

# QIAsymphony<sup>®</sup> DSP Circulating DNA Kit 使用 説明書 (性能特性)

**IVD**

体外診断用

使用用途

	$\Sigma$	REF	バージョン
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, ドイツ

R2

性能特性は電子版でもご利用いただけます。[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) の製品ページのリソースタブをご覧ください。

## 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 機器と組み合わせての使用のみ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 (ccfDNA プロファイル安定剤を使用した PreAnalytiX の PAXgene® Blood ccfDNA Tube、 Streck® の Cell-Free DNA BCT® など、また ccfDNA プロファイル安定剤非使用の EDTA チューブなど) 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。

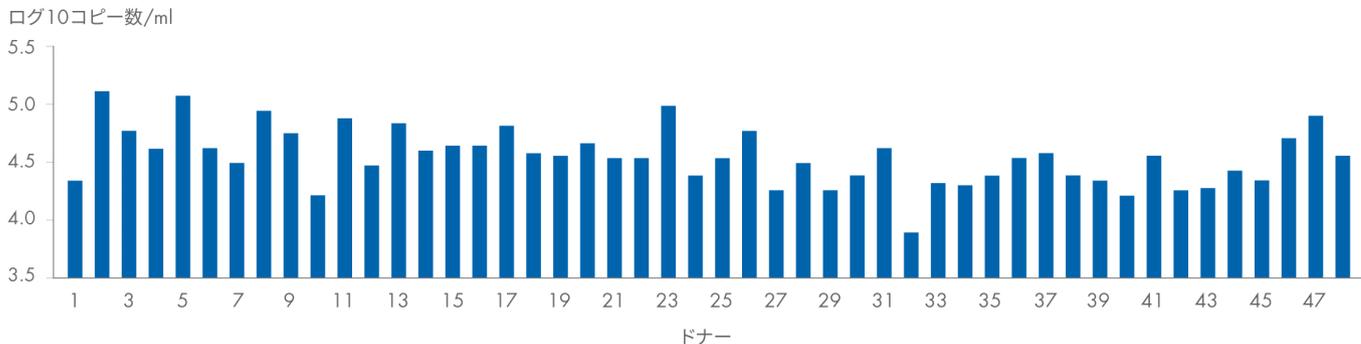
QIAsymphony SP は、精製手順の全工程を実行します。1 回のランで、24 バッチ、最大 96 個のサンプルを処理できます。尿サンプルには、手動のサンプル前処理が必要な場合があります。

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た場合の QS DSP Circulating DNA Kit について確立されています。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前工程として使用されるため、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。

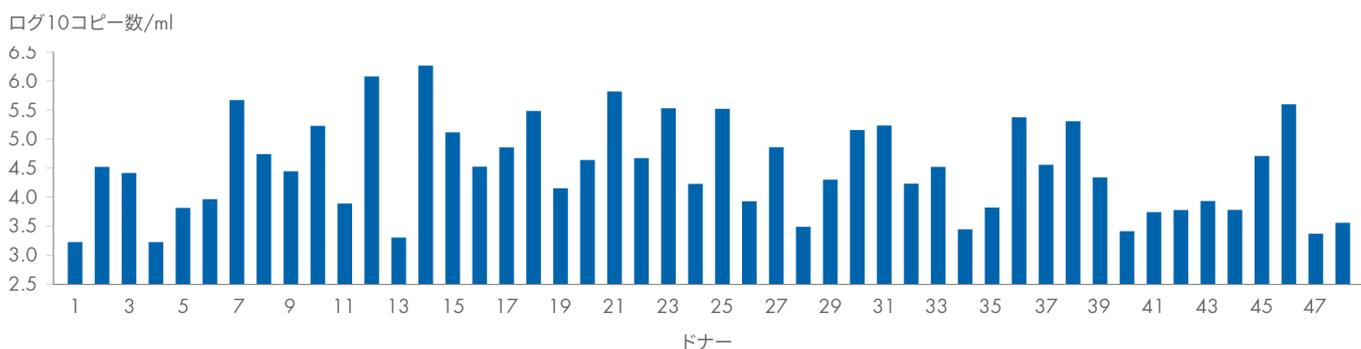
## 基本的な性能

QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit の基本的性能は、48 人の単一ドナーで、 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 コード配列に社内 real-time PCR アッセイを用いて測定しました。

