

QIAsymphony® DSP Circulating DNA Kit 使用說明（效能特征）

IVD

適用於體外診斷

適用於

	Σ	REF	版本
QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit (192)	192	937556	V2
QIAsymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192)	192	937566	V1
QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit (96)	96	937555	V1



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, 德國

R2 效能特性以電子文件提供，可在產品頁面的資源索引標籤下找到：www.qiagen.com。

簡介

QIASymphony DSP Circulating DNA 系統組成一個即用式體外系統，可從人類血漿和尿液定性純化循環無細胞 DNA (circulating cell-free DNA, ccfDNA)。

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 僅能與 QIASymphony SP 儀器搭配使用。

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 提供數種試劑，可從多種人類血漿類型中全自動化同時純化 ccfDNA（使用 ccfDNA 特性穩定劑，例如 PreAnalytiX 的 PAXgene® Blood ccfDNA Tube、Streck® 的無細胞 DNA BCT® 以及未使用 ccfDNA 特性穩定劑，例如 EDTA 試管）和人類尿液（使用和未使用 ccfDNA 特性穩定劑）。然而，目前尚未建立每個血液收集管的效能特性，須由使用者驗證。

純化的 ccfDNA 與多種下游應用相容，例如 PCR 化學試劑、螢光定量檢測或 NGS。

QIASymphony SP 執行純化程序的所有步驟。單次運行最多可處理 96 份樣本，每批 24 份。尿液樣本可能需要手動樣本預處理。

備註：效能特性主要取決於各種因子，並與特定下游應用有關。它是為了 QS DSP Circulating DNA Kit 及示範性下游應用而建立。然而，從生物樣本中分離核酸的方法可用作多個下游應用的前端，作為下游應用開發的步驟之一，需要為這類工作流程建立效能參數，例如交叉污染和運行精確度。因此，使用者有責任驗證整個工作流程，以建立適當的效能參數。

基本效能

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 的基本效能透過 48 名單一捐贈者，從 4 mL Streck 血漿和 4 mL 穩定處理後尿液萃取 ccfDNA 完成評估。ccfDNA 產量已透過 18S 核糖體 RNA 編碼序列的內部 real-time PCR 檢測確認。

圖 1（4 mL 血漿）和圖 2（4 mL 尿液）中的產量差異（log₁₀ copies/mL），反映了在相同體積對應樣本材料中可見的 ccfDNA 與捐贈者高度相關濃度。

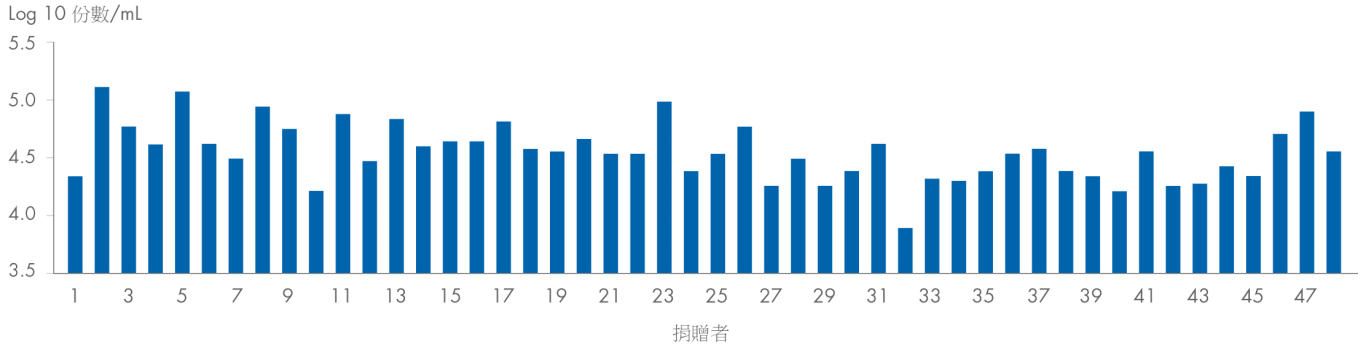


圖 1. 48 名單一捐贈者血漿的 cfDNA 產量。在 Cell-Free DNA BCT (Streck) 完成 48 名單一捐贈者捐血。使用 QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit 從 4 mL 血漿萃取 cfDNA。使用針對 18S 編碼序列的內部 real-time PCR 檢測定量 cfDNA 產量。結果計算為每毫升血漿輸入的目標複製數。

