

# QIAamp<sup>®</sup> DSP Circulating NA Kit

## 使用説明書（性能特性）

バージョン 2



体外診断用医薬品

QIAamp DSP Circulating NA Kit 専用



61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Germany

R1

性能特性は電子的に利用可能であり、[www.qiagen.com](http://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

QIAamp DSP Circulating NA Kit は、シリカ膜技術（QIAamp テクノロジー）を使って、ヒト血漿サンプルから循環、無細胞（circulating, cell-free, ccf）DNA および RNA を手動で分離、精製するシステムです。

この製品は、分子生物学技術について訓練を受けた技師や医師などのプロフェッショナルな使用者向けのものであります。

QIAamp DSP Circulating NA Kit は体外診断用です。

## 精製核酸（Nucleic Acid, NA）の収率

血漿サンプルでは、精製核酸の収率のばらつきが大きくなる可能性があります。そのため、実験室で特定のターゲットやダウンストリームアプリケーション用に血漿のインプットや溶出量を最適化する必要があります。

このキットを QIAGEN® ダウンストリームアプリケーションと組み合わせて使用する場合、関係するハンドブックを参照してください。

## ダウンストリームアプリケーションの解析

QIAamp DSP Circulating NA Kit で分離した核酸は、すでに様々なダウンストリームアプリケーションで使える状態になっています。性能評価のため、ヒトシングルドナー血漿から、3 種類の血液採取チューブ (BD Vacutainer® K2EDTA Tube、Becton Dickinson and Company; PAXgene® Blood ccfDNA Tube、PreAnalytiX GmbH; Streck® Cell-Free DNA Blood Collection Tube (BCT) ®、Streck; 各々ドナー n=24) を使用して核酸を分離しました。血漿インプット 1 ml からの溶出液を、定量 PCR (quantitative PCR, qPCR、図 1A)、デジタルドロップレット PCR (digital droplet PCR, ddPCR、図 1B)、ならびに逆転写 qPCR (reverse transcription qPCR, RT-qPCR) を用いて、RNA について検査しました (BD Vacutainer K2EDTA Tube 血漿のみ、図 2)。