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。

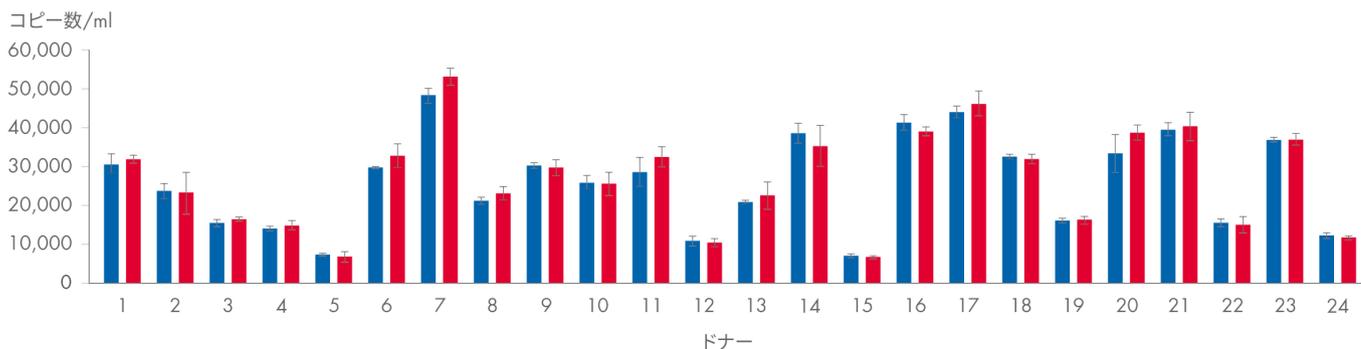


**図 1. 48 人の単一ドナーの血漿からの ccfDNA 収量。** 48 人の単一ドナーから、Cell-Free DNA BCT (Streck) を用いて採血した。QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit を使用して、血漿 4 mL から ccfDNA を抽出した。ccfDNA の収量は、18S コード配列に配列に社内 real-time PCR アッセイを用いて測定した。結果は、血漿インプット 1 mL あたりの標的コピーとして計算した。



**図 2. 48 人の単一ドナーの尿からの ccfDNA 収量。** 48 人の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た。QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit を使用して、尿 4 mL から ccfDNA を抽出した。ccfDNA の収量は、18S コード配列に配列に社内 real-time PCR アッセイを用いて測定した。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た。

さらに、QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit の基本性能を、手動 ccfDNA 抽出法である QIAamp DSP Circulating NA Kit (カタログ番号 61504) と比較して評価しました。この目的のために、24 人の単一ドナーの PAXgene® Blood ccfDNA チューブ (CE-IVD) から生成した血漿 4 mL 容量から ccfDNA を抽出し、両方の ccfDNA 抽出キットで 75  $\mu$ L の ccfDNA を溶出しました。ccfDNA の収量は、18S リボソーム RNA コード配列に社内 real-time PCR アッセイを用いて測定した。図 3 に見られる収量 (コピー/mL) の差は、血漿において典型的に見られる、ccfDNA の濃度がドナーに強く依存していることを反映しています。



● QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit ● QIAamp DSP Circulating NA Kit

**図 3. QIAamp DSP Circulating NA Kit と比較したときの QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit の ccfDNA 抽出性能。** 24 人の単一ドナーから採取した血漿は、PAXgene Blood ccfDNA チューブを使用して安定化した。血漿 4 mL から QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit および QIAamp DSP Circulating NA Kit を使用して、ccfDNA を抽出した。ccfDNA の収量は、18S コード配列に配列に社内 real-time PCR アッセイを用いて測定した。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た。

自動および手動の ccfDNA 抽出キットの性能は、計算された 1 ミリリットルあたりのコピー数で評価すると同等です。QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit と QIAamp DSP Circulating NA Kit の幾何平均の比を表 1 に示します（参照キットは QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit）。

