



2022 年 6 月

QIAsymphony[®] DSP Circulating DNA Kit 使用說明（效能特性）

第 2 版

IVD

供體外診斷使用

可供與 QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit 搭配使用

CE

REF

937556



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, 德國

R1

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 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)。不過，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 (\log_{10} 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。

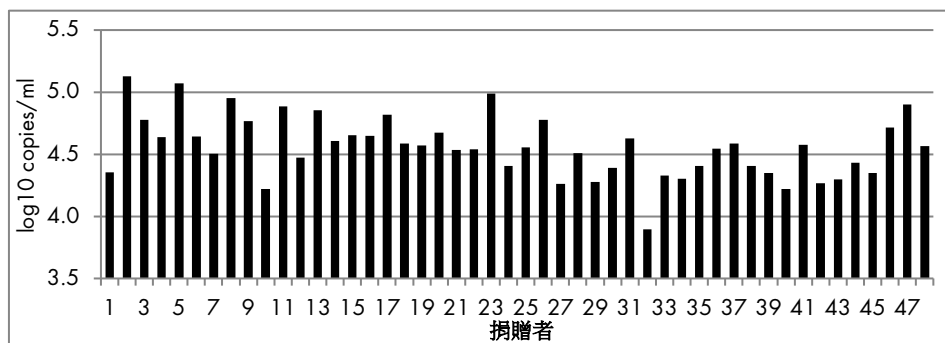


圖 1：48 名單一捐贈者血漿的 ccfDNA 產量。在 Cell-Free DNA BCT (Streck) 完成 48 名單一捐贈者捐血。使用 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 從 4 ml 血漿萃取 ccfDNA。使用針對 18S 編碼序列的內部 real-time PCR 檢測定量 ccfDNA 產量。結果計算為每毫升血漿輸入的目標複製數。

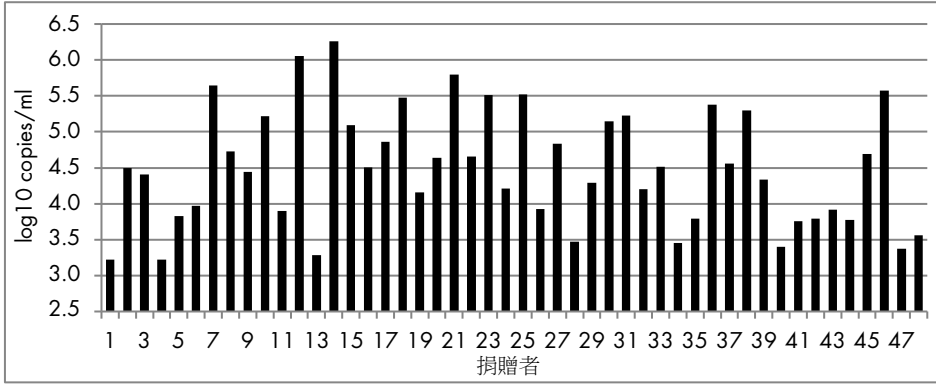


圖 2：48 名單一捐贈者尿液的 ccfDNA 產量。使用 Cell-Free DNA Urine Preserve® (Streck) 穩定了從 48 名單一捐贈者收集的尿液。使用 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 從 4ml 尿液萃取 ccfDNA。使用針對 18S 編碼序列的內部 real-time PCR 檢測定量 ccfDNA 產量。結果計算為每毫升尿液輸入的目標複製數。

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 QIASymphony 運行（每批 8 次重複）。精確度資料如表 1 所示。

表 1：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 和 4 ml 操作程序的相等等能

使用從人類 EDTA 合併血漿萃取的內源性 ccfDNA，對 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 評估了 2 和 4 ml 樣本輸入操作程序的相等等能。總共分 4 個批次執行 8 個獨立 QIASymphony 運行，每批 8 次重複。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 3）。2 和 4 ml 操作程序的差異比率如表 2 所示（基準操作程序為 4 ml 樣本輸入）。

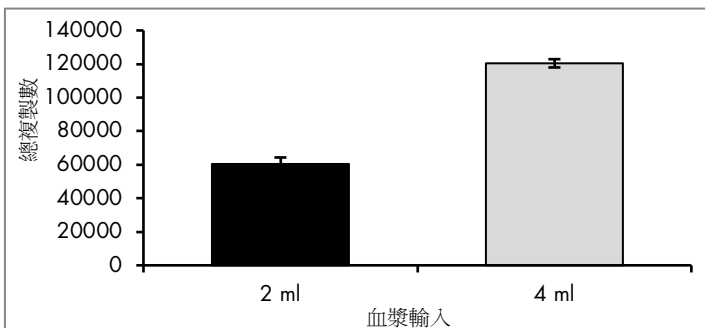


圖 3：使用 2 和 4 ml 樣本輸入操作程序的相等等能。使用 2 和 4 ml 操作程序確認 ccfDNA 操作程序的線性範圍。使用針對 18S 編碼序列的內部 real-time PCR 檢測定量 ccfDNA 產量。結果計算為每個操作程序的總複製數。

