

QIAsymphony[®] DSP DNA Kit 製品説明書

(性能特性)

バージョン 2

IVD

体外診断用医薬品

QIAsymphony DSP DNA Mini Kit および QIAsymphony DSP DNA Midi Kit と使用

CE

REF

937236, 937255



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

R1

性能特性の電子版は、www.qiagen.com の製品ページのリソースタブ下にあります。

導入・一般事項

QIAasymphony DSP DNA Kit は、QIAasymphony SP と組み合わせてのみ使用するものです。

QIAasymphony DSP DNA Mini Kit は、ヒト全血、軟膜、組織、およびホルマリン固定パラフィン包埋（Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE）組織由来のトータル DNA とヒト全血由来ウイルス DNA の自動精製を行うための試薬を提供します。QIAasymphony DSP DNA Midi Kit は、ヒト全血および軟膜由来トータル DNA の自動精製を行うための試薬を提供します。しかし、各採血チューブや組織タイプに対する性能特性は確立しておらず、ユーザーがバリデーションを行わなければなりません。

磁性粒子テクノロジーではタンパク質、ヌクレアーゼ、その他不純物を含まない高品質の核酸精製が可能です。精製した核酸は、増幅反応（PCR）などのダウンストリームアプリケーションにそのまま使用できます。QIAasymphony SP は、精製手順の全工程を実行します。1 回のランで、最大 96 個のサンプル、最大 24 個のバッチを処理できます。

以下に、各種アプリケーションでの性能データを紹介します。

性能特性

注：性能特性はさまざまな要素に大きく依存し、個々のダウンストリームアプリケーションとも関連性があります。QIASymphony DSP DNA Mini Kit は、一般的なダウンストリームアプリケーションと組み合わせた検証を実施済みです。しかし、多くのダウンストリームアプリケーションの前段階で、生体試料から核酸を単離する手法が用いられています。そのようなワークフローにおけるクロスコンタミネーションやラン精度などの性能特性をダウンストリームアプリケーション開発で確立することが必要です。したがって、ワークフロー全体のバリデーションを実施して、適切な性能パラメータを確立する責任はユーザーにあります。

ダウンストリームアプリケーションにおける基本性能と適合性

血液および軟膜 DNA

DNA 収量

各種採血チューブと抗凝固剤を使用して、ヒト新鮮全血および凍結全血で QIASymphony DSP DNA Mini Kit の基本性能を評価しました。3人の健康なドナー（白血球数 [White Blood Cell, WBC] $4.0 \sim 11.0 \times 10^6$ cells/ml）から全血を EDTA、10 ml BD™ Vacutainer® 16 x 100 mm (K2-EDTA)、2.7 ml Sarstedt® S-Monovette® 9NC Tube 13 x 75 mm (クエン酸)、ヘパリン、7.5 ml Sarstedt S-Monovette 15 x 92 mm (Li-Heparin) の3種類のチューブに採取しました。血液は新鮮 (2~8°Cで保存) または凍結状態 (-20°Cで保存) のものを使用しました。QIASymphony DSP DNA Mini Kit および Blood 200 DSP プロトコルを溶出量 200 μ l で使用して、ドナーおよびチューブのタイプごとに4回、サンプル 200 μ l からゲノム DNA を精製しました。分光分析により DNA 収量および純度を測定しました (図 1)。

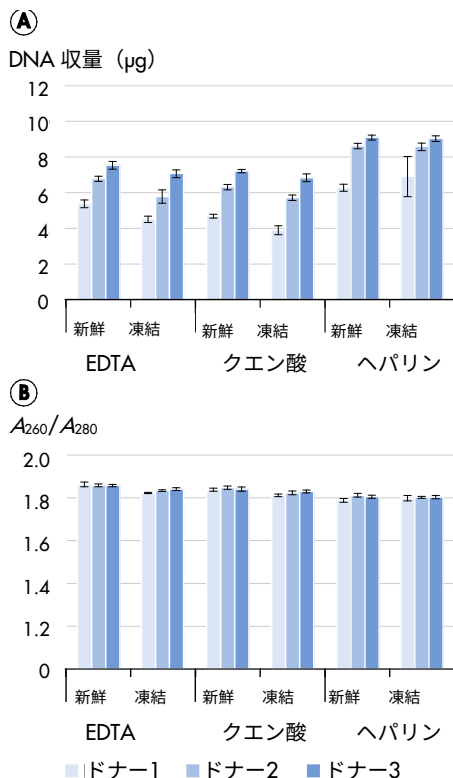


図 1. 各種サンプル採取チューブおよび抗凝固剤を使用してヒト新鮮全血および凍結全血の DNA 収量と純度を測定。A DNA 収量。グラフは DNA の絶対収量と標準偏差を示す。B DNA 純度。グラフは DNA 純度と標準偏差を示す。