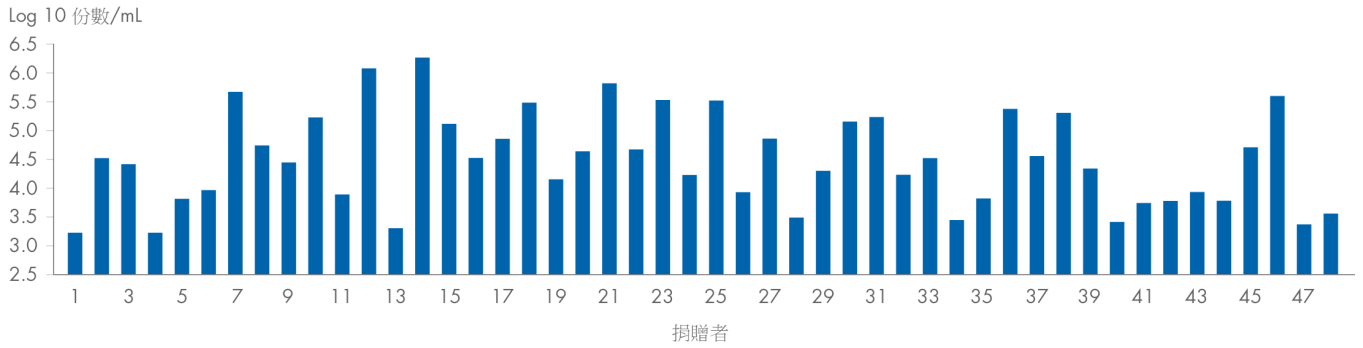


圖 2. 48 名單一捐贈者尿液的 cfDNA 產量。使用 Cell-Free DNA Urine Preserve® (Streck) 穩定了從 48 名單一捐贈者收集的尿液。使用 QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit 從 4mL 尿液萃取 cfDNA。使用針對 18S 編碼序列的內部 real-time PCR 檢測定量 cfDNA 產量。結果計算為每毫升尿液輸入的目標複製數。

此外，還與手動 cfDNA 萃取方法 QIAamp DSP Circulating NA Kit (產品編號 61504) 進行了比較，評估了 QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit 的基本效能。為此，從 24 個單一供體的 PAXgene® Blood ccfDNA 試管 (CE-IVD) 中獲取血漿，用於從 4 mL 體積中萃取 cfDNA，並在 75 µL 的 cfDNA 萃取試劑盒中洗脫 cfDNA。ccfDNA 產量已透過 18S 核糖體 RNA 編碼序列的內部 real-time PCR 檢測確認。圖 3 中的產量差異 (份數/mL) 說明，在血漿中，ccfDNA 的濃度受不同供體的影響通常很大。

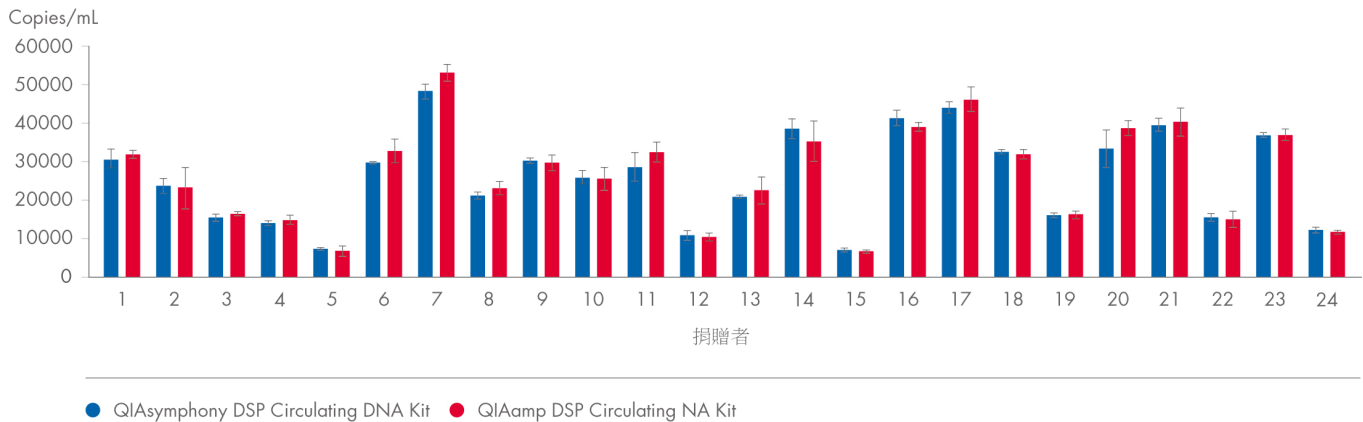


圖 3. QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit 與 QIAamp DSP Circulating NA Kit 具有同等的 ccfDNA 萃取效能。使用 PAXgene Blood ccfDNA 試管對從 24 個單一供體採集的血漿進行穩定化處理。使用 QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit 和 QIAamp DSP Circulating NA Kit 從 4 mL 血漿中萃取 CcfDNA。使用針對 18S 編碼序列的內部 real-time PCR 檢測定量 ccfDNA 產量。結果計算為每毫升血漿輸入的目標複製數。