表 1. QIAamp DSP Circulating NA Kit / QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit の幾何平均比 (N = 213)

パラメータ	値
コピー/mL 計算値の幾何平均の推定比	1.074
95%信頼限界の下限	1.048
95%信頼限界の上限	1.100

## ラン精度

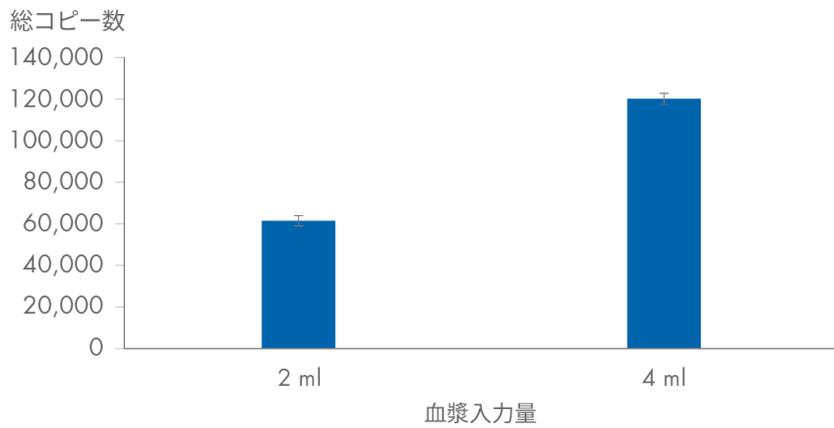
EDTA 血漿からヒト ccfDNA を抽出するために、変動係数 (Coefficients of Variations)、CV を決定しました。正確な分析を行うために、18S リボソームコード配列に社内 real-time PCR アッセイを用いて ccfDNA を定量しました。合計で、4 つのバッチでそれぞれ 10 回、QIAasymphony をランしました (1 バッチあたり 8 レプリケート)。精度データを表 2 に示します。

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

表 3. 2 mL および 4 mL プロトコールの差 (N=256)

パラメータ	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ールの性能は同等です。

## 1~10 mL のサンプル量からの直線的 ccfDNA 抽出効率

ヒト血漿と尿プールから抽出した内因性 ccfDNA を使用して、QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit で、1~10 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。血漿は Streck Cell-Free DNA BCT® から生成され、尿は Streck® Urine Preservative を使用して安定化しました。安定化した血漿と尿は最低 10 人のドナーから集められ、使用時まで -20°C で保存されました。QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit と 1 mL から 10 mL までのサンプル容量の circDNA プロトコールを組み合わせ、1、2、4、6、8、10 mL の容量から CcfDNA を抽出しました。各入力ボリュームに対して、12 個の複製が抽出されました。QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit 手順の直線範囲は、18S コード配列に社内 real-time PCR アッセイを用いて測定しました (図 5)。

