

# QIAsymphony<sup>®</sup> DSP Circulating DNA Kit 使用说明（性能特点）

**IVD**

供体外诊断使用

适用于

	$\Sigma$	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, 德国

R2

性能特点提供电子版，可以在 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) 产品页面的“资源”标签下找到。

## 一般说明

The QIASymphony DSP Circulating DNA 系统是一个即时可用的体外系统，用于从人血浆和尿液中提取的循环游离 DNA (ccfDNA) 的定性纯化。

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 旨在仅配合 QIASymphony SP 仪器使用。

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 含有试剂，可对从各种人血浆（使用 ccfDNA 图谱稳定剂，如 PreAnalytiX 的 PAXgene® Blood ccfDNA Tube; Streck® 的 Cell-Free DNA BCT®，以及不使用 ccfDNA 图谱稳定剂，如 EDTA 试管）和人尿液（使用和不使用 ccfDNA 图谱稳定剂）中提取的 ccfDNA 进行全自动同步纯化。然而，每个采血管的性能特点尚未得到确定，必须由用户验证。

纯化的 ccfDNA 具有广泛的下游应用，例如 PCR 化学，荧光定量检测或 NGS。

QIASymphony SP 执行纯化操作程序的所有步骤。一次运行以 24 批次最多处理 96 份样本。尿样可能需要进行人工样本预处理。

提示：性能特点高度依赖于各种因素，并与特定的下游应用相关。QS DSP Circulating DNA Kit 可与示例性下游应用联用。然而，从生物标本中分离核酸的方法是各种下游应用前端，例如，作为下游应用开发的一部分，任何此类工作流都需要建立性能参数（譬如，交叉污染和运行精度）。因此，用户有责任验证整个工作流程，以确立适合的性能参数。

## 基本性能

使用 48 个单一供体，从 4 mL Streck 血浆和 4 mL 稳定化尿液中提取 ccfDNA 以评估 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 的基本性能。ccfDNA 产量已通过内部 real-time PCR 检测 18S 核糖体 RNA 编码序列确定。

图 1（4 mL 血浆）和图 2（4 mL 尿液）的产量差异（log<sub>10</sub> 份数/mL）说明，相同容量的不同样本材料，ccfDNA 的浓度受不同供体的影响很大。

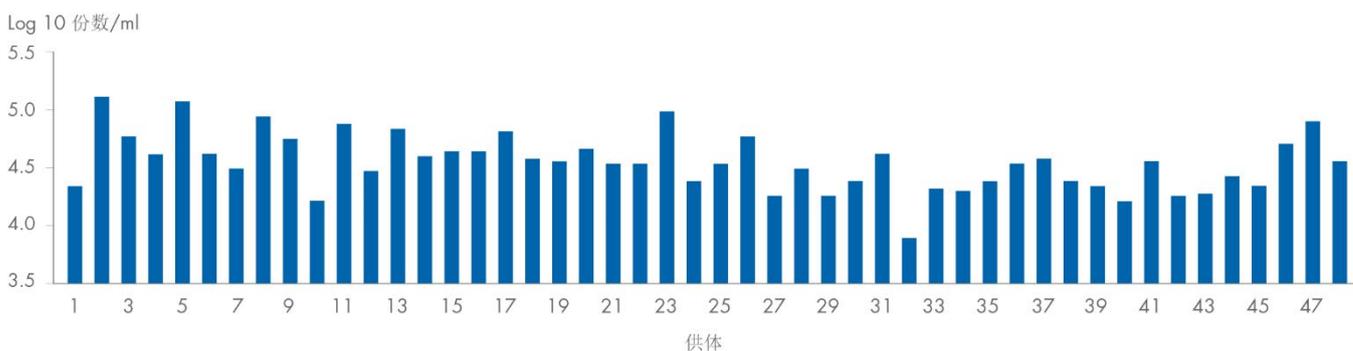
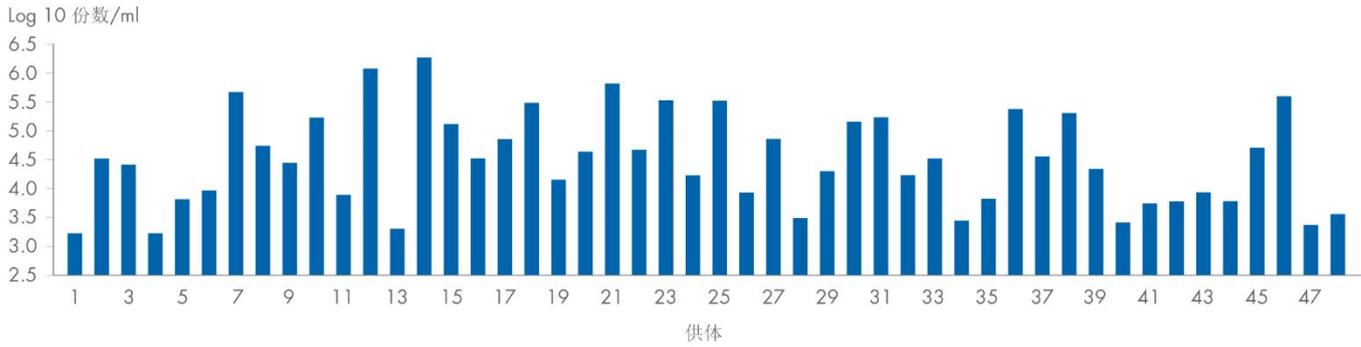
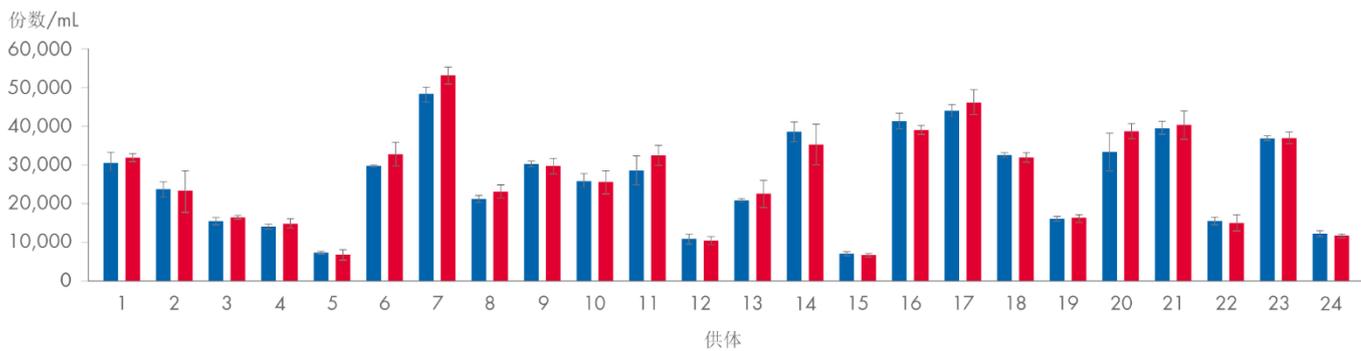