DNA の完全性

LongRange PCR アッセイを使用して長鎖 PCR 産物 (5 kb) を増幅しました (図 2)。

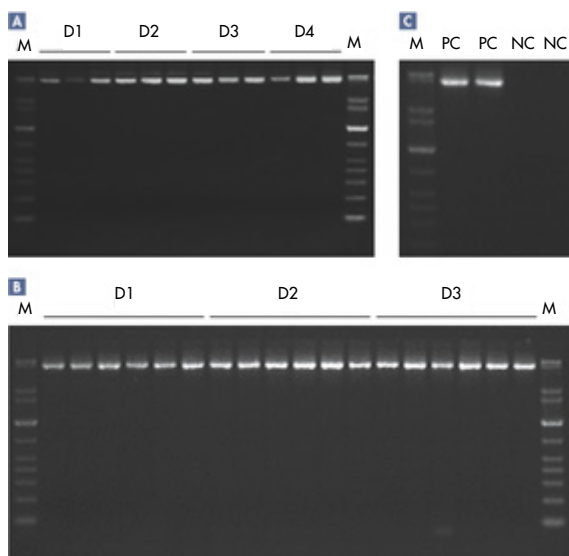


図 2. 長鎖 PCR による DNA 完全性の評価 M、QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder。A 4 人の健康なドナー (D) から全血を BD K2E チューブに採取した。QIAsymphony DSP DNA Mini Kit および blood 200 DSP プロトコルを溶出量 200 μ l で使用して、アリコート 200 μ l から 3 回ゲノム DNA を精製し、長鎖 PCR を行った。D1、ドナー1；D2、ドナー2；D3、ドナー3；D4、ドナー4。B 3 人の健康なドナーから全血を BD K2E チューブに採取して軟膜を調製した。QIAsymphony DSP DNA Mini Kit および buffy coat 200 DSP プロトコルを溶出量 200 μ l で使用して、アリコート 200 μ l から 6 回ゲノム DNA を精製した。D1、ドナー1；D2、ドナー2；D3、ドナー3。C コントロール：PC、陽性コントロール；NC、陰性コントロール。

DNA 収量と白血球数の相関関係

QIAsymphony DSP DNA Kit の血液および軟膜アプリケーションでの性能を、血液および軟膜サンプルを使用し、サンプルのタイプごとに 6 とおりの白血球数で評価しました。白血球数は、全血は 4×10^6 cells/ml \sim 11.6×10^6 cells/ml、軟膜は 2.2×10^7 cells/ml \sim 5.6×10^7 cells/ml としました。DNA 収量を分光分析により測定し、白血球数に対してプロットしました (図 3)。

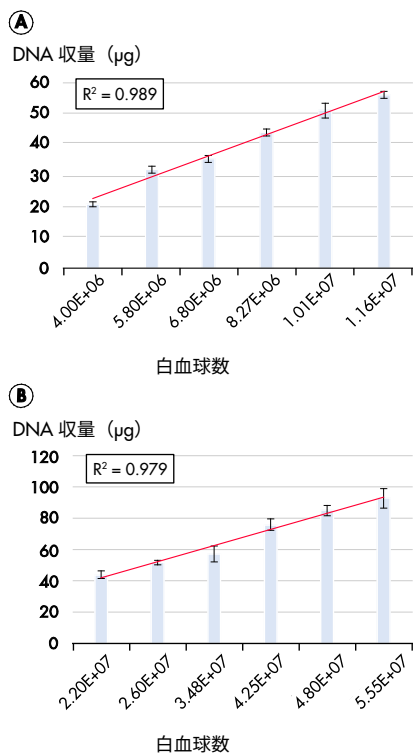


図 3. DNA 収量と白血球数の相関関係。 A QIAasymphony DSP DNA Midi Kit および blood 1000 DSP プロトコールを溶出量 500 µl で使用して、ヒト全血 1 ml からゲノム DNA を精製した。グラフは DNA の絶対収量と標準偏差を示す。 B QIAasymphony DSP DNA Midi Kit および buffy coat 400 DSP プロトコールを溶出量 400 µl で使用して、軟膜 400 µl からゲノム DNA を精製した。グラフは DNA の絶対収量と標準偏差を示す。

ウイルス感染血液

あらかじめ定量された CMV WHO 標準品を CMV 陰性ヒト全血で希釈して、ヒットレート法により評価しました。CMV 量 90 IU/ml のサンプルで 100%の検出率が確認されました (表 1)。

表 1. ウイルス感染血液アプリケーションでの QIAasymphony DSP の感度

CMV (IU/ml)	レプリケート数	ヒット数	ヒット率
350	18	18	100.00
230	32	32	100.00
115	31	31	100.00
90	32	32	100.00
60	30	24	80.00
30	30	15	50.00
15	30	10	33.33
6	21	5	23.81
2	21	2	9.52
0	15	0	0.00

1 人の健康な CMV 陰性ドナーからヒト全血を BD K2E チューブに採取し、異なる力価の CMV WHO 標準品をスパイク添加した。QIAasymphony DSP DNA Mini Kit および virus blood 200 DSP プロトコールを溶出液量 60 µl で使用してウイルス DNA を精製した。CMV real-time PCR アッセイにより溶出液を分析した。

組織および FFPE 組織

DNA 収量

QIAsymphony DSP DNA Kit の FFPE 組織アプリケーションでの性能を、切除した後のヒト脾臓 FFPE 切片（1~4 枚、10 μ m）の 6 レプリケートを用いて評価しました。QIAsymphony DSP DNA Mini Kit および低含量 DSP プロトコールを使用して DNA を抽出しました。キシレン/エタノールによる前処理法により、脱パラフィン化および溶解を行いました。溶出バッファー 50 μ l に DNA を溶出させて、分光分析により DNA 収量を測定しました（図 4）。