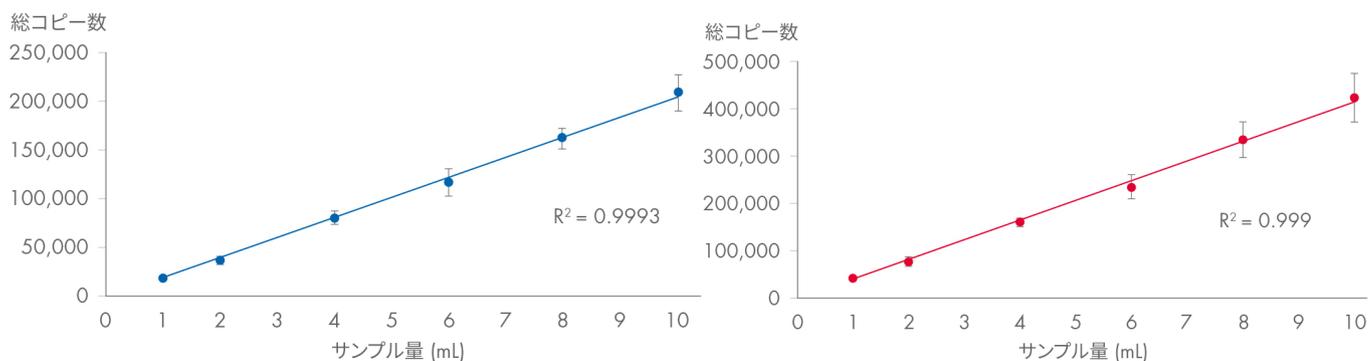


図 5. 1~10 mL のサンプル量からの直線的 ccfDNA 抽出効率。ccfDNA プロトコールの直線範囲は、1、2、4、6、8 および 10 mL プロトコールを使用して決定した。安定化血漿 (左図、青い点) と安定化尿 (右図、赤い点) から CcfDNA を抽出した。ccfDNA の収量は、18S コード配列に社内 real-time PCR アッセイを用いて定量した。結果は、プロトコールごとの全コピー数として計算した。

## サイズ分布

サンプル出力のサイズ分布を評価するために、QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit を使用して 4 mL のサンプル入力から ccfDNA を抽出し、75 µl で溶出した後、Agilent High Sensitivity DNA Chip を用いて、溶出液 1 µl を Agilent® 2100 Bioanalyzer でサイズ分析しました。合計 5 回の独立したレプリケートが実行されました。図 6A に血漿、図 7 に尿の代表的な DNA プロファイルを示します。

図 6A 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 7 の尿のエレクトロフェログラムは、約 145~250 bp の範囲で約 160 bp に主要ピークを示しています。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 7 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。

ヒストン結合 DNA（モノヌクレオソーム）の約 165bp のピークに加え、大量のサンプルから ccfDNA を抽出すると、マルチヌクレオソームの約 350bp と 500bp を超えるピークが示されています。図 6B）。この目的のために、PAXgene Blood ccfDNA Tube から生成した 1~10 mL の血漿から ccfDNA を QIASymphony DSP Circulating DNA Kit を使用して抽出し、75  $\mu$ l で溶出した後、1  $\mu$ l の溶出液を Agilent® Cell-free DNA Screen Tape でサイズ分析に供しました。