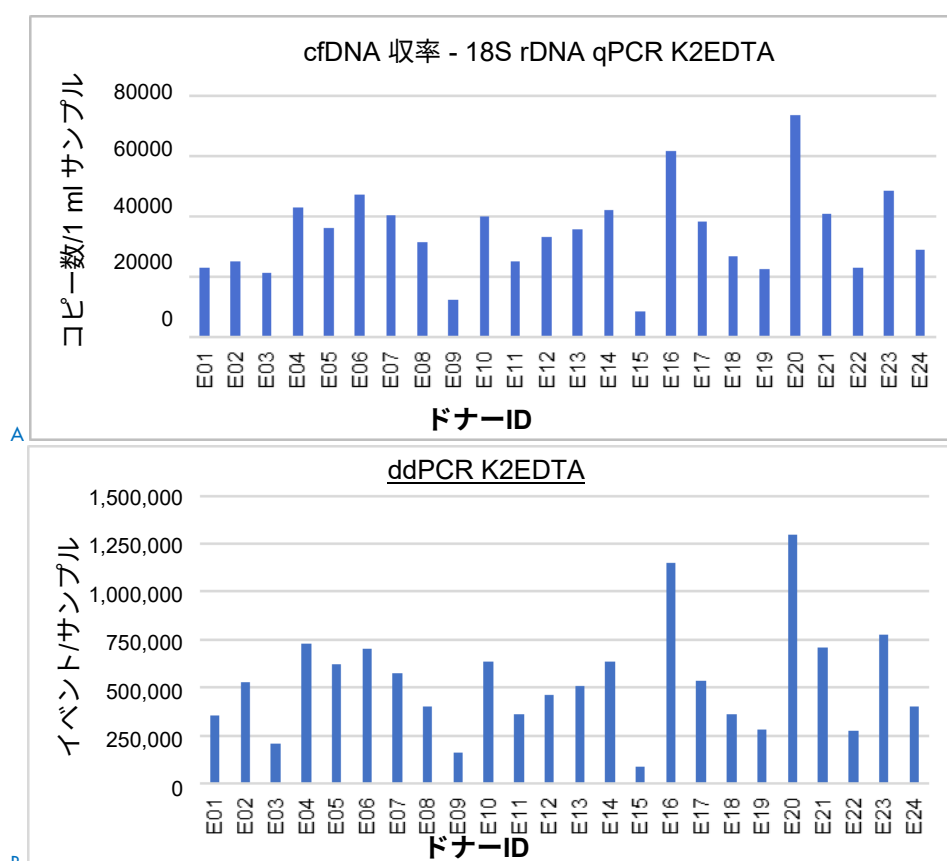


図 1. シングルドナー血漿 (1 ml インプット) について、qPCR と ddPCR (Bio-Rad®) 間の比較

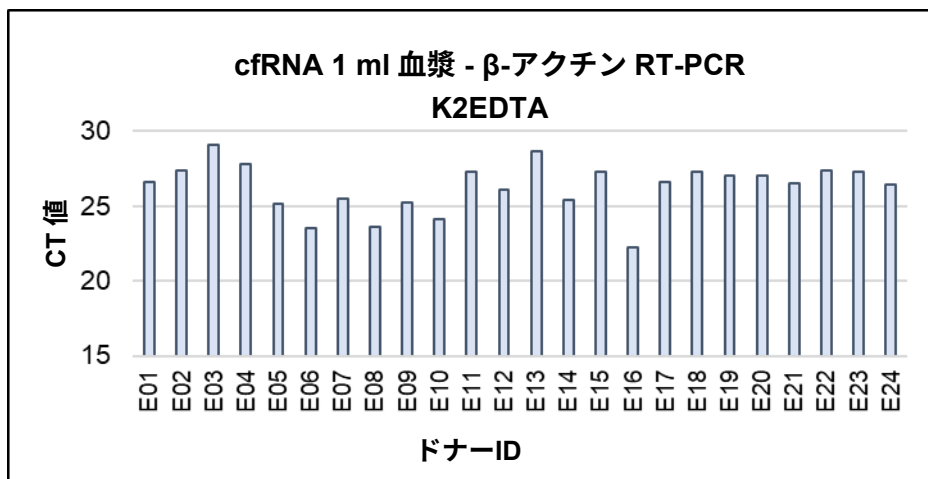


図 2. ヒトβ-アクチン遺伝子 (293 bp 断片長) について、RT-qPCR アッセイを用いた、シングルドナー血漿 (1 ml インプット) 中のセルフリーRNA の検出。

次世代シーケンシング (Next-Generation Sequencing, NGS) 解析用に、5 ml 血漿インプットからの溶出液 (BD Vacutainer K2EDTA Tube、PAXgene Blood ccfDNA Tube、および Streck Cell-Free DNA BCT、各々ドナー  $n=8$ ) を生成しました。5 ml 血漿の DNA の合計収量は、Qubit® HS dsDNA アッセイによる検出では 50 ng~150 ng でした。NGS 解析は、GeneRead® QIAAct Actionable Insights Tumor Panel と GeneReader® システムを用いて実施しました。すべてのサンプルは濃縮に成功し、ライブラリを作成しました。得られたリードの 98% 超がヒトゲノムにマップされ、対象領域の 99.8% 超の位置が 500x 以上の塩基カバレッジでした。

いずれの種類のコア酸 (DNA と RNA) でもダウンストリーム技術の適用に成功しました (図 3)。

	qPCR	ddPCR	RT-qPCR	NGS
K2EDTA	✓	✓	✓	✓
PAXgene	✓	✓	未検査	✓
Streck	✓	✓	未検査	✓

図 3. 異なるダウンストリームアプリケーションで分離した核酸の有効活用。

ユーザーは、対象分子用の血漿インプットと溶出量、また実験室で採用する以降の手順を最適化するか、関連するダウンストリームアプリケーションの具体的な性能を参照する必要があります。