自動和手動 ccfDNA 萃取試劑盒的效能相同（按計算的份數/mL 來測量）。QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit 和 QIAamp DSP Circulating NA Kit 的幾何平均數比率如表 1 所示（參考試劑盒為 QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit）。

表 1. QIAamp DSP Circulating NA Kit / QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit 的幾何平均數比率 (N = 213)

參數	數值
計算的 copies/mL 中幾何平均的估計比率	1.074
95% 信賴界限下限	1.048
95% 信賴界限上限	1.100

運行精確度

測定從 EDTA 血漿萃取人類 ccfDNA 的變異係數 (Coefficients of Variation, CV)。進行精確度分析時，使用針對 18S 編碼序列的內部 real-time PCR 檢測定量 ccfDNA。總共分 4 個批次執行 10 個 QIAasymphony 運行（每批 8 次重複）。精確度資料如表 2 所示。

表 2. 精確度估計值分析

精確度	CV (%)
批次內	11.67
可重複性	13.14
中間精確度	13.14
總精確度	14.12

2 mL 和 4 mL 操作程序的同等性能

使用從人類 EDTA 合併血漿萃取的內源性 ccfDNA，對 QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit 評估了 2 和 4 mL 樣本輸入操作程序的同等效能。總共分 4 個批次執行 8 個獨立 QIAasymphony 運行，每批 8 次重複。QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit 程序的線性範圍，已透過內部 real-time PCR 檢測確認 18S 編碼序列（圖 4）。2 和 4 mL 操作程序的差異比率如表 3 所示（基準操作程序為 4 mL 樣本輸入）。

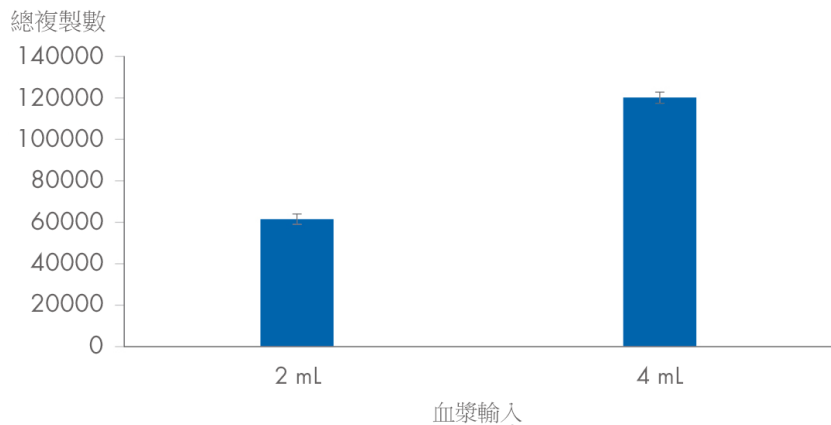


圖 4.2 和 4 mL 樣本輸入操作程序的同等效能。使用 2 和 4 mL 操作程序確認 ccfDNA 操作程序的線性範圍。使用針對 18S 編碼序列的內部 real-time PCR 檢測定量 ccfDNA 產量。結果計算為每個操作程序的總複製數。

表 3.2 與 4 mL 操作程序之間的差異 (N = 256)

參數	數值
計算的 copies/mL 中幾何平均的估計比率	1.01
95% 信賴界限下限	0.92
95% 信賴界限上限	1.11
總精確度	14.12

2 和 4 mL 樣本輸入操作程序具有相等效能，以計算的每毫升複製數來評估。

1–10 mL 樣本體積的線性 ccfDNA 萃取效率

使用從人血漿和尿液池萃取的內源性 ccfDNA 評估 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 的 1–10 mL 樣本輸入的操作程序效能是否相同。血漿獲取自 Streck Cell-Free DNA BCT®，而尿液使用 Streck® Urine Preservative 進行穩定。從至少 10 個供體中採集穩定的血漿和尿液，並儲存在 -20°C 溫度下，直至使用。對於 1 mL 至 10 mL 樣本體積，請結合使用 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 和 circDNA 操作程序，從 1、2、4、6、8 和 10 mL 體積萃取 CfdNA。對於每個輸入體積，萃取 12 份。QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 程序的線性範圍，已透過內部 real-time PCR 檢測確認 18S 編碼序列（圖 5）。