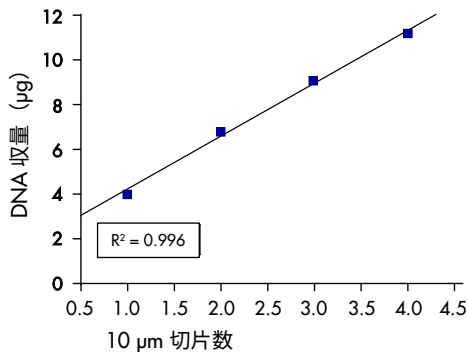


図 4. DNA 収量と FFPE 組織切片数の相関関係。 ヒト脾臓 FFPE 組織切片（1~4 枚、10 μ m）の 6 つのレプリケートを、キシレン/エタノールによる前処理により脱パラフィン化した。QIAsymphony SP、および QIAsymphony DSP DNA Mini Kit を低含量 DSP プロトコールおよび溶出量 50 μ l で使用して DNA を抽出した。

real-time PCR によるバイオマーカー変異状態の分析

ヒト大腸組織およびヒト肺組織の FFPE 切片から DNA を抽出し、バイオマーカーの変異状態を分析しました。

FFPE 組織サンプルから DNA を抽出するために、ヒト大腸切片 10 μ m、3 枚を使用してサンプルを調製しました。Deparaffinization Solution を使用して前処理を行い、低含量 DSP プロトコールを溶出量 100 μ l で使用して DNA を抽出しました。real-time PCR アッセイを用いた KRAS 検出をアッセイハンドブックに従って行い、バイオマーカーである KRAS 遺伝子変異を分析しました。コントロールアッセイの C_T 値は既定の範囲内でした。変異検出分析の結果、12SER 変異検出のカットオフ値である 8 を下回る $\Delta C_T = 4.17$ が確認され、コドン 12 にアミノ酸置換が生じていることが明らかになりました（表 2）。

表 2. FFPE 組織を用いた KRAS バイオマーカー変異分析の結果

サンプル	反応	ターゲット C _T 値	内部コントロール C _T 値	ΔC _T *
テンプレートなしのコントロール	コントロール	0.00	32.75	-
	12ALA	0.00	32.65	-
	12ASP	0.00	32.69	-
	12ARG	0.00	32.86	-
	12CYS	0.00	32.35	-
	12SER	0.00	32.76	-
	12VAL	0.00	32.41	-
	13ASP	0.00	32.26	-
Standard (標準)	コントロール	25.95	32.73	-
	12ALA	26.39	32.29	0.44
	12ASP	26.54	32.15	0.59
	12ARG	26.35	32.14	0.40
	12CYS	26.31	32.47	0.36
	12SER	26.50	32.34	0.55
	12VAL	25.80	31.92	-0.15
	13ASP	27.09	32.54	1.14
FFPE 組織 (ヒト大腸)	コントロール	24.94	31.98	-
	12ALA	n.d.	32.42	-
	12ASP	n.d.	32.73	-
	12ARG	n.d.	33.05	-
	12CYS	n.d.	32.74	-
	12SER	29.11	32.34	4.17
	12VAL	n.d.	32.81	-
	13ASP	n.d.	33.20	-

* ΔC_T = M C_T - C C_T, M: 変異, C: コントロール, n.d.: 不検出

凍結組織サンプルから DNA を抽出するために、高含量 DSP プロトコールを溶出量 200 μl で使用して、ヒト肺組織 25 mg からサンプルを調製しました。EGFR 用の real-time PCR アッセイを使用して、EGFR バイオマーカーの変異分析を行いました。アッセイハンドブックに記載のとおり、コントロールの分析と変異検出を行いました。分析の結果、変異検出のカットオフ値である 12 を下回る ΔC_T = 2.47 が確認され、EGFR 遺伝子の欠失が生じたことが明らかになりました (表 3)。

表 3. 凍結組織 EGFR バイオマーカーの変異分析の結果

サンプル	反応	ターゲット C _T 値	内部コントロール C _T 値	ΔC _T *
テンプレートなしのコントロール	コントロール	0.00	31.71	-
	T790M	0.00	32.36	-
	欠失	0.00	31.75	-
	L858R	0.00	32.05	-
	L861Q	0.00	31.77	-
	G719X	0.00	31.68	-
	S768I	0.00	32.25	-
	挿入	0.00	31.84	-
Standard (標準)	コントロール	28.78	31.05	-
	T790M	30.08	31.13	1.30
	欠失	28.23	31.19	-0.55
	L858R	27.58	30.83	-1.20
	L861Q	27.80	30.86	-0.98
	G719X	27.80	30.90	-0.98
	S768I	29.28	31.41	0.50
	挿入	28.00	31.64	-0.78
組織 (ヒト肺)	コントロール	25.76	31.23	-
	T790M	n.d.	31.99	-
	欠失	28.23	30.99	2.47
	L858R	n.d.	31.33	-
	L861Q	n.d.	31.98	-
	G719X	n.d.	32.06	-
	S768I	n.d.	31.88	-
	挿入	n.d.	31.62	-

* ΔC_T = M C_T - C C_T, M: 変異, C: コントロール, n.d.: 不検出

併行精度および再現性

血液 DNA

blood 200 DSP プロトコールを溶出量 200 μl で使用して DNA を抽出しました。併行精度を評価するために、24 サンプルを 1 バッチとして、4 バッチで構成される独立したラン 3 回 (各 96 バッチ) を、3 日に分けてオペレーター 1 名が行いました (表 4 および表 5)。

再現性を評価するために、24 サンプルを 1 バッチとして、4 バッチで構成される独立したラン 3 回 (各 96 バッチ) を、3 日に分けてオペレーター 3 名が異なる QIAasymphony SP 装置により行いました (表 6 および表 7)。