## 溶出液の安定性

溶出液の安定性は、分離する核酸の含有量と種類、溶出量、保存条件に左右されます。溶出液の安定性は、ユーザーが特定の要件に応じて適宜設定することを推奨します。

溶出液の安定性は、BD Vacutainer K2EDTA Tube (Becton Dickinson and Company) および安定化剤入り血液採取チューブ (PAXgene Blood ccfDNA Tube および Streck Cell-Free DNA BCT) から得られたヒト血漿由来の DNA と溶出液について検査しました。溶出液は、-30°C~-15°C、-90°C~-65°Cで保存しました。最長 12 か月間、劣化は認められませんでした。2~8°Cおよび室温 (15~25°C) で保存した溶出液は、最長 48 時間安定していました。ヒト 18S rDNA 遺伝子をターゲットとした qPCR で、すべての条件を評価しました。

溶出液の安定性は、BD Vacutainer K2EDTA Tubes (Becton Dickinson and Company) から得られたヒト血漿由来の RNA と溶出液について検査しました。溶出液は、-30°C~-15°C、-90°C~-65°Cで保存しました。最長 6 か月間、劣化は認められませんでした。2~8°Cで保存した溶出液は、最長 48 時間安定していました。ヒトβ-アクチン遺伝子をターゲットとした RT-qPCR を使用して、すべての条件を評価しました。

このキットを QIAGEN ダウンストリームアプリケーションと組み合わせて使用する場合は、該当するキットのハンドブックを参照してください。

## NA 分離の精度

ヒト血漿を用いて精度を評価し、ヒト 18S rDNA 遺伝子をターゲットとした qPCR で条件を評価しました。

実験設定は 12 の精製ランにより構成され、それぞれ 12 個のレプリケートを用いました (合計 144 の精製)。精製は、QIAamp DSP Circulating NA Kit の 3 つの異なるロットを用いて、3 つの異なる装置により、3 日に分けてオペレーター 3 名が行いました。各シングルパラメーターと、QIAamp DSP Circulating NA Kit の全体的変動 (合計) について、標準偏差 (Standard Deviation, SD) と変動係数 (Coefficient of Variation, CV) を測定しました (表 1)。

表 1. 精度の結果

精度			
パラメーター	平均コピー数/ml	SD	CV (%)
実行 (ラン) 間		461	1.78
オペレーター間		1392	5.38
装置間	25894	228	0.88
日にち間		2096	8.09
ロット間		969	3.74
合計		3120	12.05

## 直線性

BD Vacutainer K2EDTA Tube、PAXgene Blood ccfDNA Tube、および Streck Cell-Free DNA BCT に保存した血液由来の血漿インプット量 1~5 ml についてデータが得られました。すべての BCT について、直線的な DNA 収量増が認められました (図 4 を参照)。BD Vacutainer K2EDTA Tube では、RNA の場合も同様でした。

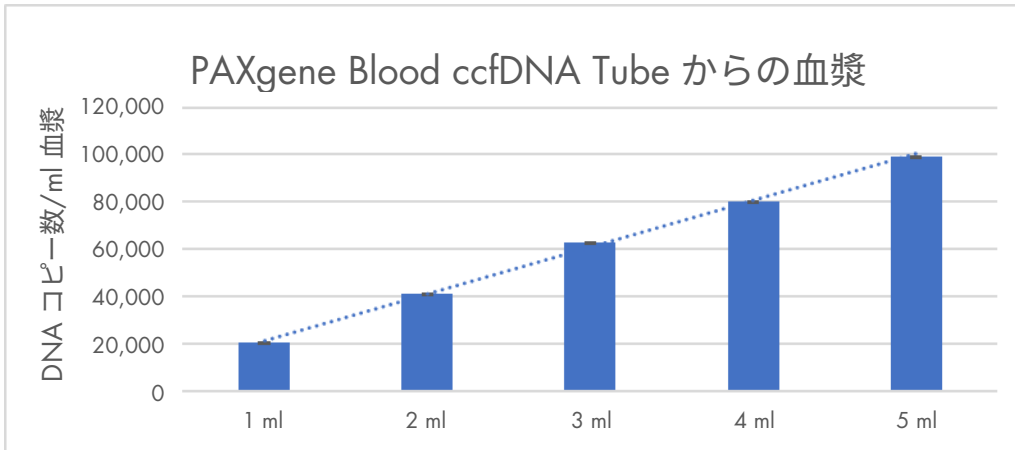


図 4.異なる血漿インプット量について合計 DNA 収率 (DNA コピー数/ml 血漿インプット) の直線的増加。PAXgene Blood ccfDNA Tube から得られた血漿のデータを表示。BD Vacutainer K2EDTA Tube (DNA/RNA) および Streck Cell-Free DNA BCT から得られた血漿についても同様の結果となった。

