

# QIAsymphony® DSP Circulating DNA Kit 사용 지침(성능 특징)

버전 2



체외 진단용

QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit용



937556



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, 독일

R1

성능 특징은 전자 형식으로 제공되며 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)에서 해당 제품 페이지의 리소스 탭에 있습니다.

## 일반 개론

QIAsymphony DSP Circulating DNA 시스템은 인간 혈장 및 소변에서 순환 무세포 DNA(circulating cell-free DNA, ccfDNA)를 정성적으로 정제하는 데 즉시 사용할 수 있는 체외 시스템으로 구성됩니다.

QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit는 QIAsymphony SP 기기에서만 사용해야 합니다.

QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit는 광범위한 인간 혈장 유형에서 ccfDNA를 완전 자동으로 동시에 정제할 수 있는 시약을 제공합니다(ccfDNA 프로필 안정제 포함(예: Streck®의 Cell-Free DNA BCT®), ccfDNA 프로필 안정제 제외(예: EDTA 튜브), 인간 소변(ccfDNA 프로필 안정화제 포함 및 제외)). 그러나 일부 채혈 튜브에 대한 성능 특징은 확립되지 않았으며 사용자가 검증해야 합니다.

정제된 ccfDNA는 광범위한 다운스트림 공정(PCR 화학물질, 형광 기반 정량화 분석 또는 NGS 등)에서 사용할 수 있습니다.

QIAsymphony SP는 정제 절차의 모든 단계를 수행합니다. 24개로 이루어진 배치에서 최대 96개의 검체를 단일 실행으로 처리합니다. 소변 샘플에 수동 샘플 전처리가 필요할 수 있습니다.

참고: 성능 특징은 다양한 요인에 따라 크게 달라지며 특정 다운스트림 공정과 관련이 있습니다. 이는 전형적인 다운스트림 공정과 함께 QS DSP Circulating DNA Kit용으로 설계되었습니다. 그러나 생체 시료에서 핵산을 분리하는 방법은 여러 다운스트림 공정의 프런트 엔드로 사용되며, 성능 매개변수(예: 교차 오염 및 실행 정밀도)는 이러한 작업 절차에 다운스트림 공정 개발의 일부로 설정되어야 합니다. 따라서 전체 작업 절차를 검증하여 적절한 성능 매개변수를 설정하는 것은 사용자의 책임입니다.

## 기본 성능

QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit의 기본 성능은 일인 공여자 48명의 Streck 혈장 4ml 및 안정화된 소변 4ml에서 추출한 ccfDNA를 사용하여 평가했습니다. ccfDNA 수율은 18S 리보솜 RNA 코딩 시퀀스에 대한 사내 real-time PCR 분석을 통해 결정되었습니다.

그림 1(혈장 4ml)과 그림 2(소변 4ml)의 수율 차이(log10 copies/ml)는 동일한 양의 각 샘플 물질에서 일반적으로 발견되는 강한 공여자의 의존 ccfDNA 농도를 나타냅니다.

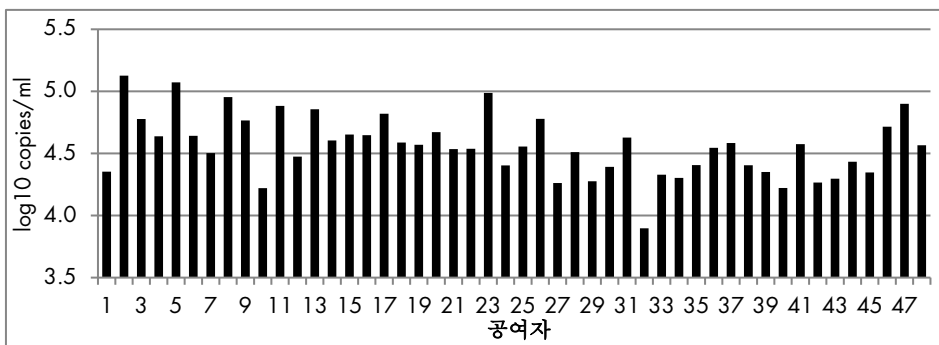
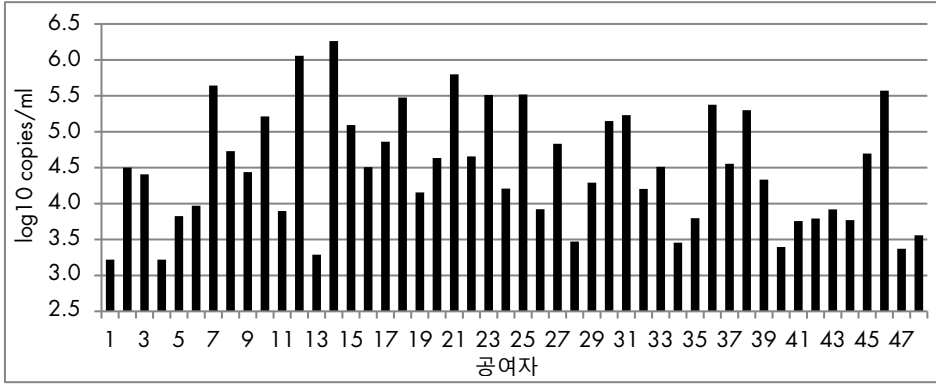