表 4. 併行精度評価の結果

ラン	バッチ	n	平均 DNA 収量 (µg)	SD	CV
1	1	24	5.32	0.22	4.22
	2	24	4.90	0.22	4.54
	3	24	4.95	0.21	4.26
	4	24	5.05	0.18	3.60
2	1	24	5.17	0.30	5.84
	2	24	4.90	0.15	3.14
	3	24	4.82	0.20	4.13
	4	24	4.87	0.17	3.52
3	1	24	5.11	0.17	3.33
	2	24	4.84	0.24	4.91
	3	24	4.87	0.16	3.38
	4	24	4.78	0.16	3.38
合計	-	288	4.96	-	-

n、レプリケート数；SD、標準偏差；CV、変動係数

表 5. 併行精度評価の精度データ

	SD	CV
同一ラン内バッチ間	0.25	4.95
全体繰り返し精度	0.26	5.18

SD、標準偏差；CV、変動係数

表 6. 再現性評価の結果

ラン	バッチ	n	平均 DNA 収量 (µg)	SD	CV
1	1	24	5.32	0.22	4.22
	2	24	4.90	0.22	4.54
	3	24	4.95	0.21	4.26
	4	24	5.05	0.18	3.60
2	1	24	5.73	0.22	3.81
	2	24	5.56	0.26	4.63
	3	24	5.40	0.20	3.63
	4	24	5.46	0.21	3.89
3	1	24	5.73	0.26	4.62
	2	24	5.54	0.24	4.40
	3	24	5.41	0.18	3.34
	4	24	5.49	0.17	3.16
合計	-	288	5.38	-	-

n、レプリケート数；SD、標準偏差；CV、変動係数

表 7. 再現性評価の精度データ

	SD	CV
同一ラン内バッチ間	0.25	4.73
全体繰り返し精度	0.38	7.03

SD、標準偏差；CV、変動係数

比較性能分析

血液 DNA

QIAsymphony DSP DNA blood システムの性能を、EZ1® DSP DNA blood システムおよび QIAamp® DNA Blood Mini Kit の手動調製手順と比較分析しました。異なる血液サンプルから DNA を生成して DNA 収量を分析しました (図 5)。

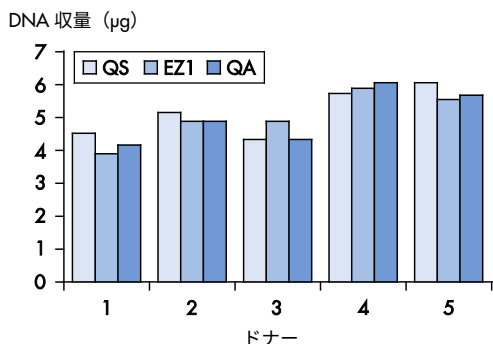


図 5. 血液 DNA 精製システムの DNA 収量比較。5 人の健康なドナーから全血を BD K2E チューブに採取した。すべてのメソッドでサンプル注入量 200 µl、溶出量 200 µl とした。QS、QIAsymphony DSP DNA Mini Kit および blood 200 DSP プロトコール；EZ1、EZ1 Advanced XL および EZ1 DSP DNA Blood Kit；QA、QIAamp DNA Blood Mini Kit。グラフはサンプルごとの DNA の絶対収量を示す。

組織および FFPE 組織

QIAsymphony DSP DNA Mini Kit の性能を、QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (手動) および QIAamp DSP DNA Mini Kit と比較分析しました。サンプル材料として FFPE 組織、新鮮組織、および凍結組織を使用しました。手動および自動サンプル調製、および DNA 収量の定量を同時に行いました。QIAsymphony DSP DNA Mini Kit、QIAamp DSP DNA Mini Kit (組織)、および QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (FFPE 組織) を使用して、新鮮/凍結サンプルおよび FFPE 組織サンプルから抽出した DNA 収量を図 6 に示します。

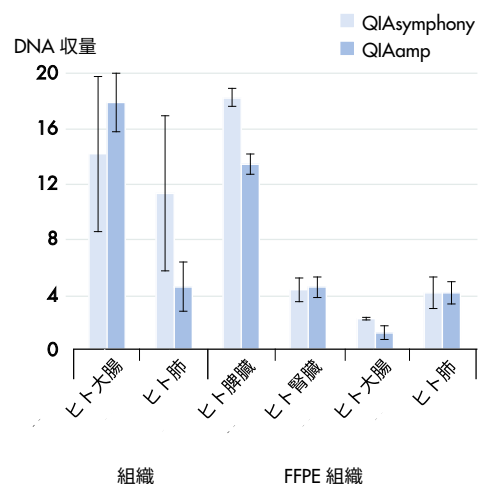


図 6. 組織および FFPE 組織サンプルからの DNA 抽出。新鮮および凍結組織は、ヒト肺サンプルと大腸サンプルを 25 mg ずつ 6 枚に切り分けた。各組織を 3 切片ずつ使用して、QIAsymphony SP と高含量 DSP プロトコールによりサンプルを調製した。QIAamp DSP DNA Mini Kit により、残りのサンプルから DNA を抽出した。DNA を 200 µl で溶出し、分光分析により DNA 収量を測定した。FFPE 組織から DNA を抽出するために、ヒトのさまざまな臓器から FFPE 組織 10 µm、3 切片など 12 のレプリケートを作成した。6 枚のサンプルを Deparaffinization Solution による前処理に供し、QIAsymphony SP と低含量 DSP プロトコールによりサンプルを調製した。QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit により、残りのサンプルから DNA を抽出した。DNA を 50 µl で溶出し、分光分析により DNA 収量を測定した。グラフは DNA の絶対収量と標準偏差を示す。

サンプル注入量および溶出量範囲

血液 DNA

DNA 血液アプリケーションで白血球数 $5.0 \sim 8.0 \times 10^6$ cells/ml の血液ドナーから採取したサンプルを使用して、異なるサンプル注入量および溶出量での比較を行った。

8 人の健康なドナーから全血を BD K2E チューブに採取した。QIAasymphony DSP DNA Mini/Midi Kit と、DNA blood 200 DSP プロトコール（溶出量 200 μ l）、DNA blood 400 DSP プロトコール（溶出量 400 μ l）、および DNA blood 1000 DSP プロトコール（溶出量 500 μ l）を使用してそれぞれ 6 回 DNA を精製した（図 7）。