## プロトコール同等性 (Breeze/Classic プロトコール)

Breeze プロトコールと Classic プロトコール間の性能の同等性は、STD を Classic プロトコール (標準条件) の観察精度として、平均 Ct 値 (RNA) または平均コピー数/ml (DNA) における対応する相違の 95% 信頼限界が  $\pm 2 \times \text{STD}$  以内に収まったことにより示されました。3 つのキットロットを使用し、オペレーター 3 名が実験を行いました。

Breeze プロトコールについて得られた Ct 値の合計精度 (STD) は、Classic プロトコールの合計精度 (STD) に対する両側 95% 予測区間の上限を下回りました。ここで、予測区間は、Classic プロトコールからのデータ ( $n=143$ ) と、本試験における Breeze プロトコールのデータポイント数 ( $n=144$ ) を用いて、試験内で算出しました。

## 妨害物質

潜在的な妨害物質の源は、天然の代謝物、患者の治療中に導入される物質、患者が摂取する物質など様々です。QIAamp DSP Circulating NA Kit では、ヘモグロビン、トリグリセリド、EDTA、カフェイン、アルブミン、抱合型ビリルビン、非抱合型ビリルビンを内因性構成要素として検査しました。qPCR をダウンストリームアプリケーションとして適用した場合、影響は検出されませんでした。さらに、サンプル処理工程や核酸抽出工程で、QIAamp DSP Circulating NA Kit の構成要素（プロテイナーゼ K、Buffer ACL、Buffer ACB、Buffer ACW1、Buffer ACW2、エタノール）に由来する影響は認められませんでした。

妨害物質は複雑であり、特定のダウンストリームアプリケーションの感度は多様であるため、ユーザーは、使用するワークフローに固有の妨害物質の影響を評価し、特定のダウンストリームの診断アプリケーションで影響を管理する手法を検証することを推奨します。

特定の QIAGEN ダウンストリームアプリケーションにおける妨害物質の詳細については、キットのハンドブックを参照してください。

## クロスコンタミネーション

クロスコンタミネーションのレベルを評価するため、105 コピーの HBV ウイルスを 5 または 2 ml のヒト血漿に添加し（陽性サンプル）、ウイルス無添加のサンプル（陰性サンプル）の隣で、陰性サンプルのみを含む抽出ランと交互のチェッカーボード設定で分離しました（抽出ラン間、抽出ラン内のクロスコンタミネーションを評価するため）。この検証は、ターゲット分子である核酸を多く含有するサンプルが抽出手順中に他のサンプルを汚染する状況の再現を試みたものです。核酸精製は単一のロットの試薬により行いました。クロスコンタミネーションは、*artus*<sup>®</sup> HBV RG CE PCR Kit を使って評価しました。その結果、システム全体でクロスコンタミネーションは認められませんでした。

## 図記号



本製品は、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。



体外診断薬キット



カタログ番号



製造者

Rn

R は使用説明書（性能特性）の改訂を示し、n は改訂番号を示す。



# 文書改訂履歴

改訂	説明
R1、2022年6月	IVDR 準拠の QIAamp DSP Circulating Kit V2 を更新 使用目的に「手動」分離を追加。キットバージョン 1 と比較して性能データに変化はありません。

最新のライセンス情報と製品ごと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ご覧ください。QIAGEN キットの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](http://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®, QIAamp®, artus®, GeneRead®, GeneReader® (QIAGEN Group); Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); PAXgene® (PreAnalytiX GmbH); Streck®, Cell-Free DNA BCT® (Streck Inc.); Qubit® (Thermo Fisher Scientific or its subsidiaries). 本文中で使用した登録済みの名称、商標などは、具体的な表示がない場合であっても法的保護の対象から外れることを意味しません。

06/2022 HB-3049-D01-001 © 2022 QIAGEN、無断複写・転載を禁じます。