그림 1. 일인 공여자 48명의 혈장에서 얻은 ccfDNA 수율. 일인 공여자 48명의 혈액 기증은 Cell-Free DNA BCT(Streck)로 수행되었습니다. QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit를 사용하여 혈장 4ml에서 ccfDNA를 추출했습니다. ccfDNA 수율은 18S 코딩 시퀀스에 대한 사내 real-time PCR 분석을 통해 정량화되었습니다. 결과는 혈장 투입량(ml)당 목표 카피 수로 계산되었습니다.



**그림 2. 일인 공여자 48명의 소변에서 얻은 ccfDNA 수율.** 일인 공여자 48명으로부터 채집한 소변을 Cell-Free DNA Urine Preserve®(Streck)를 사용하여 안정화했습니다. QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit를 사용하여 소변 4ml에서 ccfDNA를 추출했습니다. ccfDNA 수율은 18S 코딩 시퀀스에 대한 사내 real-time PCR 분석을 통해 정량화되었습니다. 결과는 소변 투입량(ml)당 목표 카피 수로 계산되었습니다.

## 실행 정밀도

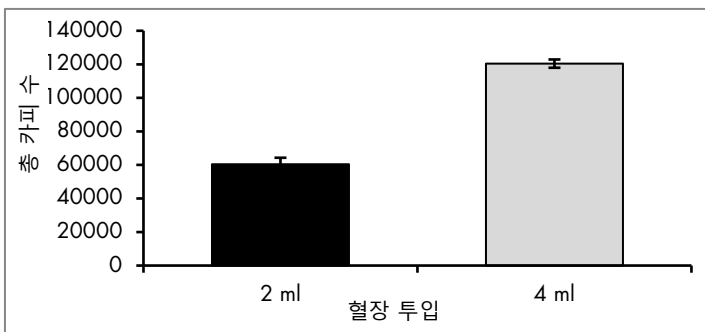
변동 계수(Coefficient of Variation, CV)는 EDTA 혈장에서 인간 ccfDNA를 추출하기 위해 결정했습니다. 정밀도 분석의 경우 ccfDNA는 18S 리보솜 코딩 시퀀스에 대한 사내 real-time PCR 분석을 통해 정량화되었습니다. 총 10회의 QIAAsymphony 실행이 4개의 배치로 각각 수행되었습니다(배치당 8회 반복). 정밀도 데이터는 표 1에 표시되어 있습니다.

**표 1. 정밀도 추정치 분석**

정밀도	CV(%)
배치 내	11.67
반복성	13.14
중간 정밀도	13.14
전체 정밀도	14.12

## 2ml 및 4ml 프로토콜의 등가 성능

2ml 및 4ml 샘플 투입 프로토콜의 등가 성능은 QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit에 대해 인간 EDTA 혈장 풀에서 추출한 내인성 ccfDNA를 사용하여 평가했습니다. 총 8회의 독립 QIAAsymphony 실행이 4개의 배치(배치당 8회 반복)로 각각 수행되었습니다. QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit 절차의 선형 범위는 18S 코딩 시퀀스에 대한 사내 real-time PCR 분석을 통해 결정되었습니다(그림 3). 2ml 및 4ml 프로토콜의 차이 비율은 표 2에 표시되어 있습니다(참조 프로토콜의 샘플 투입량은 4ml임).