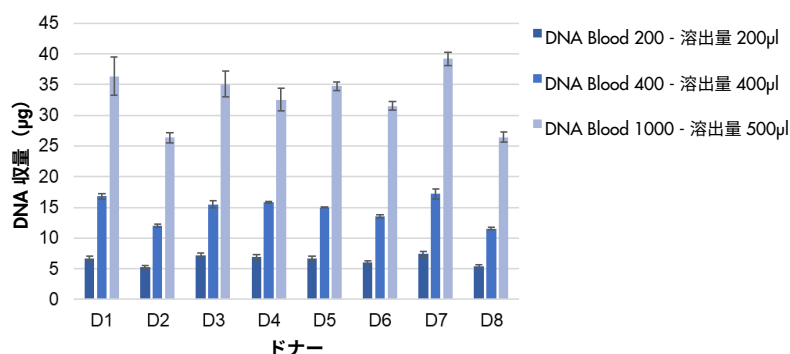


図 7. 血液 DNA 精製システムの異なるサンプル注入量および溶出量での比較 8 人の健康なドナーから全血を BD K2E チューブに採取した。DNA blood 200 プロトコール（溶出量 200 μ l）、DNA blood 400 プロトコール（溶出量 400 μ l）、および DNA blood 1000 プロトコール（500 μ l）により DNA を抽出した。DNA 収量を分光分析により測定した。グラフは各ドナー DNA の絶対収量（平均値および標準偏差）を示す。

ウイルス感染血液

3 人の健康なドナー（白血球数 $4.0 \sim 11.0 \times 10^6$ cells/ml）から全血を BD K2E チューブに採取して、CMV 標準品をスパイク添加しました（力価 3.7 log コピー/ml）。QIAasymphony DSP DNA Mini Kit および virus blood 200 DSP プロトコールを使用して、4 とおりの溶出量でそれぞれ 7 回ウイルス DNA を精製しました（図 8）。

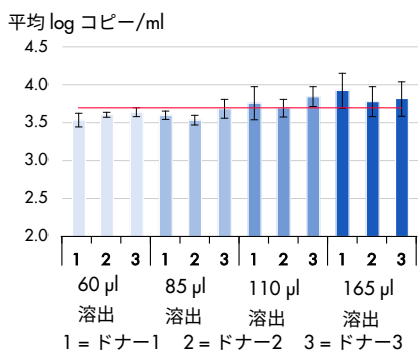


図 8. 異なる溶出量でのウイルス DNA の定量比較 各ドナーのサンプル溶出液を、溶出量（60、85、110、165 μ l）ごとに CMV real-time PCR アッセイにより分析した。赤線は目標力価を、グラフは 1 ml あたりの平均 log コピー数と標準偏差を示す。

溶出液の安定性

注：溶出液の安定性はさまざまな要素に大きく依存し、個々のダウンストリームアプリケーションとも関連性があります。QIASymphony DSP Mini および Midi Kit は、一般的なダウンストリームアプリケーションと組み合わせた検証を実施済みですが、ラボで使用する個々のダウンストリームアプリケーションの使用説明書を参照するか、ワークフロー全体のバリデーション（またはその両方）を実施して、お客様の責任において適切な保存条件を確立してください。

血液および軟膜 DNA

DNA 血液アプリケーションの溶出液安定性を評価するために、DNA Blood 200 プロトコール（溶出量 200 μ l）および DNA Blood 1000 プロトコール（溶出量 500 μ l）で QS によりランを実行しました。溶出液を 2ml Sarstedt Tube に入れて室温、2~8°C、-20°C、および -80°C で保存しました。分光分析により DNA 収量および純度を測定しました。ゲル電気泳動および LongRange PCR アッセイにより DNA の完全性を分析しました（図 9）。

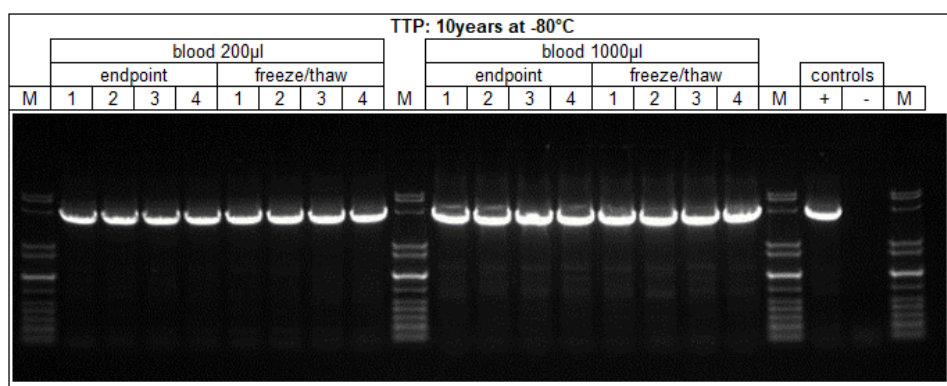


図 9. 血液 DNA 溶出液の安定性。DNA Blood 200 μ l および 1000 μ l プロトコールにより DNA を精製した。溶出液を 2ml Sarstedt Tube に入れて -80°C で保存した後、4 回分析を行った。Long-Range PCR により DNA の完全性を評価した。図は 10 年間保存後の結果を示す。M、QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder。

軟膜アプリケーションの溶出液安定性を評価するために、BC 400 μ l プロトコール（溶出量 200 μ l）で QS によりランを実行しました。溶出液を 2ml Sarstedt Tube および Elution Micro Tube Rack に入れて室温、2~8°C、-20°C、および -80°C で保存しました。さらに、溶出液を最大 3 回の凍結解凍サイクルに供しました（図 10）。分光分析により DNA 収量および純度を測定しました。ゲル電気泳動および LongRange PCR アッセイ（反応量 50 μ l）により DNA の完全性を分析しました。