图 1.来自 48 个单一供体的血浆的 ccfDNA 产量。使用 Cell-Free DNA BCT (Streck) 采集 48 个单一供体的供血。使用 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 从 4 mL 血浆中提取 CcfDNA。ccfDNA 产量是通过内部 real-time PCR 检测 18S 编码序列来量化的。结果按每 mL 血浆输入的目标份数计算。



**图 2.来自 48 个单一供体的尿液的 cfDNA 产量。**使用 Cell-Free DNA Urine Preserve® (Streck) 对 48 个单一供体的尿液进行稳定化。使用 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 从 4mL 尿液中提取 CcfDNA。ccfDNA 产量是通过内部 real-time PCR 检测 18S 编码序列来量化的。结果按每 ml 尿液输入的目标份数计算。

此外，还与手动 ccfDNA 提取方法 QIAamp DSP Circulating NA Kit（目录编号 61504）进行了比较，评估了 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 的基本性能。为此，从 24 个单一供体的 PAXgene® Blood ccfDNA 试管 (CE-IVD) 中获取血浆，用于从 4 mL 体积中提取 ccfDNA，并在 75  $\mu$ L 的 ccfDNA 提取试剂盒中洗脱 ccfDNA。ccfDNA 产量已通过内部 real-time PCR 检测 18S 核糖体 RNA 编码序列确定。图 3 中的产量差异（份数/mL）说明，在血浆中，ccfDNA 的浓度受不同供体的影响通常很大。



● QIASymphony DSP Circulating DNA Kit ● QIAamp DSP Circulating NA Kit

**图 3.QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 与 QIAamp DSP Circulating NA Kit 具有同等的 ccfDNA 提取性能。**使用 PAXgene Blood ccfDNA 试管对从 24 个单一供体采集的血浆进行稳定化处理。使用 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 和 QIAamp DSP Circulating NA Kit 从 4 mL 血浆中提取 CcfDNA。ccfDNA 产量是通过内部 real-time PCR 检测 18S 编码序列来量化的。结果按每 mL 血浆输入的目标份数计算。

自动和手动 ccfDNA 提取试剂盒的性能相同（按计算的份数/mL 来测量）。QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 和 QIAamp DSP Circulating NA Kit 的几何平均数比率如表 1 所示（参考试剂盒为 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit）。