**그림 3. 2ml 및 4ml 샘플 투입 프로토콜을 사용한 등가 성능.** ccfDNA 프로토콜의 선형 범위는 2ml 및 4ml 프로토콜을 사용하여 결정되었습니다. ccfDNA 수율은 18S 코딩 시퀀스에 대한 사내 real-time PCR 분석을 통해 정량화되었습니다. 결과는 프로토콜당 총 카피 수로 계산되었습니다.

표 2. 2ml 및 4ml 프로토콜 간 차이(N = 256)

매개변수	값
계산된 copies/mL의 기하 평균 예상 비율	1.01
95% 신뢰 하한	0.92
95% 신뢰 상한	1.11
전체 정밀도	14.12

2ml 및 4ml 샘플 투입 프로토콜의 성능은 동등하며 ml당 계산된 카피 수로 측정되었습니다.

## 크기 분포

샘플 출력의 크기 분포를 평가하기 위해 QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit를 사용하여 4ml의 샘플 투입량에서 ccfDNA를 추출하고, 75µl로 용출한 다음 1µl의 용출액을 Agilent® 2100 Bioanalyzer에서 Agilent High Sensitivity DNA Chip을 사용하여 크기 분석했습니다. 총 5번의 독립적인 복제가 수행되었습니다. 그림 4의 혈장 및 그림 5의 소변에 대해 하나의 대표적인 DNA 프로필이 표시됩니다.

그림 4의 혈장에 대한 전기영동도는 145~196bp 범위의 약 165bp에서 자주 관찰되는 피크를 보여주며, 이는 뉴클레오솜의 히스톤 결합 DNA 길이 범위에 있습니다. 그림 5의 소변에 대한 전기영동도는 약 160bp에서 우세한 피크가 약 145~250bp 범위로 더 넓다는 것을 보여줍니다. 또한 소변의 경우(하위 마커 피크 수준에서) 약 20~100bp 범위의 두 번째 피크가 존재하며, 이는 ccfDNA 분획이 더 높은 수준으로 파편화됨을 나타냅니다. 또한 그림 5는 약 2kb에서 긴 DNA 단편이 많음을 보여줍니다. 이처럼 풍부한 유전체 DNA 단편은 소변 샘플에서 자주 발견되는데, 가장 큰 원인은 소변에 존재하는 세포에서 유전체 DNA가 방출되기 때문입니다.

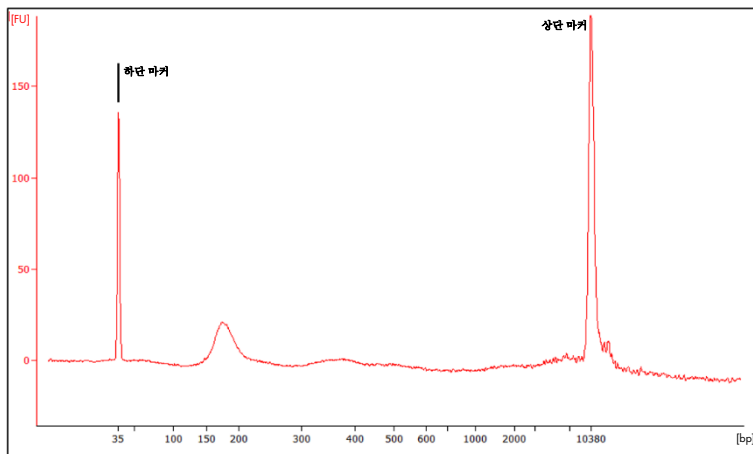


그림 4. 혈장의 ccfDNA 크기 분포(Bioanalyzer 프로파일). ccfDNA는 QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit를 사용하여 EDTA 혈장 4ml에서 추출하고, Agilent High Sensitivity DNA Chip에서 용출액 1µl를 분석했습니다(x축: 염기쌍 크기(bp), y축: 형광 단위(Fluorescence Unit, FU)).

