DNA システムのクロスコンタミネーションリスクは、交互チェッカーボードバッチ（陽性サンプルと陰性サンプルを交互）を用いて QIAsymphony SP 機器で、96 サンプルを 3 回ランして分析しました。モデルシステムのサンプル材料として、雌血漿（陰性サンプル）と血漿 1 ml あたり SRY1 遺伝子 1.0E+05 コピー濃度の剪断した雄の gDNA をスパイクした雌血漿（陽性サンプル）を使用しました。各 2 ml 容量の 2 つの別々のサンプル移動を含む 4 ml プロトコールを使用してサンプル調製を行いました。抽出実行中の陰性雌血漿サンプルの潜在的コンタミネーションは、Y 染色体特異的遺伝子 SRY1 に real-time PCR を使用する溶出液のその後の分析によって評価しました。

サンプルからサンプル、バッチからバッチ、またはランからランへのキャリーオーバーに、クロスコンタミネーションは検出されませんでした。

さまざまなダウンストリームアプリケーションへの適合性

QIAsymphony DSP Circulating DNA kit 開発中に、典型的なダウンストリームアプリケーションを利用して、分離した核酸が、Real Time-PCR (図 1、図 2、図 3、図 6、図 7 参照)、Qubit フルオロメーター (タンパク質アッセイおよび高感度 dsDNA アッセイ)、ライブラリー (図 8 参照)、次世代シーケンシング (Next Generation Sequencing、NGS) を含む広範囲なさまざまなダウンストリームアプリケーション技術に適合することを証明しました。

図 8 のエレクトロフェログラムは、アダプターのライゲーションとそれに続く ccfDNA の増幅の成功例を示しています。ヌクレオソーム ccfDNA の 300 bp の顕著なピーク (各アダプターに対し、約 165 + 約 70 bp) の隣に、約 470 bp にジヌクレオソームピークも見えます。

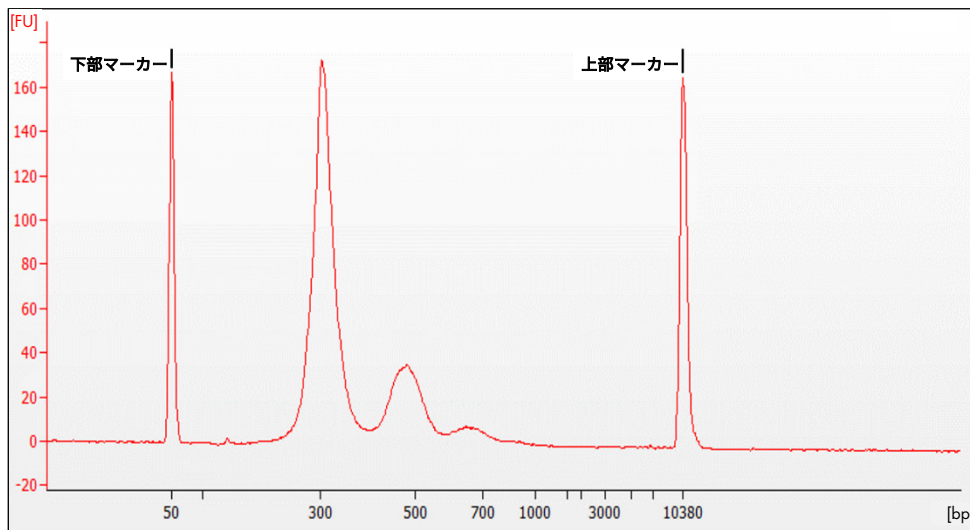


図 8. QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit で抽出した ccfDNA (シングルドナー) の DNA ライブラリー。4 ml プロトコールを使用して Streck 血漿から ccfDNA を抽出し、続いて溶出液 35 μ l を NEBNext[®] Ultra DNA Library Prep Kit (BioLabs) に移しました。増幅と AMPure XP クリーンアップ後、溶出液 1 μ l を Agilent 7500 DNA Kit で分析しました。

図記号

使用説明書やパッケージとラベルには、次の図記号が表示されます。

図記号	図記号の定義
 Σ <N>	<N>回の反応に必要な試薬が含まれます。
	使用者
	この製品は、体外診断用医療機器に関する欧州規制 2017/746 の要件を満たしています。
	体外診断用医療機器
	カタログ番号
	ロット番号
	資材番号（コンポーネントのラベル）
	コンポーネント
	含有物質
	番号
	グローバルトレードアイテム番号
Rn	R は使用説明書の改訂を示し、n は改訂番号を示す。
	温度制限
	製造者
	製品説明書を参照
	警告／注意
	プロテイナーゼ K
	ウェル番号（試薬カートリッジウェル）
	試薬カートリッジ
	アジ化ナトリウム

図記号

図記号の定義

EtOH	エタノール
UDI	独自のデバイス識別子

改訂履歴

改訂	説明
R1、2022年6月	バージョン 2、改訂 1 <ul style="list-style-type: none">IVDR に準拠するためにバージョン 2 に更新妨害物質、クロスコンタミネーション、およびダウンストリームアプリケーションとの適合に関するセクションが追加されました

最新のライセンス情報と製品固有の免責事項については、該当する QIAGEN キットハンドブックまたはユーザーマニュアルを参照してください。QIAGEN Kit ハンドブックとユーザーマニュアルは、弊社ウェブサイト (www.qiagen.com) から入手できます。QIAGEN テクニカルサービスや最寄りの代理店からも入手可能です。

商標：QIAGEN[®], Sample to Insight[®](QIAGEN Group); Cell-Free DNA Urine Preserve[®], Cell-Free DNA BCT[®], Streck[®] (Streck); Agilent[®], Bioanalyzer[®] (Agilent Technologies, Inc.); Eppendorf[®], LoBind[®] (Eppendorf AG); NEBNext[®] (New England Biolabs, Inc.); Qubit[®] (Thermo Fisher Scientific or its subsidiaries). 本文書で使用している登録済みの名称、商標などは、具体的な表示がない場合でも法的保護の対象からは外れません。

HB-3034-D01-001 © 2022 QIAGEN, all rights reserved.

このページは意図的に空白のままにしています