**表 1.QIAamp DSP Circulating NA Kit / QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 的几何平均数比率 (N = 213)**

参数	数值
基于计算的份数/ml 估算的几何平均数比率	1.074
95% 置信度下限	1.048
95% 置信度上限	1.100

## 运行精度

确定从 EDTA 血浆进行的人 ccfDNA 提取的变化系数 (CV)。为了进行精确分析，ccfDNA 是通过内部 real-time PCR 检测 18S 核糖体编码序列来量化的。总计 4 个批次（每批 8 个复制品）中，每批执行 10 次 QIAasymphony 运行。表 2 中显示了精确数据。

表 2. 精度估计分析

精度	CV (%)
批次内	11.67
重复性	13.14
中间精度	13.14
总精度	14.12

## 2 mL 和 4 mL 操作规程的同等性能

使用从人类 EDTA 血浆池提取的内源性 ccfDNA 评估 QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit 2 mL 和 4 mL 样本输入的操作规程性能是否相同。总计 4 个批次（每批 8 个复制品）中，每批单独执行 8 次 QIAasymphony 运行。使用内部 real-time PCR 检测 18S 编码序列，确定 QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit 操作程序的线性范围（图 4）。表 3 显示 2 和 4 mL 方案的差异率（参考方案的样本输入为 4 mL）。

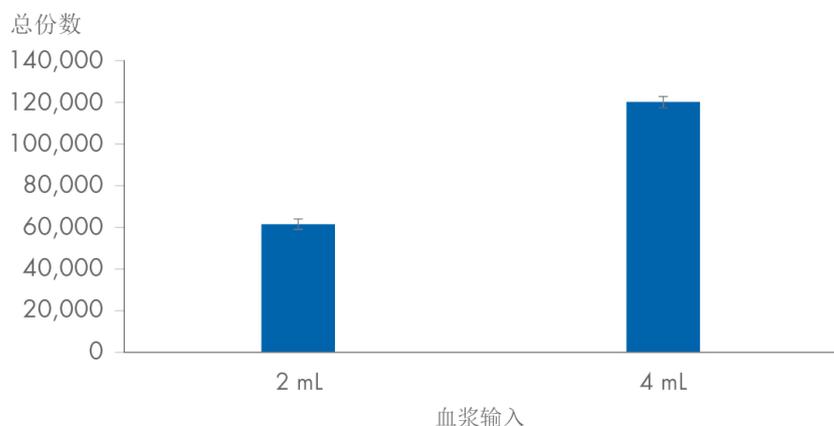


图 4.2 和 4 mL 样本输入方案的同等性能。使用 2 和 4 mL 方案来确定 ccfDNA 方案的线性范围。ccfDNA 产量是通过内部 real-time PCR 检测 18S 编码序列来量化的。结果按每个方案的总份数计算。

表 3.2 和 4 mL 方案之间的差异 (N = 256)

参数	数值
基于计算的份数/mL 估算的几何平均数比率	1.01
95% 置信度下限	0.92
95% 置信度上限	1.11
总精度	14.12

2 mL 和 4 mL 样本输入的方案性能相同（按计算的份数/mL 来测量）。

## 1–10 mL 样本体积的线性 ccfDNA 提取效率

使用从人血浆和尿液池提取的内源性 ccfDNA 评估 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 的 1–10 mL 样本输入的方案性能是否相同。血浆获取自 Streck Cell-Free DNA BCT<sup>®</sup>，而尿液使用 Streck<sup>®</sup> Urine Preservative 进行稳定。从至少 10 个供体中采集稳定的血浆和尿液，并储存在 -20°C 温度下，直至使用。对于 1 mL 至 10 mL 样本体积，请结合使用 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 和 circDNA 方案，从 1、2、4、6、8 和 10 mL 体积提取 ccfDNA。对于每个输入体积，提取 12 份。使用内部 real-time PCR 检测 18S 编码序列，确定 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 操作程序的线性范围（图 5）。