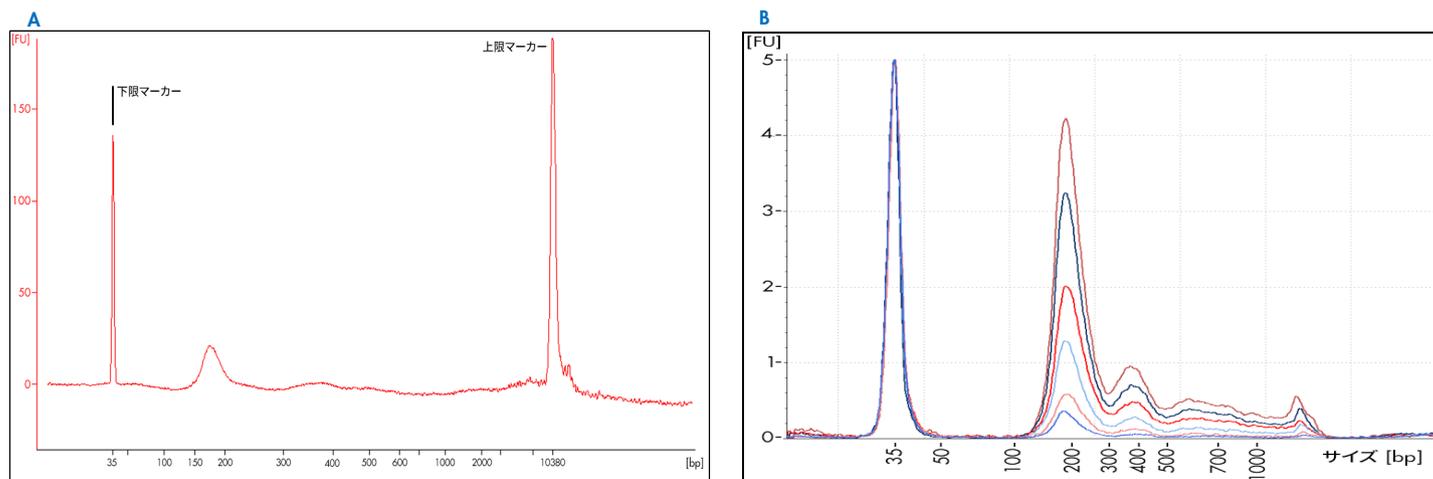


図 6. 血漿由来 ccfDNA のサイズ分布（バイオアナライザープロファイル）。(A) QIASymphony DSP Circulating DNA Kit を使用して、EDTA 血漿 4 mL から ccfDNA を抽出し、溶出液 1  $\mu$ l を Agilent High Sensitivity DNA Chip 分析に供した。x 軸：塩基対サイズ (bp)、y 軸：蛍光単位 (FU)。 (B) QIASymphony DSP Circulating DNA Kit を使用して、PAXgene® Blood ccfDNA tube から生成した 1 mL、2 mL、4 mL、6 mL、8 mL および 10 mL の血漿から ccfDNA を抽出し、1  $\mu$ l の溶出液を Agilent Cell-free DNA Screen Tape 分析に供した。異なる色の 6 つのサイズプロファイルは、抽出に使用される 1~10 mL の血漿入力量に応じて、ccfDNA サイズ分布の検出感度が増加することを示している。x 軸：塩基対サイズ (bp)、y 軸：蛍光単位 (FU)、35 bp のピーク：下限マーカー。

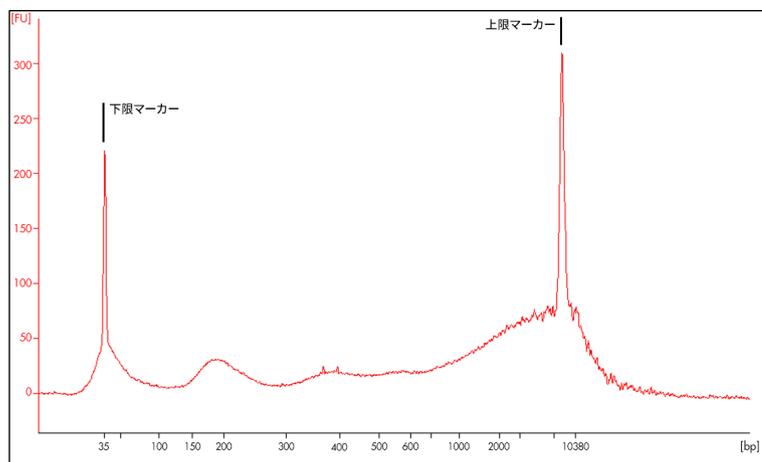
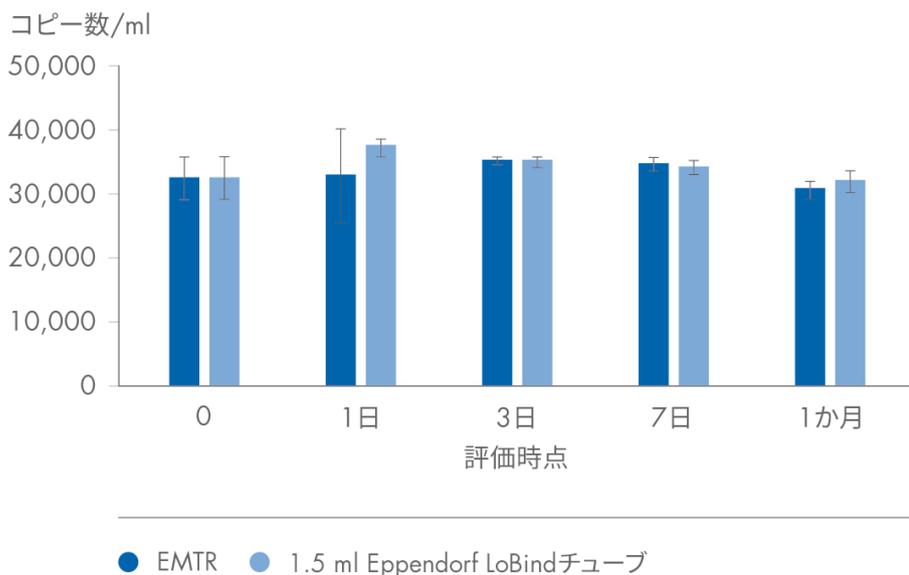