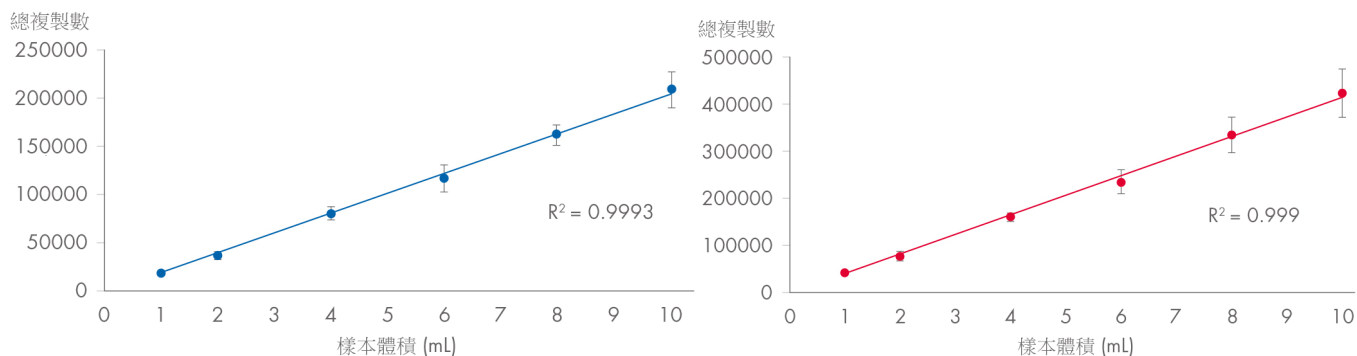


圖 5. 1–10 mL 樣本體積的線性 ccfDNA 萃取效率。使用 1、2、4、6、8 和 10 mL 操作程序確認 ccfDNA 操作程序的線性範圍。從穩定的血漿（左圖，藍點）和穩定的尿液（右圖，紅點）中萃取 ccfDNA。使用針對 18S 編碼序列的內部 real-time PCR 檢測量 ccfDNA 產量。結果計算為每個操作程序的總複製數。

大小分布

為了評估樣本輸出的大小分布，使用 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 從 4 mL 樣本輸入中萃取 ccfDNA，以 75 µL 洗脫，然後使用 Agilent® 2100 生物分析儀對 1 µL 洗脫液進行大小分析（採用 Agilent 高靈敏度 DNA 晶片）。共計進行了 5 次獨立重複分析。圖 6A 和圖 7 分別為血漿和尿液的一個代表性 DNA 特性。

圖 6A 的血漿電泳圖顯示，在約 165 bp 處出現經常觀察到的波峰，範圍從 145 至 196 bp，在核小體中組織蛋白結合 DNA 的長度範圍內。圖 7 尿液電泳圖顯示，處於 ~160 bp 的主要峰值更寬泛，範圍從 ~145 bp 到 250 bp。此外對於尿液，存在約 20 至 100 bp 範圍內的第二個波峰（在較低標記峰的水平），顯示 ccfDNA 片段的片段化程度更高。以及圖 7 顯示約 2 kb 的大量 DNA 長片段。尿液樣本經常發現大量的這類基因體 DNA 片段，很可能是由於尿液中的細胞釋放了基因體 DNA。

除了組蛋白結合 DNA (單核小體) 的 ~165 bp 峰外，從大量樣本中萃取的 ccfDNA 還發現了 ~350 bp 和 >500 bp 的多核小體的峰 (圖 6 B)。為此，使用 QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit 萃取 PAXgene Blood ccfDNA Tubes 的 1-10 mL 血漿中的 ccfDNA，以 75 μ L 進行洗脫，然後使用 Agilent® Cell-free DNA Screen Tape 對 1 μ L 洗脫液進行大小分析。