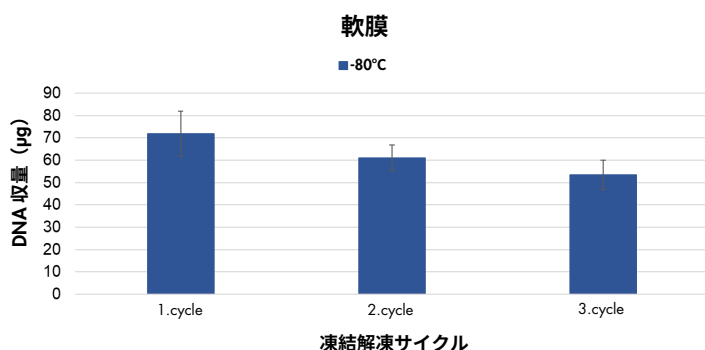


図 10. 軟膜溶出液の凍結解凍サイクル。DNA BC 400 μ l プロトコールにより DNA を精製した。EDTA 血液から軟膜を生成した。2 ml Sarstedt Tube に溶出液を保存した。同一の溶出液を 3 回の凍結解凍サイクルに供して、各評価時点での DNA 収量を分光分析により測定した。グラフは DNA の絶対収量（平均値および標準偏差）を示す。

ウイルス感染血液

ウイルス感染血液アプリケーションの溶出液安定性を評価するために、Virus Blood 200 プロトコール（溶出量 60 μ l）で QS によりランを実行しました。K₂ EDTA 血液に市販の CMV 標準品（力価 2.7 log copies/ml）をスパイク添加したものをサンプル材料として使用しました。溶出液を 2ml Sarstedt Tube に入れて 2~8°C、-20°C、および -80°C で保存した後、CMV リアルタイムアッセイを使用して分析を行いました（図 11）。以下は、複数の評価時点における結果です。

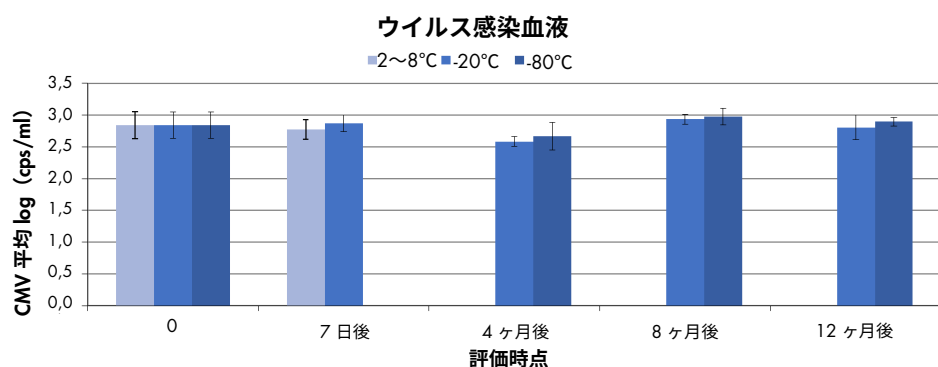


図 11. ウイルス感染血液アプリケーションでの溶出液の安定性。EDTA 血液サンプルに市販の CMV 標準品をスパイク添加し、Virus Blood 200 プロトコールにより精製した。溶出液を Elution Micro チューブラックおよび 2 ml Sarstedt Tube に入れて異なる温度で保存した。評価時点ごとに 4 回分析を行った。グラフは CMV 力価（平均 log 値および標準偏差）を示す。

組織

組織アプリケーションでの溶出液の安定性を、Tissue HC 200 μ l プロトコール（溶出量 200 μ l）により評価した。新鮮なウシ肝臓をサンプル材料として使用した。溶出液を 2ml Sarstedt Tube および Elution Micro Tube Rack に入れて室温、2~8°C、-20°C、および -80°C で保存しました。分光分析により DNA 収量および純度を測定した（図 12）。ゲル電気泳動により DNA の完全性を分析しました。

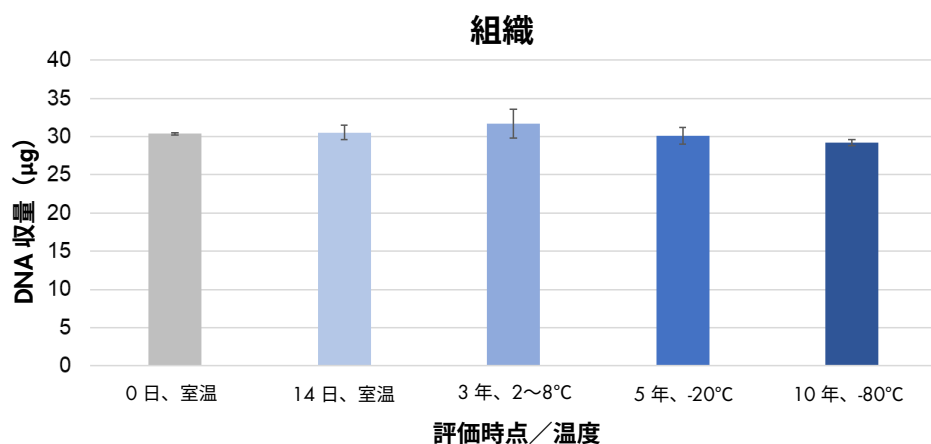
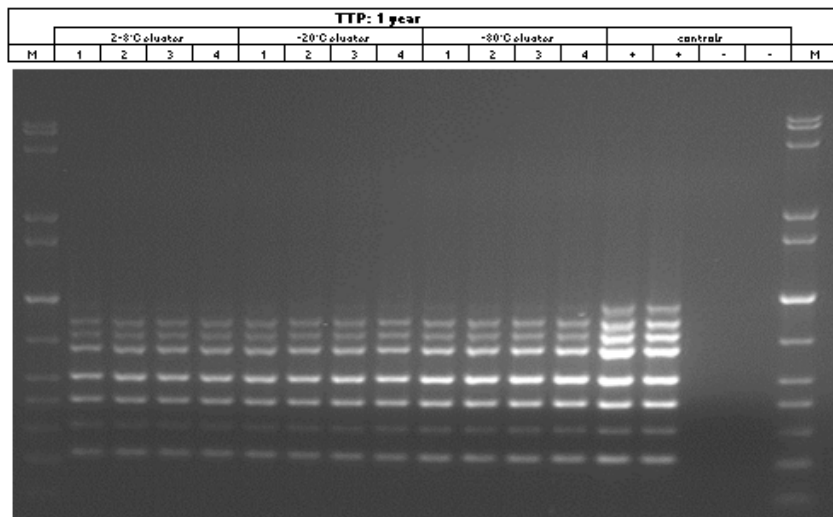