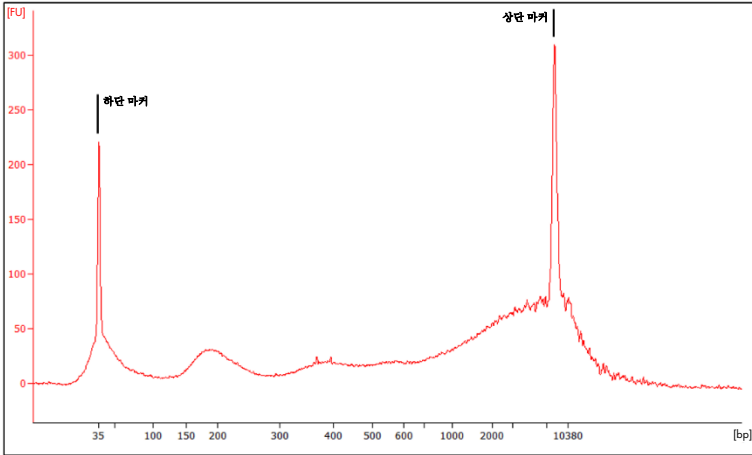


그림 5. 소변의 cfDNA 크기 분포(Bioanalyzer 프로파일). cfDNA는 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit를 사용하여 소변 4ml에서 추출하고, Agilent High Sensitivity DNA Chip에서 용출액 1µl을 분석했습니다(x축: 염기쌍 크기(base pair size, bp), y축: 형광 단위(Fluorescence Unit, FU)).

## 용출액 안정성

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit의 용출액 안정성은 인간 EDTA 혈장 풀에서 추출한 cfDNA를 사용하여 평가했습니다. 용출액은 두 가지 용출 랙 형태, 즉 QIAGEN® EMTR(Elution Microtubes CL 96, 카탈로그 번호 19588) 및 1.5ml Eppendorf® LoBind® Snap Cap Safe-Lock 튜브에 보관했습니다. 용출액은 8회 반복하여 분석했습니다. 용출액의 DNA 안정성은 18S 리보솜 RNA 코딩 시퀀스에 대한 사내 real-time PCR 분석을 통해 결정되었습니다.

용출액 안정성은 2~8°C에서 최대 1개월까지 보관 기간이나 보관 형태로부터 영향을 받지 않았습니다(그림 6). LoBind 튜브의 DNA 안정성은 7일, 1개월, 2개월 후 세 번의 동결-해동 사이클을 포함하여 -15~30°C에서 보관하는 경우 영향을 받지 않았습니다(그림 7).

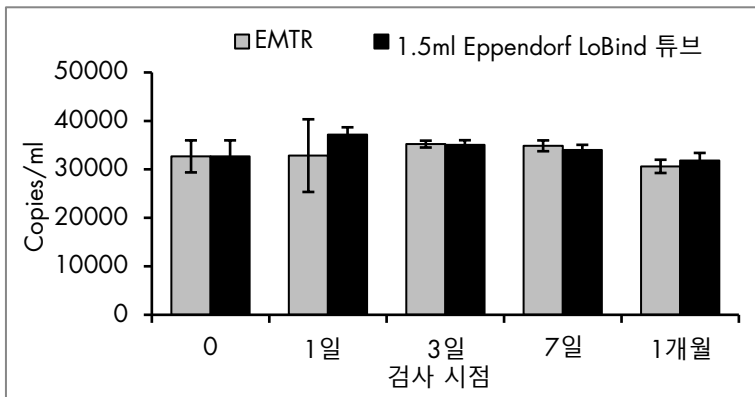
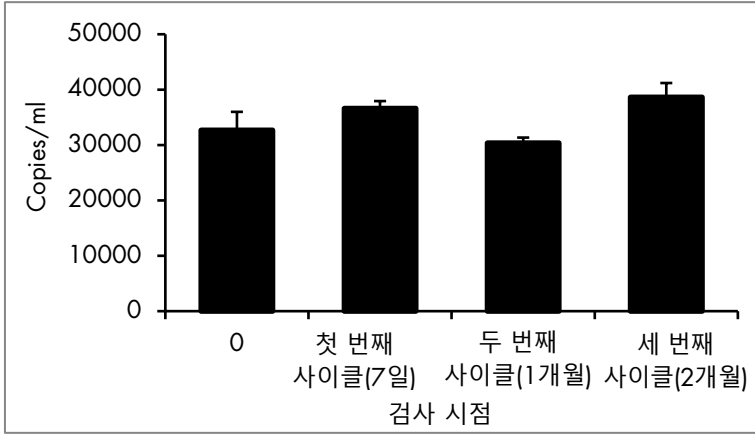


그림 6. 2~8°C에서 두 가지 튜브 형태에 보관한 용출액의 cfDNA 안정성. cfDNA는 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit를 사용하여 EDTA 혈장에서 추출한 후 다양한 검사 시점을 위해 2~8°C에서 보관했습니다. cfDNA 수율은 18S 코딩 시퀀스에 대한 사내 real-time PCR 분석을 통해 정량화되었습니다. 결과는 혈장 투입량(ml)당 목표 카피 수로 계산되었습니다.