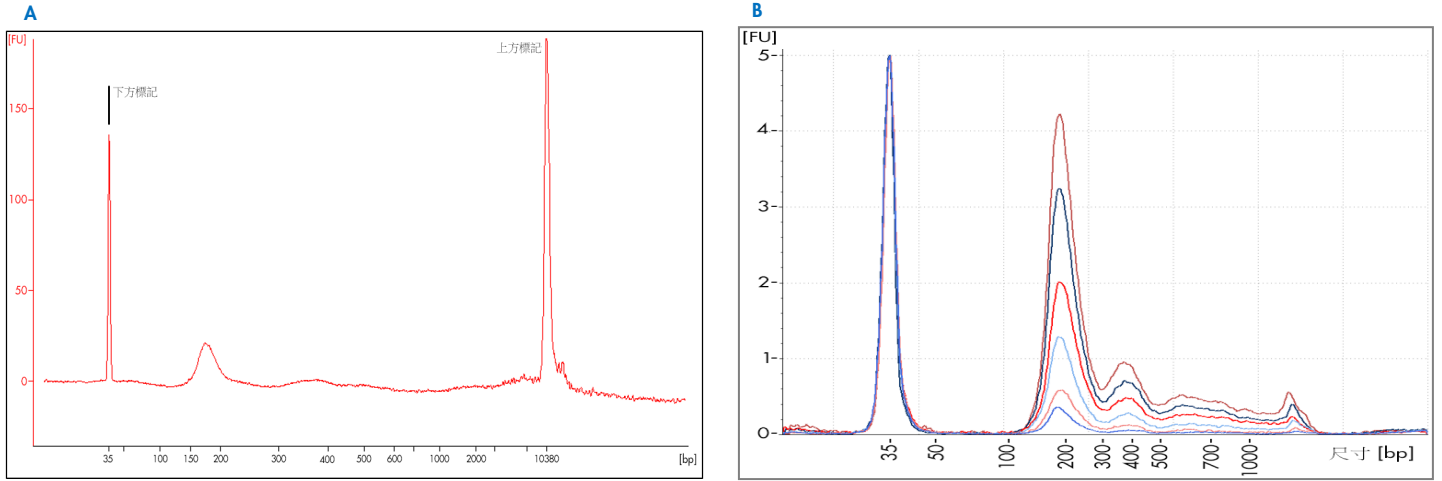


圖 6. 血漿中 ccfDNA 的大小分布 (生物分析儀特性)。 (A) 使用 QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit 從 4 mL EDTA 血漿萃取 ccfDNA；對 1 μ L 洗脫液進行 Agilent 高靈敏度 DNA 晶片分析。x 軸：鹼基對大小 (base pair, bp)；y 軸：螢光單位 (Fluorescence Unit, FU)。(B) 使用 QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit 從 PAXgene® Blood ccfDNA 試管的 1 mL、2 mL、4 mL、6 mL、8 mL 和 10 mL 血漿中萃取 ccfDNA；對 1 μ L 洗脫液進行 Agilent Cell-free DNA Screen Tape 分析。不同顏色的六個尺寸圖譜說明，檢測 ccfDNA 大小分佈的靈敏度提高，這取決於用於萃取的 1-10 mL 血漿樣本量。x 軸：鹼基對尺寸 (bp)；y 軸：螢光單位 (FU)，35 bp 處的峰：下標。

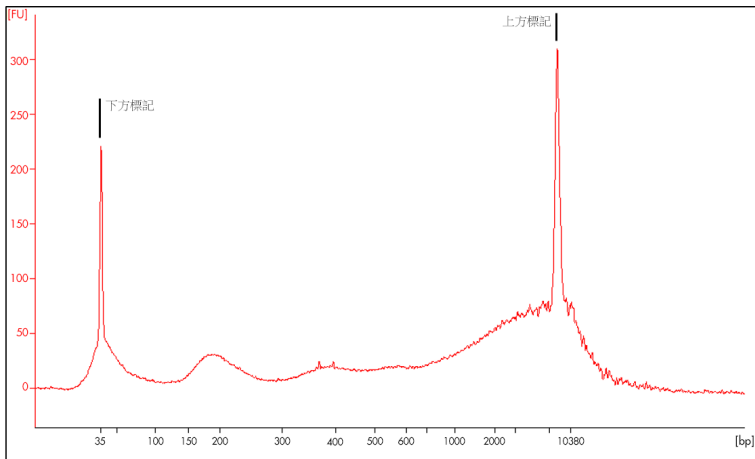


圖 7. 尿液中 ccfDNA 的大小分布 (生物分析儀特性)。 使用 QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit 從 4 mL 尿液萃取 ccfDNA；對 1 μ L 洗脫液進行 Agilent 高靈敏度 DNA 晶片分析。x 軸：鹼基對大小 (base pair, bp)；y 軸：螢光單位 (Fluorescence Unit, FU)。

析出液穩定性

使用從人類 EDTA 合併血漿萃取的 ccfDNA，評估 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 的洗脫液穩定性。洗脫液以 2 種不同的洗脫架型式儲存：QIAGEN® EMTR (Elution Microtubes CL 96 (洗脫微試管 CL 96)；產品編號 19588) 和 1.5 mL Eppendorf® LoBind® Snap Cap Safe-Lock tube (卡扣蓋安全鎖試管)。以 8 次重複分析洗脫液。洗脫液中 DNA 的穩定性已透過 18S 核糖體 RNA 編碼序列的內部 real-time PCR 檢測確認。

洗脫液在 2–8°C 的穩定性，不會受到長達 1 個月的儲存期或儲存型式的影響 (圖 8)。LoBind 試管中 DNA 的穩定性不會受到 –15°C 至 –30°C 儲存的影響，其中包括 7 天、1 個月、2 個月後的 3 次冷凍解凍循環 (圖 9)。