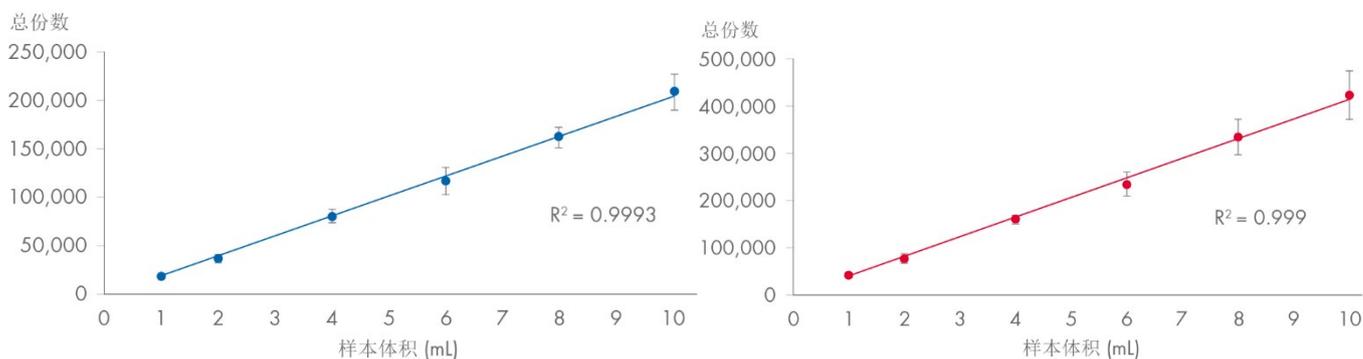


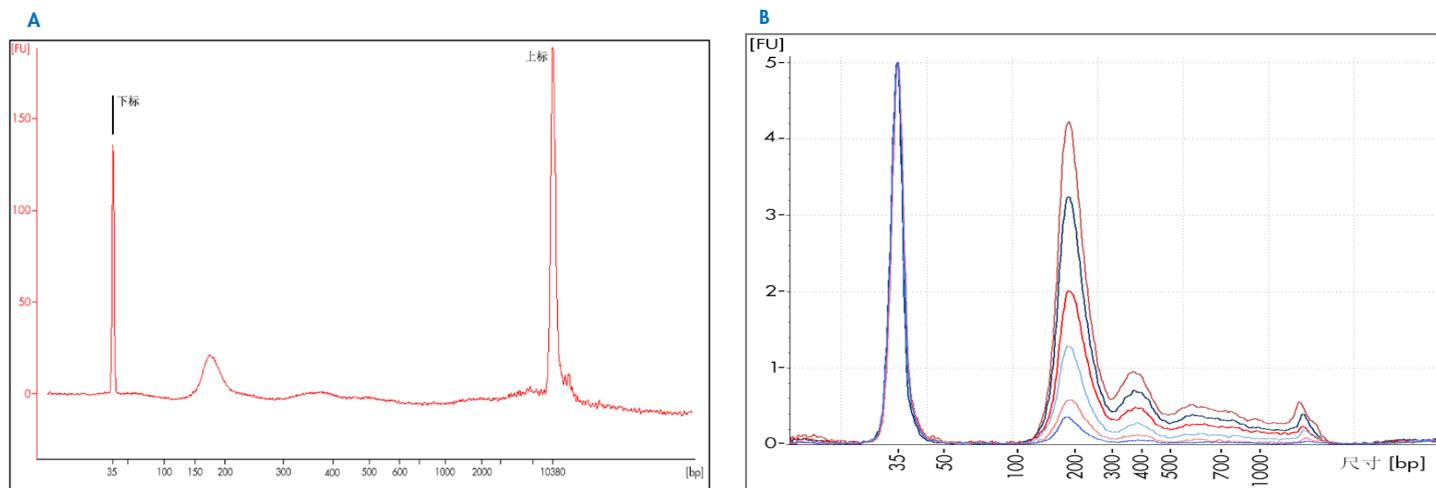
图 5.1–10 mL 样本体积的线性 ccfDNA 提取效率。使用 1、2、4、6、8 和 10 mL 方案来确定 ccfDNA 方案的线性范围。从稳定的血浆（左图，蓝点）和稳定的尿液（右图，红点）中提取 ccfDNA。ccfDNA 产量是通过内部 real-time PCR 检测 18S 编码序列来量化的。结果按每个方案的总份数计算。

## 大小分布

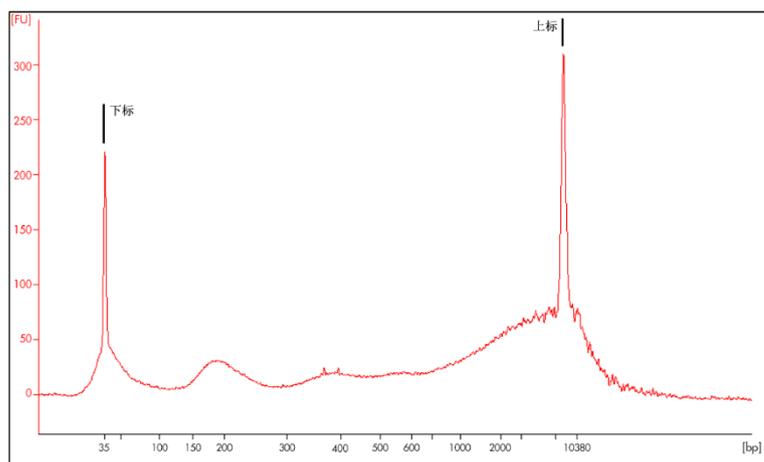
为了评估样本输出的大小分布，使用 QIASymphony DSP Circulating DNA 试剂盒从 4 mL 的样本输入中提取 ccfDNA，以 75  $\mu$ L 进行洗脱，然后通过使用 Agilent High Sensitivity DNA Chip（Agilent 高灵敏度 DNA 芯片）的 Agilent<sup>®</sup> 2100 Bioanalyzer（Agilent<sup>®</sup> 2100 生物分析仪）对 1  $\mu$ L 的洗脱液进行大小分析。共计进行了 5 次独立重复分析。图 6A 显示血浆的一种代表性 DNA 图谱，图 7 显示尿液的一种代表性 DNA 图谱。