図 7. 尿由来 ccfDNA のサイズ分布（バイオアナライザープロファイル）。QIASymphony DSP Circulating DNA Kit を使用して、尿 4 mL から ccfDNA を抽出し、溶出液 1  $\mu$ l を Agilent High Sensitivity DNA Chip 分析に供した。x 軸：塩基対サイズ (bp)、y 軸：蛍光単位 (FU)。

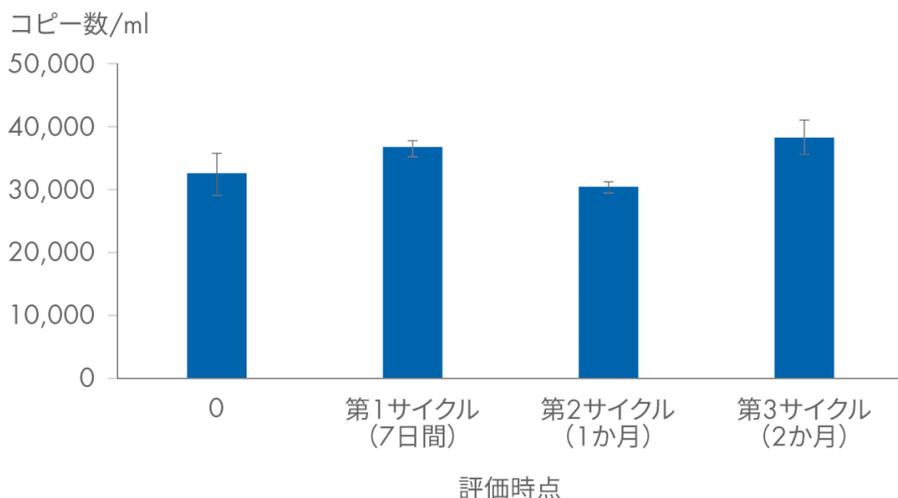
## 溶出液の安定性

ヒト EDTA 血漿プールから抽出した ccfDNA 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 (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) で保存しました。溶出液を 8 回繰り返し分析しました。溶出液中の DNA の安定性は、18S リボソーム RNA コード配列に社内 real-time PCR アッセイを用いて測定しました。

2~8°C での溶出液の安定性は、最長 1 カ月の保存期間、または保存形式の影響を受けませんでした (図 8)。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 9)。



**図 8. 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 ccfDNA の安定性。** QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit を使用して、EDTA 血漿から ccfDNA を抽出し、さまざまなテストタイムポイントで 2~8°C で保存した。ccfDNA の収量は、18S コード配列に社内 real-time PCR アッセイを用いて測定した。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た。



**図 9. -15°C~-30°C で保存した溶出液中の ccfDNA の安定性 (3 回の凍結融解サイクルを含む)。** QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit を使用して、EDTA 血漿から ccfDNA を抽出し、1.5 mL Eppendorf LoBind チューブに -15°C~-30°C で保存した。ccfDNA 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た。ccfDNA の収量は、18S コード配列に社内 real-time PCR アッセイを用いて測定した。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 4 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 コード配列に社内 real-time PCR と、高感度 dsDNA アッセイを用いた Qubit®フルオロメーターを使用して分析しました。

表 4. 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 およびガンマグロブリン	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)

表 4 に記載する物質はいずれも妨害物質ではありませんが、以下は例外となります。高濃度のガンマグロブリン (> 30 g/L) を含む血漿サンプルは、循環無細胞 DNA の回収率を低下させる可能性があります。