図 12. 組織溶出液の安定性。DNA Tissue HC プロトコールおよび溶出量 200 μ l で DNA を精製した。新鮮なウシ肝臓をサンプル材料として使用した。溶出液を Elution Micro チューブラックおよび 2 ml Sarstedt Tube に入れて複数の温度で保存した。評価時点ごとに 4 回分析を行った。DNA 収量を分光分析により測定した。グラフは DNA の絶対収量（平均値および標準偏差）を示す。

FFPE 組織

FFPE 組織アプリケーションでの溶出液の安定性を、Tissue LC 200 μ l プロトコール（溶出液 100 μ l）により評価しました。市販のヒト FFPE 組織をサンプル材料として使用しました。溶出液を 2ml Sarstedt Tube および Elution Micro Tube Rack に入れて室温、2~8°C、-20°C、および -80°C で保存しました。インハウスのヒト 8 ブレックス PCR アッセイにより溶出液を分析しました（図 13）。以下は、2 つの評価時点における結果です。

A :



B :

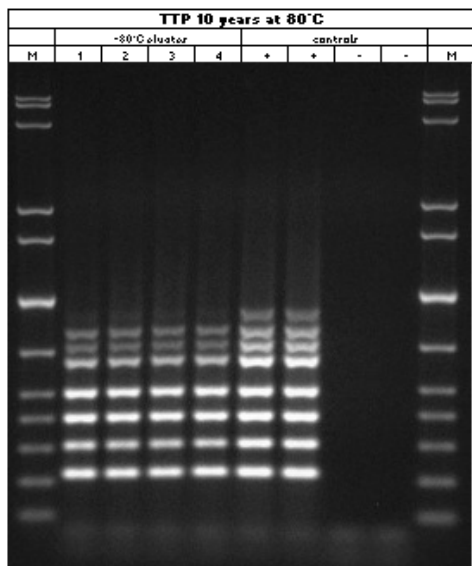


図 13. FFPE 組織の溶出液の安定性。 DNA Tissue LC プロトコールにより DNA を精製した。市販の FFPE 組織をサンプル材料として使用した。溶出液を Elution Micro Tube Rack および 2 ml Sarstedt Tube に入れて異なる温度で保存した。評価時点ごとに 4 回分析を行った。インハウスのヒト 8 ブレックス PCR アッセイにより溶出液を分析した。

妨害物質

全血中に存在する可能性がある妨害物質が DNA 血液アプリケーション、ウイルス感染血液アプリケーション、および組織アプリケーションの性能に及ぼす影響を、以下の物質を加えることにより評価しました。

表 8.各種アプリケーションの潜在的妨害物質の評価

妨害物質	濃度	血液	ウイルス感染血液	組織
ビリルビン	200 mg/L	√	√	√
ヘモグロビン	200 g/L	√	√	
トリグリセリド	30 g/L	√	√	√
タンパク質	120 g/L	√	√	√

注：√はそれぞれの潜在的妨害物質に対してサンプル材料を評価した場合を示す。

ヘモグロビン（200 g/l）およびタンパク質（120 g/l）は、血液サンプル中の既存量を測定して、記載の濃度（200 g/l、120 g/l）になるようにそれぞれ追加しました。ビリルビン（200 mg/l）およびトリグリセリド（30 g/l）は、記載の濃度になるようにそれぞれ総量を加えました。

組織に対しては、各物質の総量を溶解物に直接加えて、使用する組織サンプル中のビリルビン、トリグリセリド、またはタンパク質濃度は測定しませんでした。

潜在的妨害物質（薬品など）とその濃度は、ダウンストリームアプリケーションや患者が過去に受けた治療によって大きく異なることから、ダウンストリームアプリケーションの検証で、QIAsymphony DSP DNA Mini および Midi Kit を使用して調査する必要があります。

注：一般的なダウンストリームアプリケーションを使用した試験により、抽出された核酸の品質評価を実施済みです。ただし、ダウンストリームアプリケーションによって要求される純度（潜在的な妨害物質の有無や濃度）が異なる可能性があることから、ダウンストリームアプリケーションにおいて QIAsymphony DSP DNA Mini および Midi Kit を使用するワークフローを開発する場合は、該当する物質の同定および試験と濃度測定を行う必要があります。

注：QIAsymphony DSP DNA Midi Kit の開発において、分析パフォーマンスに対するヘパリンの悪影響を示唆する徴候は観察されませんでした。しかし、ISO 20186-2:2019(E)によると、採血チューブに含まれるヘパリンは単離した核酸の純度に影響を及ぼす可能性があります。また、一部のダウンストリームアプリケーションでは、溶出液へのキャリアオーバーが発生して妨害物質になる可能性があります。したがって、ワークフローに対するヘパリンの悪影響がないことをお客様の責任において確認してください。