**그림 7. 세 번의 동결-해동 사이클을 포함하여 -15~-30°C에서 보관한 용출액의 ccfDNA 안정성.** ccfDNA는 QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit를 사용하여 EDTA 혈장에서 추출한 후 -15~-30°C에서 1.5ml Eppendorf LoBind 튜브에 보관했습니다. ccfDNA 수율은 세 번의 동결-해동 사이클에 동일한 용출액을 사용하여 세 번의 검사 시점에서 결정했습니다. ccfDNA 수율은 18S 코딩 시퀀스에 대한 사내 real-time PCR 분석을 통해 정량화되었습니다. 결과는 혈장 투입량(ml)당 목표 카피 수로 계산되었습니다.

## 간섭 물질

QS DSP Circulating DNA Kit의 ccfDNA 추출 성능 및 전형적인 다운스트림 분석에 대한 후속 호환성에 미치는 영향을 검사하기 위해 사람 혈장과 소변에 다양한 잠재적 간섭 물질을 첨가했습니다(표 3 참조). 용출액은 18S 코딩 시퀀스에 대한 사내 real-time PCR 및 고민감도 dsDNA 분석을 사용하는 Qubi® Fluorometer를 통해 분석되었습니다.

**표 3. 잠재적 간섭 물질의 검사 농도**

간섭 물질	혈장	소변
빌리루빈	200mg/liter*	200mg/liter*
헤모글로빈	2g/liter <sup>†</sup>	-
BSA 및 감마 글로빈	최대 120g/liter*	1g/liter <sup>†</sup>
트리글리세라이드	5g/liter*	-
포도당	10g/liter*	10g/liter*
혈액	-	1% <sup>†</sup>
pH	-	pH 4 및 pH 9 <sup>†</sup>

\* CLSI EP7-A2 Vol. 25 No. 27

<sup>†</sup> FDA 지침 초안(11.05.2011)

감마 글로불린 농도가 높은(>30g/l) 혈장 샘플이 순환 무세포 DNA의 회복을 저하시킬 수 있다는 점을 제외하고, 표 3에 나열된 물질은 간섭하지 않습니다.

참고: 추출된 핵산의 품질을 평가하기 위해 전형적인 다운스트림 공정을 사용하여 검사를 수행했습니다. 그러나 다운스트림 공정에 따라 순도와 관련된 요구 사항이 다를 수 있으므로(예: 잠재적인 간섭 물질의 부재) 관련 물질의 식별 및 검사도 QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit와 관련된 작업 절차에 다운스트림 공정 개발의 일부로 설정해야 합니다.

## 교차 오염

QIAsymphony DSP Circulating DNA 시스템의 교차 오염 위험은 바둑판 배치를 번갈아 가며(양성 및 음성 샘플 교대) QIAsymphony SP 기기에서 샘플 96개를 세 번 실행하여 분석했습니다. 여성 혈장(음성 샘플) 및 농도가 혈장 1ml당 SRY1 유전자 카피 1.0E+05개인 전단된 남성 gDNA를 첨가한 여성 혈장(양성 시료)을 모델 시스템의 샘플 물질로 사용했습니다. 샘플 준비는 각각 2ml 용량의 개별 샘플 2개를 전달하는 4ml 프로토콜을 사용하여 수행했습니다. 추출 실행 중 음성 여성 혈장 샘플의 잠재적 오염은 Y 염색체 특이 유전자 SRY1에 대한 real-time PCR을 사용하여 용출액의 다운스트림 분석에서 평가했습니다.

샘플 간, 배치 간 또는 실행 간 캐리오버에 대한 교차 오염은 감지되지 않았습니다.

## 다양한 다운스트림 공정에 대한 호환성

분리된 핵산이 Real Time-PCR(그림 1, 그림 2, 그림 3, 그림 6, 그림 7 참조), Qubit Fluorometer(단백질 분석 및 고민감도 dsDNA 분석), 라이브러리(그림 8 참조), 차세대 염기서열 분석(Next Generation Sequencing, NGS)을 포함한 다양한 다운스트림 공정과 호환됨을 입증하기 위해 QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit를 개발하는 동안 전형적인 다운스트림 공정이 사용되었습니다.