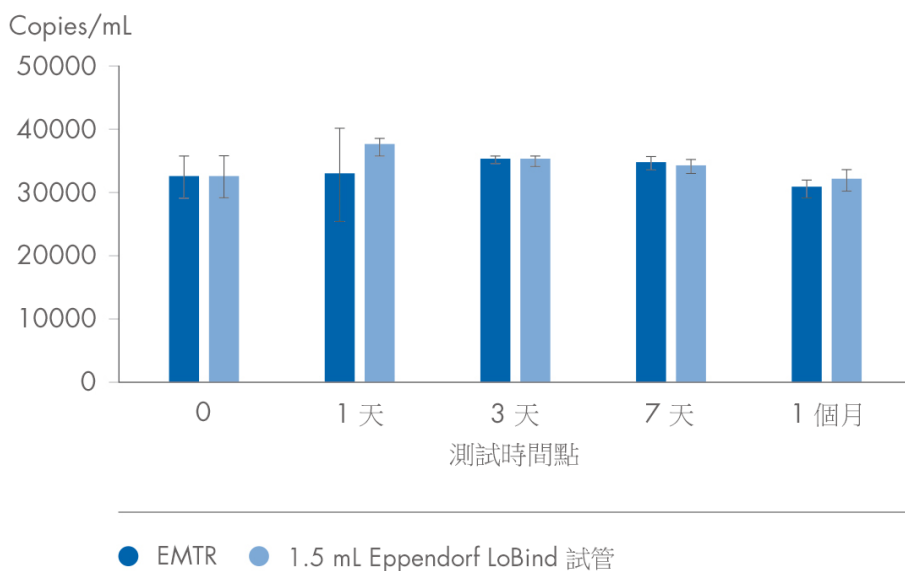


圖 8. 以 2 管型式儲存在 2–8°C 洗脫液中的 ccfDNA 穩定性。使用 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 從 EDTA 血漿萃取 ccfDNA，並在 2–8°C 下儲存不同的測試時間點。使用針對 18S 編碼序列的內部 real-time PCR 檢測定量 ccfDNA 產量。結果計算為每毫升血漿輸入的目標複製數。

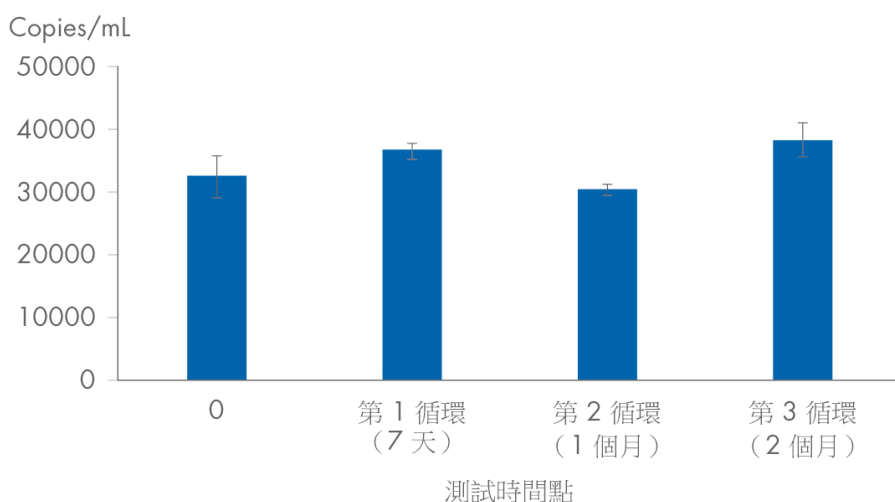


圖 9. 在 –15°C 至 –30°C 下儲存洗脫液中的 ccfDNA 穩定性，包括 3 次冷凍解凍循環。使用 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 從 EDTA 血漿萃取 ccfDNA，並在 –15°C 至 –30°C 以 1.5 mL Eppendorf LoBind 試管儲存。透過在 3 次冷凍解凍循環使用相同的洗脫液，在 3 個測試時間點確認 ccfDNA 的產量。使用針對 18S 編碼序列的內部 real-time PCR 檢測定量 ccfDNA 產量。結果計算為每毫升血漿輸入的目標複製數。

干擾物質

人類血漿和尿液中加入不同的可能干擾物質（請見表 4），以測試其是否影響 QS DSP Circulating DNA Kit 的 ccfDNA 萃取效能，以及與範例性下游檢測的相容性。使用內部 real-time PCR 檢測 18S 編碼序列以及 Qubit® Fluorometer 的 High Sensitivity dsDNA（高靈敏度 dsDNA）檢測分析洗脫液。

表 4. 可干擾物質的測試濃度

干擾物質	血漿	尿液
膽紅素	200 mg/liter*	200 mg/liter*
血紅素	2 g/liter†	-
BSA 和 γ 球蛋白	最高 120 g/liter*	1 g/liter†
三酸甘油酯	5 g/liter*	-
血糖	10 g/liter*	10 g/liter*
血液	-	1%†
pH	-	pH 4 和 pH 9†

* CLSI EP7-A2 Vol. 25 No. 27

† FDA 準則草案 (11.05.2011)

表 4 所列的物質皆不會造成干擾，除了以下具有高濃度 γ 球蛋白 (> 30 g/liter) 的血漿樣本，可能會降低循環無細胞 DNA 的回收率。

備註：使用範例性下游應用進行測試，以評估萃取的核酸品質。然而，不同的下游應用可能對純度具有不同要求（即，不存在可能的干擾物質），因此對於涉及 QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit 的任何工作流程，也需建立相關物質的識別和測試，以利用下游應用開發。