图 6A 中血浆的电泳图显示，经常观察到的峰值位于 ~165 bp，范围从 145 bp 到 196 bp，处于核小体中组蛋白结合 DNA 的长度范围内。图 7 尿液电泳图显示，处于 ~160 bp 的主要峰值更宽泛，范围从 ~145 bp 到 250 bp。此外，对于尿液，存在范围从 ~20 bp 到 100 bp（处于下标记峰水平）的第二峰值，这表明存在破碎度较高的 ccfDNA 片段。而且，图 7 显示存在大量 DNA 长片段（长度自 ~2 kb 起）。在尿样中常常发现高丰度的此类基因组 DNA 片段，最可能的原因是尿液中存在的细胞所释放的基因组 DNA。

除了组蛋白结合 DNA（单核小体）的 ~165 bp 峰外，从大量样本中提取的 ccfDNA 还发现了 ~350 bp 和 >500 bp 的多核小体的峰（图 6 B）。为此，使用 QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit 提取 PAXgene Blood ccfDNA Tubes 的 1–10 mL 血浆中的 ccfDNA，以 75  $\mu$ l 进行洗脱，然后使用 Agilent® Cell-free DNA Screen Tape 对 1  $\mu$ l 洗脱液进行大小分析。



**图 6.取自血浆的 ccfDNA 的大小分布（生物分析仪图谱）。** (A) 使用 QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit 从 4 mL EDTA 血浆中提取 ccfDNA；使用 Agilent High Sensitivity DNA Chip 对 1  $\mu$ l 洗脱液进行分析。x 轴：碱基对尺寸 (bp)；y 轴：荧光单位 (FU)。(B) 使用 QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit 从 PAXgene® Blood ccfDNA 试管的 1 mL、2 mL、4 mL、6 mL、8 mL 和 10 mL 血浆中提取 ccfDNA；对 1  $\mu$ l 洗脱液进行 Agilent Cell-free DNA Screen Tape 分析。不同颜色的六个尺寸图谱说明，检测 ccfDNA 大小分布的灵敏度提高，这取决于用于提取的 1–10 mL 血浆样本量。x 轴：碱基对尺寸 (bp)；y 轴：荧光单位 (FU)，35 bp 处的峰：下标。

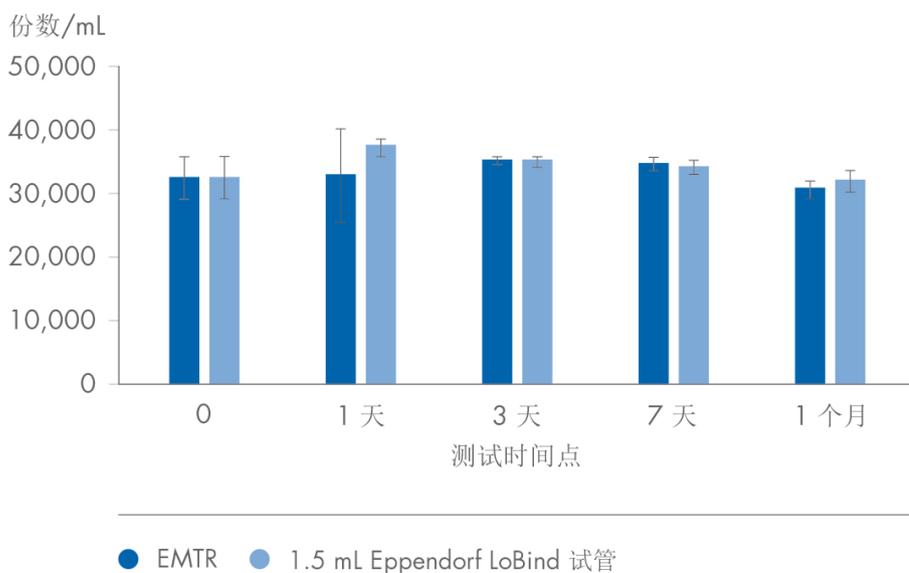


**图 7.取自尿液的 ccfDNA 的大小分布（生物分析仪图谱）。** 使用 QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit 从 4 mL 尿液中提取 ccfDNA；使用 Agilent High Sensitivity DNA Chip 对 1  $\mu$ l 洗脱液进行分析。x 轴：碱基对尺寸 (bp)；y 轴：荧光单位 (FU)。