注釈：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、抽出した核酸の品質評価の検査を実施しました。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 system のクロスコンタミネーションのリスクについて、1 mL または 2 mL 容量ごとに別個のサンプル転送ステップが 1 回、2 回、5 回含まれる 1 mL、4 mL、10 mL のサンプル容量のプロトコールについて分析しました。QIASymphony SP 装置で、交代型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）を使用して、96 サンプルによるラン（1 mL と 4 mL）を 3 回、48 サンプルのラン（10 mL）を 6 回実行しました。1 mL と 4 mL のサンプル量では、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。10 mL のサンプル量では、血漿（陰性サンプル）と、血漿 1 mL あたり 1.0E+05 コピーの濃度の GFP 遺伝子から回収した 1000 bp DNA 断片をスパイクした血漿（陽性サンプル）をモデルシステムのサンプル材料として使用しました。

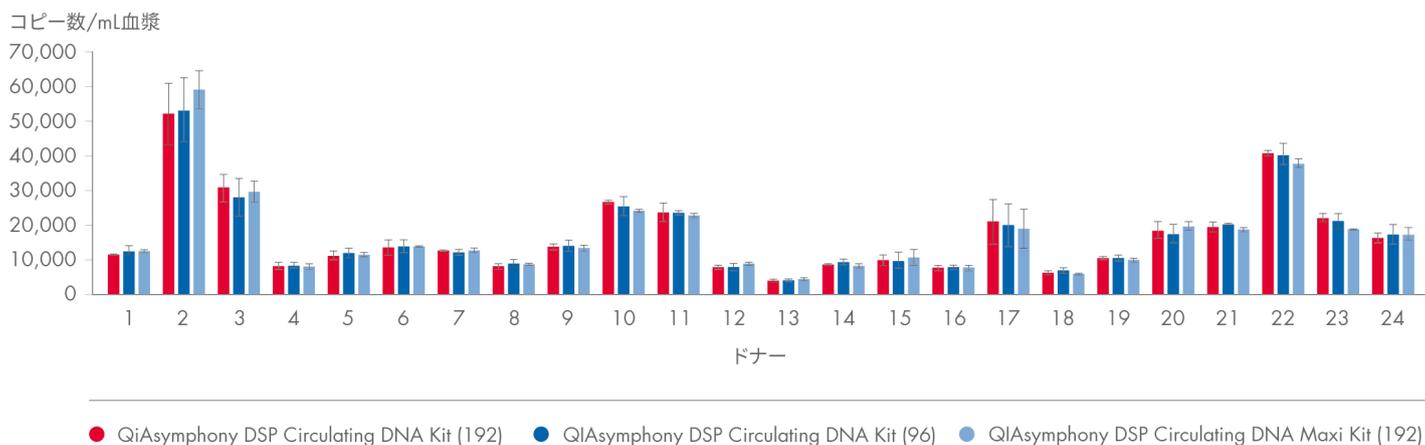
抽出実行中の陰性血漿サンプルの潜在的コンタミネーションは、その後の Y 染色体特異的遺伝子 SRY1（1 mL および 4 mL プロトコール）および GFP 特異的配列（10 mL プロトコール）に real-time PCR を用いた溶出液の分析によって評価しました。

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。

### 3つのQIASymphony DSP Circulating DNA Kitを使った同等のccfDNA抽出

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (192)、カタログ番号 937556、QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96)、カタログ番号 937555、および QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192)、カタログ番号 937566 の同等性能を 24 人の単一ドナーから採取した 2 mL または 6 mL の Streck 血漿から ccfDNA を抽出して評価しました。ccfDNA の収量は、18S リボソーム RNA コード配列に社内 real-time PCR アッセイを用いて測定しました。(図 10)。

収量 (コピー/mL) の差は、同じ血漿量で通常見られる ccfDNA の濃度がドナーによって大きく異なることを反映しています。



**図 10. 3つのQIASymphony DSP Circulating DNA KitのccfDNA抽出効率は同等。** 24人の単一ドナーから Cell-Free DNA BCT (Streck) を用いて採血した。CcfDNAは、2 mL 血漿からは QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (192) および QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96) を使用して抽出し、6 mL 血漿からは QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192) を使用して抽出した。各キットおよびドナーについて、ccfDNAは3回のレプリケートから抽出したため、ドナーごとに合計9つのデータポイントが得られた。ccfDNAの収量は、18Sコード配列に配列に社内 real-time PCR アッセイを用いて測定した。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た。