血液および軟膜 DNA

DNA 血液アプリケーションで、最大のサンプル注入量に対応する DSP DNA 1000 プロトコルを溶出量 200 µl および 500 µl で使用して、評価を行いました。

溶出液の分光分析を行い、DNA 収量および純度を測定しました。real-time PCR アッセイおよびエンドポイント PCR アッセイを使用して、PCR 適合性を評価しました。

表 9 に示すいずれの物質も妨害物質ではありません。しかし、高濃度 (> 30 g/l) のトリグリセリドを含有する血液サンプルは、ゲノム DNA 収量が低下する可能性があります。

ウイルス感染血液

ウイルス感染血液アプリケーションで、DSP Virus Blood 200 プロトコルを溶出量 60 μ l で使用して評価を行いました。CMV 陰性血液サンプルに、市販の CMV 標準品を 500 コピー/ml (低含量) および 1×10^4 コピー/ml (高含量) スパイク添加しました (図 14)。

CMV real-time PCR アッセイにより溶出液を分析しました。

表 9 に示すいずれの物質も妨害物質ではありません。しかし、高濃度 (> 30 g/l) のトリグリセリドを含有する血液サンプルは、ウイルス DNA の精製量が低下する可能性があります。

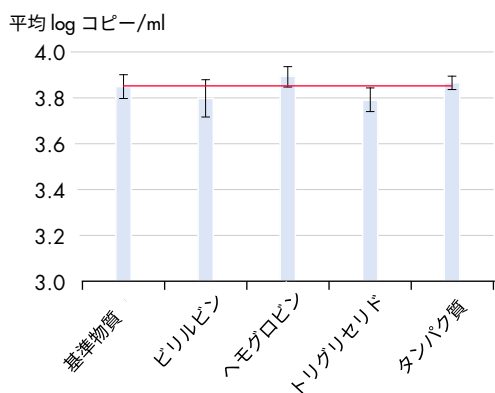


図 14. 妨害物質の評価。 1 人の健康なドナーから全血を BD K2E チューブに採取して CMV 標準品 (力価 4.0 log コピー/ml) をスパイク添加した。潜在的妨害物質を加えた 5 つのサンプルを評価し、QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit および virus blood 200 DSP プロトコルを溶出量 165 μ l で使用して、各サンプルから 4 回ウイルス DNA を精製した。CMV real-time PCR アッセイにより溶出液を分析した。赤線は、いずれの妨害物質もスパイク添加していない基準物質の力価測定値を示す。グラフは、1 ml あたりの平均 log コピー数と標準偏差を示す。

組織

DSP DNA HC プロトコルを溶出量 200 μ l で使用して、DNA 組織 (新鮮および凍結) の評価を行いました。

溶出液の分光分析を行い、DNA 収量および純度を測定しました。real-time PCR アッセイを使用して、PCR 適合性を評価しました。

表 9 に示すいずれの物質からもサンプル調製に対する悪影響は特定されませんでした。

FFPE 組織

DSP DNA LC プロトコールを溶出量 50 μ l で使用して、FFPE 組織の評価を行いました。

各物質（表 9 参照）を溶解物に直接加えました。

表 9. 各種アプリケーションの潜在的妨害物質の評価

妨害物質	溶解物中の濃度
キシレン	~11%
エタノール	~11%
Deparaffinization Solution	~11%
パラフィン	0.1 μ M 切片

溶出液の分光分析を行い、DNA 収量および純度を測定しました。real-time PCR アッセイおよびインハウスのヒト 8 プレックス PCR アッセイを使用して、PCR 適合性を評価しました。

表 9 に示すいずれの物質からもサンプル調製に対する悪影響は特定されませんでした。

クロスコンタミネーション





血液 DNA

QIAsymphony DNA Blood アプリケーションのクロスコンタミネーションのリスクを評価するために、陰性サンプルのみのバッチを割り込ませる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に評価）を実行しました。QIAsymphony SP により、96 サンプルを含むランを 4 回実施しました。男性血液（白血球数 $\geq 1.0 \times 10^7$ cells/ml）および女性血液（白血球数 $4.0 \times 10^6 \sim 9 \times 10^6$ cells/ml）をモデルシステムとして使用しました。サンプル調製には最大のサンプル量に対応する blood 1000 μ l プロトコールを使用しました。real-time PCR による溶出液中の Y 染色体の分析により、抽出ラン中の女性陰性サンプルのコンタミネーションの可能性を評価しました。

サンプル間、バッチ間、およびラン間のキャリーオーバーによるクロスコンタミネーションは検出されませんでした。

図記号

本書では次の図記号を使用しています。本使用説明書、パッケージ、およびラベルに使用されるすべての図記号については、ハンドブックをご覧ください。

図記号	図記号の定義
	この製品は、体外診断用医療機器規則(EU)2017/746 に準拠しています。
	体外診断用医療機器
	カタログ番号
Rn	R は使用説明書の改訂を示し、n は改訂番号を示す。
	製造者

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">体外診断用医療機器規則への適合に伴い、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」、「溶出液の安定性」、「ダウンストリームアプリケーションに対する適合性」のセクションを追加

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販売代理店からも入手可能です。

商標：QIAGEN®, Sample to Insight®, QIA Symphony®, QIAamp®, EZ1®, UltraRun® (QIAGEN Group); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.). 本文中で使用され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あっても、法的保護の対象から外れることはありません。

06/2022 HB-3029-D01-001 © 2022 QIAGEN. 無断複写・転載を禁じます。