그림 8의 전기영동도는 성공적인 어댑터 결합 및 ccfDNA의 후속 증폭에 대한 예를 보여줍니다. 300bp에서 뉴클레오솜 ccfDNA에 대한 뚜렷한 피크(각 어댑터에 대해 약 165 + 약 70bp)가 표시되고 그 옆의 약 470bp에서 디뉴클레오솜 피크도 표시됩니다.

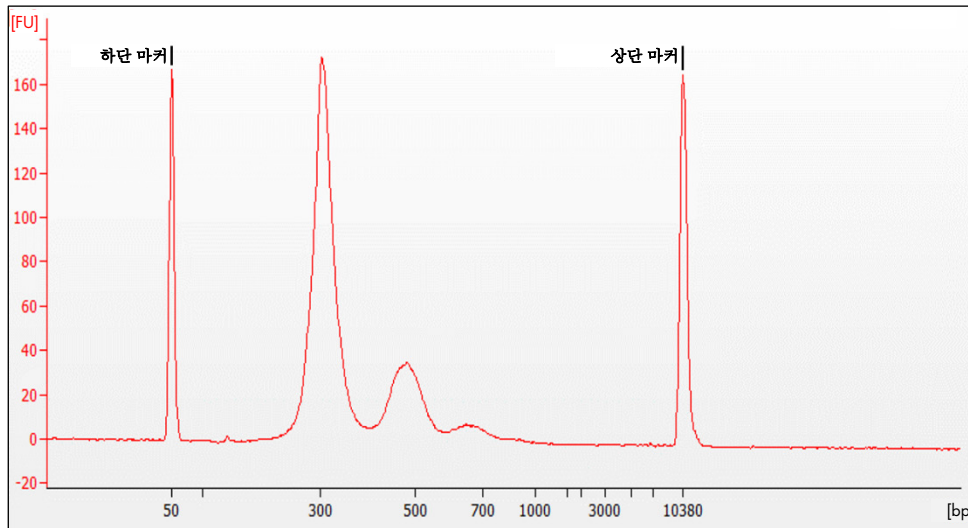


그림 8. QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit로 추출한 ccfDNA(일인 공여자)의 DNA 라이브러리. 4ml 프로토콜을 사용하여 Streck 혈장에서 ccfDNA를 추출한 후 용출액 35µl를 NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit(Biolabs)로 전달했습니다. 증폭 및 AMPure XP 정제 후 용출액 1µl를 Agilent 7500 DNA Kit로 분석했습니다.

## 기호

사용 지침 또는 포장 및 라벨에 다음과 같은 기호가 있을 수 있습니다.

기호	기호 정의
 <N>	<N>회 반응에 충분한 시약 포함
	사용 기한
	이 제품은 체외 진단 의료 기기에 대한 유럽 규정 2017/746의 요구 사항을 충족합니다.
	체외 진단용 의료 기기
	카탈로그 번호
	로트 번호
	재료 번호(즉, 구성품 라벨)
	구성품
	내용물
	수
	국제 거래 단위 번호
Rn	R은 사용 설명서의 개정 버전을 나타내며, n은 개정 번호입니다
	온도 제한
	제조업체
	사용 설명서 참조
	경고/주의
	단백분해효소 K
	웰 번호(즉 시약 카트리지 웰)
	시약 카트리지
	아지드화 나트륨



기호

기호 정의

**EtOH**

에탄올

**UDI**

고유한 장치 식별자

## 개정 이력

### 개정

### 설명

R1, 2022년 6월

버전 2, 개정판 1

- IVDR 준수를 위해 버전 2로 업데이트
- 간섭 물질, 교차 오염, 다운스트림 공정에 대한 호환성 섹션 추가

최신 라이선스 정보 및 제품별 면책 사항은 각 QIAGEN 키트 안내서 또는 사용 설명서를 참조하십시오. QIAGEN 키트 안내서와 사용 설명서는 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)에서 확인하거나 QIAGEN 기술 서비스 또는 현지 유통업체에 요청할 수 있습니다.

등록 상표: 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 또는 그 자회사). 이 문서에 사용된 등록된 이름, 상표 등은 별도로 표시되지 않은 경우에도 법적 보호를 받는 것으로 간주됩니다.

HB-3034-D01-001 © 2022 QIAGEN, 모든 권리 보유.

이 페이지는 의도적으로 비어 있는 페이지입니다