3つのQIASymphony DSP Circulating DNA アプリケーションの性能は、計算されたコピー数/ミリリットルで評価すると同等です。QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (192)、QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192)、QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96) の差の比率を表 5 に示します。

**表 5. 戻し変換後の差異と両側 95%信頼区間から幾何平均の比を求める (N = 216)**

計算された差異	推定値	両側 95%信頼区間下限	両側 95%信頼区間上限
QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96) / QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (192)	1.012	0.969	1.057
QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192) / QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (192)	1.002	0.960	1.047
QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96) / QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192)	1.009	0.964	1.056

## 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 1~5 および図 8~10 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 11 参照)、次世代シーケンシング (Next Generation Sequencing、NGS) を含む広範囲に及ぶ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。

エレクトロフェログラム図 11 は、アダプター連結とそれに続く ccfDNA の増幅が成功した例を示します。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。

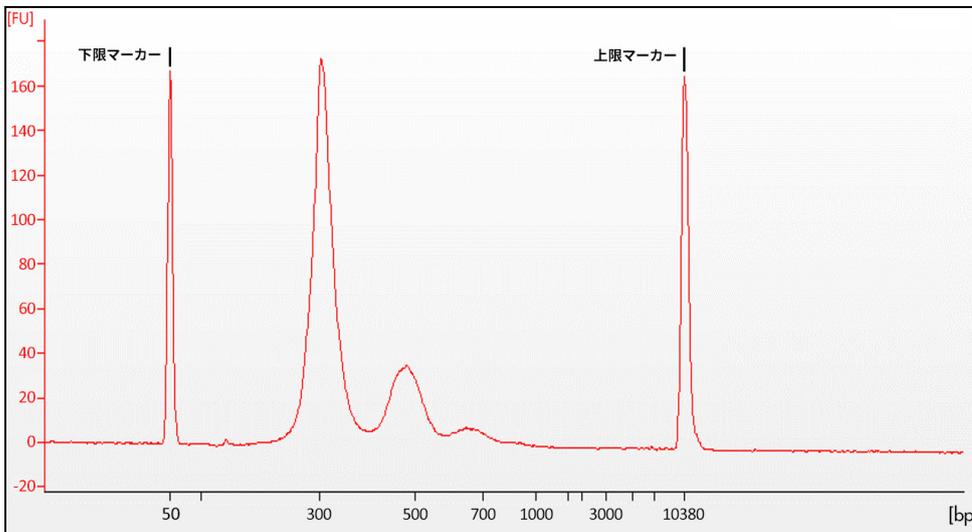


図 11. QIASymphony DSP Circulating DNA Kit で抽出した ccfDNA (単一ドナー) の DNA ライブラリー。4 mL プロトコールを使用して Streck 血漿から ccfDNA を抽出し、続いて溶出液 35  $\mu$ l を NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit (Biolabs) に移した。増幅と AMPure XP クリーンアップ後、溶出液 1  $\mu$ l を Agilent 7500 DNA Kit を使用して分析した。

## 図記号

使用説明書やパッケージ、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
	この製品は、体外診断用医療機器に関する欧州規則 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
Rn	R は使用説明書の改訂を示し、n は改訂番号を示す
	製造元

## 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"><li>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</li><li>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</li></ul>
R2、2024年6月	<ul style="list-style-type: none"><li>ドキュメントのバージョンは改訂履歴から削除されました</li><li>6 mL、8 mL、10 mL のサンプル容量について、BioScripts と組み合わせた QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192) および QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96) の性能データが追加されました。</li><li>1 mL サンプル量に対する BioScript の性能データを追加</li></ul>

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 キットハンドブックとユーザーマニュアルは [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) から入手できます。または、QIAGEN テクニカルサービスやお近くの代理店にご依頼ください。

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) ; NEBNex® (New England Biolabs, Inc.) ; Qubit® (Thermo Fisher Scientific またはその子会社) ; PAXgene® Blood ccfDNA Tube、PreAnalytiX; 本文中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-D01-002 © 2024 QIAGEN, all rights reserved.