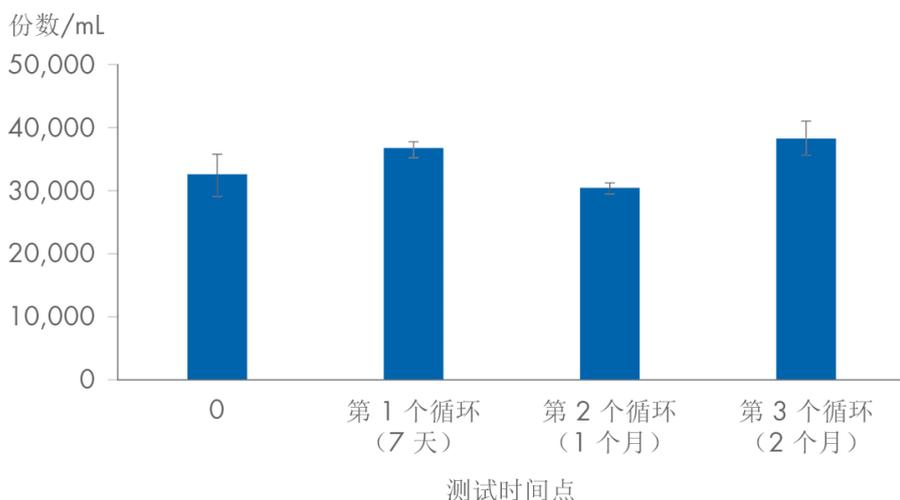
## 洗脱液稳定性

使用从人 EDTA 血浆池提取的 ccfDNA，评估 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 的洗脱液稳定性。以 2 种不同的洗脱架格式存储洗脱液：QIAGEN® EMTR (Elution Microtubes CL 96 (洗脱微试管 CL 96)；目录编号 19588) 和 1.5 mL Eppendorf® LoBind® Snap Cap Safe-Lock tube (弹扣盖安全锁试管)。以 8 份复制品来分析洗脱液。洗脱液中 DNA 的稳定性是通过内部 real-time PCR 检测 18S 核糖体 RNA 编码序列来确定的。

在 2–8°C 的温度下，洗脱液稳定性不受存储期时长（最长为一个月）或存储格式的影响（图 8）。在 –15°C 到 –30°C 的温度下，LoBind 试管中 DNA 的稳定性未受存储的影响，包括 7 天、1 个月和 2 个月之后的 3 次冻融循环（图 9）。



**图 8.采用 2 种试管格式，在 2–8°C 的温度下存储的洗脱液中 ccfDNA 的稳定性。**使用 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 从 EDTA 血浆中提取 ccfDNA，并在 2–8°C 的温度下存储，经过不同的测试时间点。ccfDNA 产量是通过内部 real-time PCR 检测 18S 编码序列来量化的。结果按每 ml 血浆输入的目标份数计算。



**图 9.存储在 –15°C 到 –30°C 的温度下（经过 3 次冻融循环）的洗脱液中 ccfDNA 的稳定性。**使用 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 从 EDTA 血浆中提取 ccfDNA，并在 –15°C 到 –30°C 的温度下存储在 1.5 mL Eppendorf LoBind 试管中。在 3 次冻融循环中的 3 个测试时间点，使用相同的洗脱液来确定 ccfDNA 的产量。ccfDNA 产量是通过内部 real-time PCR 检测 18S 编码序列来量化的。结果按每 ml 血浆输入的目标份数计算。

## 干扰性物质

在人血浆和尿液中加入各种潜在干扰性物质（请参阅表 4），以测试它们对于 QS DSP Circulating DNA Kit 提取 ccfDNA 性能的影响，以及对于下游检测示例的兼容性。使用内部 real-time PCR 检测 18S 编码序列以及 Qubit® Fluorometer 的 High Sensitivity dsDNA（高灵敏度 dsDNA）检测分析洗脱液。

表 4. 测试潜在干扰性物质的浓度

干扰性物质	血浆	尿液
胆红素	200 mg/liter*	200 mg/liter*
血红蛋白	2 g/liter†	-
牛血清蛋白和丙种球蛋白	高达 120 g/liter*	1 g/liter†
甘油三酯	5 g/liter*	-
葡萄糖	10 g/liter*	10 g/liter*
血液	-	1%†
酸碱度	-	pH 4 和 pH 9†

\* CLSI EP7-A2 第 25 卷第 27 期

† FDA 指南草案 (11.05.2011)

除了以下高浓度的丙种球蛋白 (>30 g/liter) 血浆样本可能导致循环游离 DNA 回收减少，表 4 中所列示的物质无一具有干扰性。

提示：使用示例性下游应用进行测试，以评估核酸提取质量。然而，不同的下游应用可能对纯化可能有不同的要求（例如，无潜在干扰性物质），因此作为下游应用开发的一部分，涉及 QIASymphony DSP Circulating DNA kit 的任何 workflows 都需要进行相关物质的鉴定和测试。