交叉污染

針對 1 mL、4 mL 和 10 mL 樣本體積的操作程序，分析了 QIAAsymphony DSP Circulating DNA 系統的交叉污染風險，其中包括一個、兩個和五個單獨的樣本轉移步驟，每個步驟的體積為 1 mL 或 2 mL。在 QIAAsymphony SP 儀器上使用批次縱橫交替（陽性和陰性樣本交替）執行了三次 96 個樣本運行（1 mL 和 4 mL）和六次 48 個樣本運行（10 mL）。對於 1 mL 和 4 mL 樣本體積，將女性血漿（陰性樣本）和雌性血漿加入濃度為每毫升血漿（陽性樣本） $1.0E+05$ 個 SRY1 基因複製數的剪切男性 gDNA，作為模型系統的樣本材料。對於 10 mL 樣本體積，將血漿（陰性樣本）和每毫升血漿加入了濃度為 $1.0E+05$ 份 GFP 基因的 1000 bp DNA 片段的血漿（陽性樣本）作為樣本材料。

針對萃取運行過程中，血漿陰性樣本的潛在污染，透過隨後的洗脫液分析（real-time PCR 檢測 γ 染色體特異性基因 SRY1 [1 mL 和 4 mL 操作程序] 和 GFP 特異性序列 [10 mL 操作程序]）進行評估。

沒有檢測到樣本間、批次間或運行間的交叉污染。

三個 QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit 的 ccfDNA 萃取效果相當

使用 24 個單一供體，從 2 mL 或 6 mL Streck 血漿中萃取 ccfDNA 以評估 QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit (192)（產品編號 937556）、QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit (96)（產品編號 937555）和 QIAAsymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192)（產品編號 937566）的等效效能。ccfDNA 產量已透過 18S 核糖體 RNA 編碼序列的內部 real-time PCR 檢測確認（圖 10）。

產量差異（份數/mL）說明，在相同體積的血漿中，ccfDNA 的濃度受不同供體的影響通常很大。

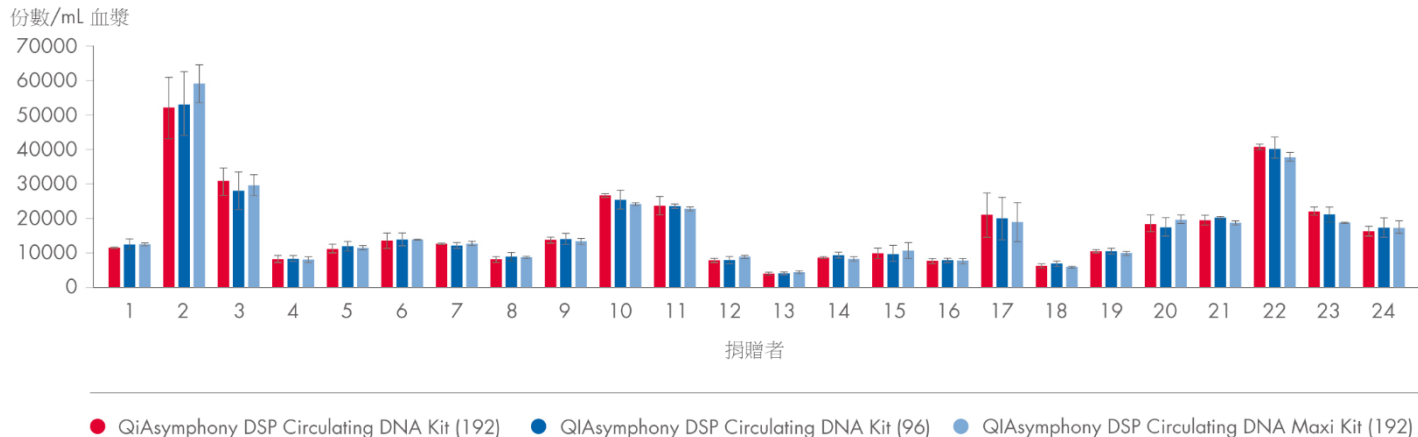


圖 10. 三個 QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit 的 ccfDNA 萃取效率相當。在 Cell-Free DNA BCT (Streck) 完成 24 名單一捐贈者捐血。使用 QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit (192) 和 QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit (96) 從 2 mL 血漿中萃取 ccfDNA，使用 QIAAsymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192) 從 6 mL 血漿中萃取 ccfDNA。對於每個試劑盒和供體，從三個重複樣本中萃取 ccfDNA，每個供體共計獲得九個資料點。使用針對 18S 編碼序列的內部 real-time PCR 檢測定量 ccfDNA 產量。結果計算為每毫升血漿輸入的目標複製數。