## 交叉污染

针对 1 mL、4 mL 和 10 mL 样本体积的方案，分析了 QIASymphony DSP Circulating DNA 系统的交叉污染风险，其中包括一个、两个和五个单独的样本转移步骤，每个步骤的体积为 1 mL 或 2 mL。在 QIASymphony SP 仪器上使用批次纵横交替（阳性和阴性样本交替）执行了三次 96 个样本运行（1 mL 和 4 mL）和六次 48 个样本运行（10 mL）。对于 1 mL 和 4 mL 样本体积，将女性血浆（阴性样本）和每毫升血浆添加了浓度为 1.0E+05 份 SRY1 基因的男性剪切 gDNA 的女性血浆（阳性样本）作为样本材料。对于 10 mL 样本体积，将血浆（阴性样本）和每毫升血浆添加了浓度为 1.0E+05 份 GFP 基因的 1000 bp DNA 片段的血浆（阳性样本）作为样本材料。

针对提取运行过程中，血浆阴性样本的潜在污染，通过随后的洗脱液分析（real-time PCR 检测 y 染色体特异性基因 SRY1 [1 mL 和 4 mL 方案] 和 GFP 特异性序列 [10 mL 方案]）进行评估。

未检测到样本间、批次间或运行间存在交叉污染。

## 三个 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 的 ccfDNA 提取效果相当

使用 24 个单一供体，从 2 mL 或 6 mL Streck 血浆中提取 ccfDNA 以评估 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (192)（目录编号 937556）、QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96)（目录编号 937555）和 QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192)（目录编号 937566）的等效性能。ccfDNA 产量已通过内部 real-time PCR 检测 18S 核糖体 RNA 编码序列确定（图 10）。产量差异（份数/mL）说明，在相同体积的血浆中，ccfDNA 的浓度受不同供体的影响通常很大。

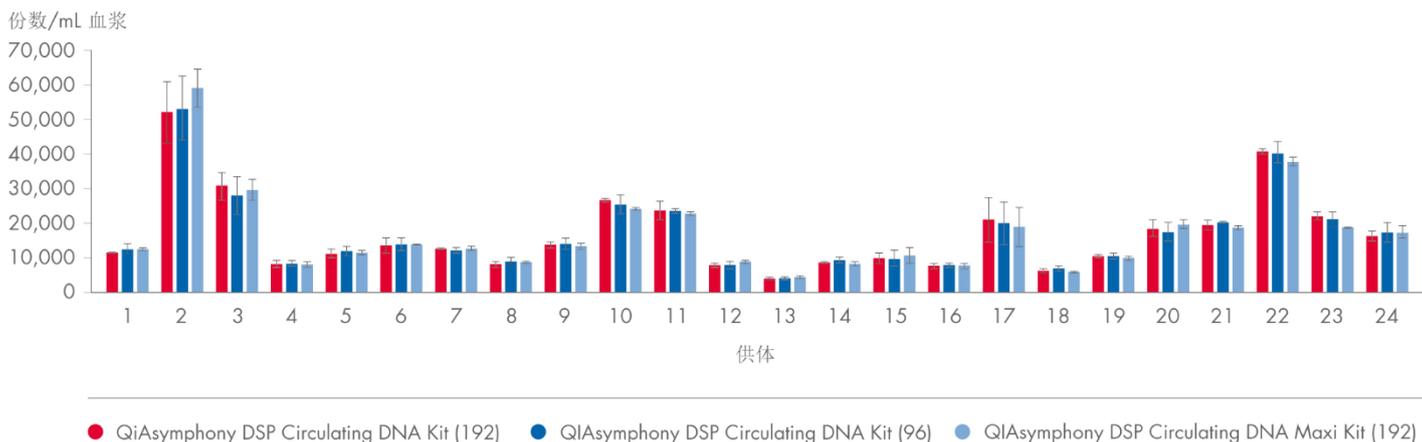


图 10. 三个 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 的 ccfDNA 提取效率相当。使用 Cell-Free DNA BCT (Streck) 采集 24 个单一供体的供血。使用 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (192) 和 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96) 从 2 mL 血浆中提取 ccfDNA。使用 QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192) 从 6 mL 血浆中提取 ccfDNA。对于每个试剂盒和供体，从三个重复样本中提取 ccfDNA，每个供体共计获得九个数据点。ccfDNA 产量是通过内部 real-time PCR 检测 18S 编码序列来量化的。结果按每 ml 血浆输入的目标份数计算。

按计算的份数/ml 来测量，三种 QIASymphony DSP Circulating DNA 应用的性能是相当的。QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (192)、QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192) 和 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96) 的差异率如表 5 所示。

表 5. 通过反变换差异和双侧 95% 置信区间计算得出几何平均数比率 (N = 216)

得出的差值	预估	下两侧 95% 置信限	上两侧 95% 置信限
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