按計算的份數/mL 來測量，三種 QIAAsymphony DSP Circulating DNA 應用的效能是相當的。QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit (192)、QIAAsymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192) 和 QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit (96) 的差異率如表 5 所示。

表 5. 透過反變換差異和雙側 95% 信賴區間計算得出幾何平均數比率 (N = 216)

得出的差值	預估	雙側 95% 信賴界限 下限	雙側 95% 信賴界限 上限
QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit (96) / QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit (192)	1.012	0.969	1.057
QIAAsymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192) / QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit (192)	1.002	0.960	1.047
QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit (96) / QIAAsymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192)	1.009	0.964	1.056

不同下游應用的相容性

在 QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit 的開發過程中採用了範例性下游應用，以證實分離後的核酸相容於各種不同的下游應用技術，包括 Real Time-PCR（請參閱圖 1–5 和圖 8–10）、Qubit 螢光計（蛋白質檢測和高靈敏度 dsDNA 測定法）、資料庫（請參閱圖 11）和次世代定序 (NGS)。

圖 11 中的電泳圖顯示了成功的接頭連接和隨後擴增 ccfDNA 的範例。在核小體 ccfDNA 的 300 bp 主要波峰旁（每個轉接子約 165 bp 加上約 70 bp），亦可見到約 470 bp 處的雙核小體波峰。

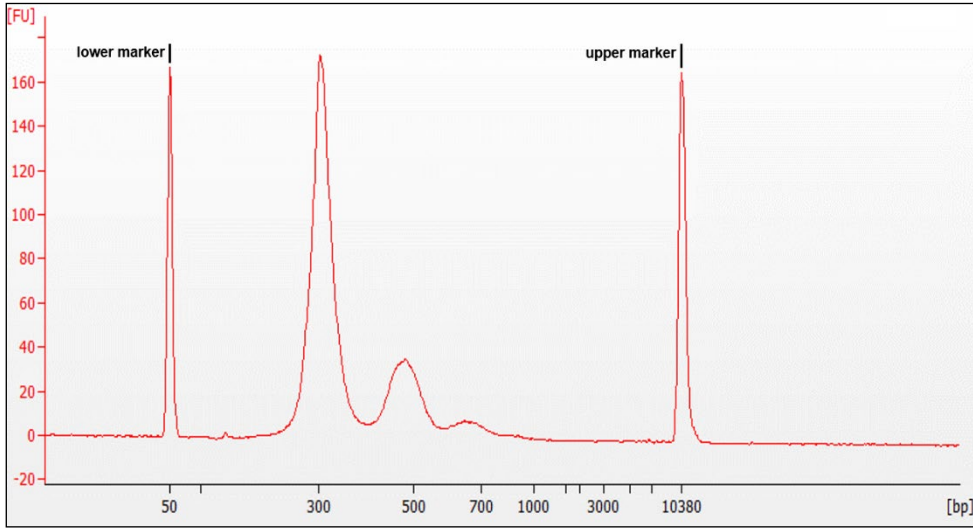


圖 11. 使用 QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit 萃取的 ccfDNA (單一捐贈者) DNA 資料庫。使用 4 mL 操作程序從 Streck 血漿萃取 ccfDNA，接著將 3.5 μ L 洗脫液移液至 NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit (Biolabs)。擴增和 AMPure XP 清理後，使用 Agilent 7500 DNA Kit 分析 1 μ L 洗脫液。

符號

使用說明或包裝及標籤上，會出現以下符號：

符號	符號定義
	本產品符合歐洲法規 2017/746 對體外診斷醫療器材的要求
	體外診斷醫療器材
	產品編號
Rn	R 是表示使用說明的修訂版，而 n 是修訂版號
	製造廠

修訂歷程記錄

修訂	說明
R1, 2022 年 6 月	第 2 版, 修訂第 1 版 <ul style="list-style-type: none">更新至第 2 版以符合 IVDR新增干擾物質、交叉污染和與下游應用的相容性等章節
R2, 2024 年 6 月	<ul style="list-style-type: none">文件版本已從修訂歷史記錄中刪除進行了更新, 以新增 QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192) 和 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96) 與 BioScript 結合使用時的 6 mL、8 mL 和 10 mL 的效能資料新增了 1 mL 樣本體積的 BioScript 效能資料

欲了解最新的許可資訊和產品特定的免責聲明, 請參閱各 QIAGEN 試劑組使用手冊或使用者手冊。QIAGEN 試劑組使用手冊和使用者手冊可從 www.qiagen.com 下載, 或向 QIAGEN 技術服務部或您當地經銷商索取。

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® (賽默飛世爾科技或其子公司); PAXgene® Blood ccfDNA Tube、PreAnalytiX; 即使沒有特別標明, 本文件中使用的註冊名稱、商標等也不應被視為不受法律保護。

HB-3034-D01-002 © 2024 QIAGEN, 保留所有權利。