## 与不同下游应用的兼容性

在 QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit 的开发过程中，采用了示范性的下游应用，以证明分离出的核酸可兼容广泛的各种下游应用技术，包括 Real Time-PCR（请参阅图 1–5 和图 8–10）、Qubit 荧光计（蛋白质检测法和高灵敏度 dsDNA 检测法）、文库（请参阅图 11）和新一代测序技术 (NGS)。

图 11 中的电泳图显示了成功的接头连接和随后扩增 ccfDNA 的示例。在核小体 ccfDNA（每个接头大约为 165 + 约 70 bp）主要峰值 300 bp 旁边，可见约 470 bp 的两个核小体峰值。

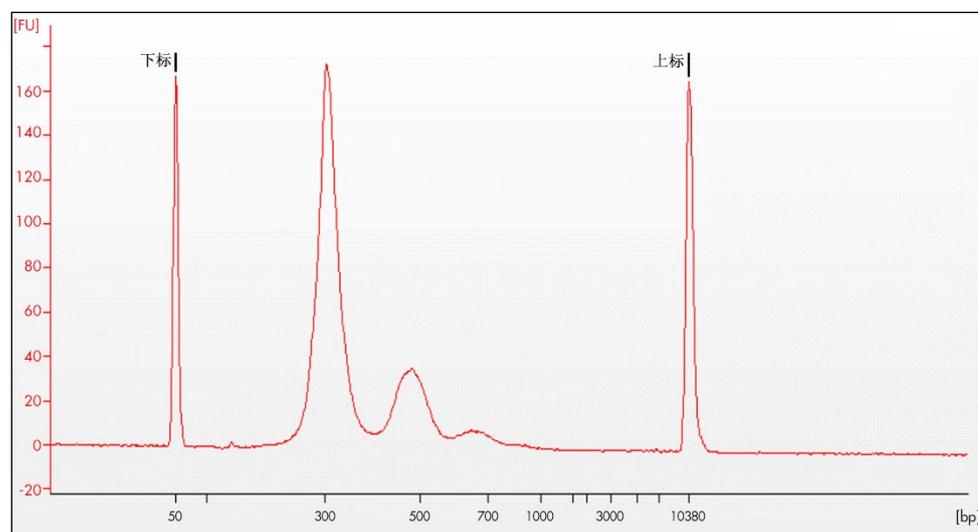


图 11.使用 QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit 提取的 ccfDNA DNA 文库（单一供体）。使用 4 mL 方案从 Streck 血浆中提取 ccfDNA，然后将 35  $\mu$ L 洗脱液转移至 NEBNext<sup>®</sup> Ultra DNA Library Prep Kit (Biolabs)。扩增和 AMPure XP 清理后，使用 Agilent 7500 DNA Kit 分析 1  $\mu$ L 洗脱液。

## 符号

使用说明或包装和标签上可能出现下列符号：

符号	符号定义
	本产品符合体外诊断医疗器械法规 (EU) 2017/746 的要求。
	体外诊断医疗器械
	目录编号
Rn	R 表示使用说明为修订版，n 为修订版本号
	制造商

## 修订历史

修订版	说明
R1, 2022 年 6 月	第 2 版, 修订版 1 <ul style="list-style-type: none"><li>更新到第 2 版以符合 IVDR</li><li>增加了干扰性物质、交叉污染和下游应用兼容性章节</li></ul>
R2, 2024 年 6 月	<ul style="list-style-type: none"><li>文档版本已从修订历史记录中删除</li><li>进行了更新, 以添加 QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192) 和 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96) 与 BioScript 结合使用时的 6 mL、8 mL 和 10 mL 的性能数据。</li><li>添加了 1 mL 样本体积的 BioScript 性能数据</li></ul>

有关最新的许可信息和特定产品的免责声明, 请参阅相应的 QIAGEN 试剂盒手册或使用手册。QIAGEN 试剂盒手册和用户手册可从 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) 或 QIAGEN 技术服务部门以及您当地的经销商处获得。

商标: QIAGEN<sup>®</sup>、Sample to Insight<sup>®</sup> (QIAGEN Group); CellFree DNA Urine Preserve<sup>®</sup>、CellFree DNA BCT<sup>®</sup>、Streck<sup>®</sup> (Streck); Agilent<sup>®</sup>、Bioanalyzer<sup>®</sup> (Agilent Technologies, Inc.); Eppendorf<sup>®</sup>、LoBind<sup>®</sup> (Eppendorf AG); NEBNex<sup>®</sup> (New England Biolabs, Inc.); Qubit<sup>®</sup> (赛默飞世尔科技或其子公司); PAXgene<sup>®</sup> Blood ccfDNA Tube、PreAnalytiX; 本文中使用的注册名称、商标等, 甚至在设有专门如此标记时, 也不得视为不受法律保护。