表 2：2 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。

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）。總共進行了 5 次獨立重複分析。圖 4 和圖 5 分別為血漿和尿液的一個代表性 DNA 特性。

圖 4 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 5 的尿液電泳圖顯示，約 160 bp 處的主要波峰更寬，範圍從約 145 至 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 5 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組 DNA 片段，很可能是由於尿液中的細胞釋放了基因體 DNA。

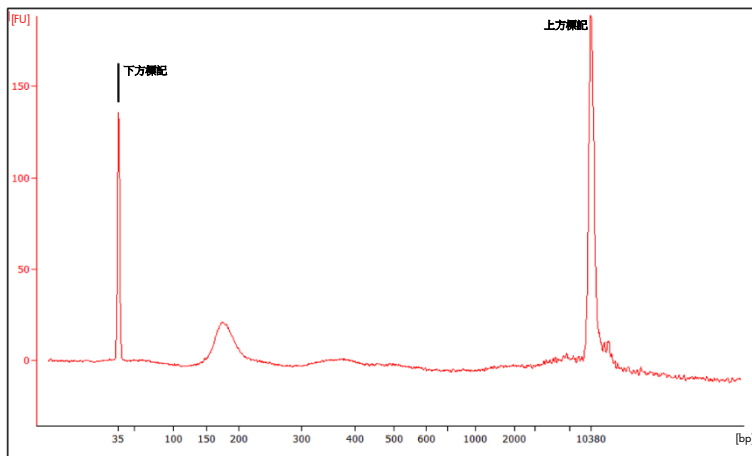


圖 4：血漿中 ccfDNA 的大小分布（生物分析儀特性）。使用 QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit 從 4 ml EDTA 血漿萃取 ccfDNA；對 1 µl 洗脫液進行 Agilent 高靈敏度 DNA 晶片分析。x 軸：鹼基對大小 (base pair, bp)；y 軸：螢光單位 (Fluorescence Unit, FU)。

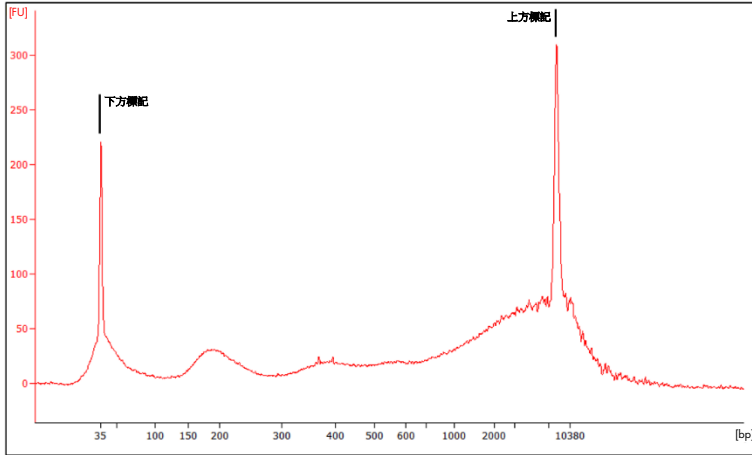


圖 5：尿液中 cfDNA 的大小分布（生物分析儀特性）。使用 QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit 從 4 ml 尿液萃取 cfDNA；對 1 µl 洗脫液進行 Agilent 高靈敏度 DNA 晶片分析。x 軸：鹼基對大小 (base pair, bp)；y 軸：螢光單位 (Fluorescence Unit, FU)。

洗脫液穩定性

使用從人類 EDTA 合併血漿萃取的 cfDNA，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；產品編號 19588) 和 1.5 ml Eppendorf® LoBind® Snap Cap Safe-Lock 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 6）。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 7）。

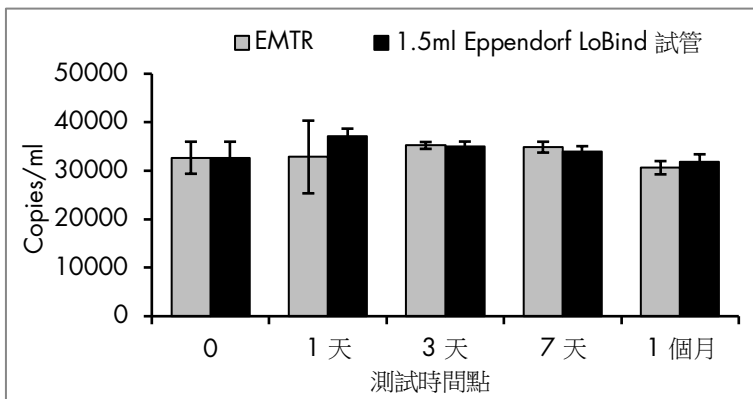


圖 6：以 2 管型式儲存在 2 - 8°C 洗脫液中的 cfDNA 穩定性。使用 QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit 從 EDTA 血漿萃取 cfDNA，並在 2-8°C 下儲存不同的測試時間點。使用針對 18S 編碼序列的內部 real-time PCR 檢測定量 cfDNA 產量。結果計算為每毫升血漿輸入的目標複製數。

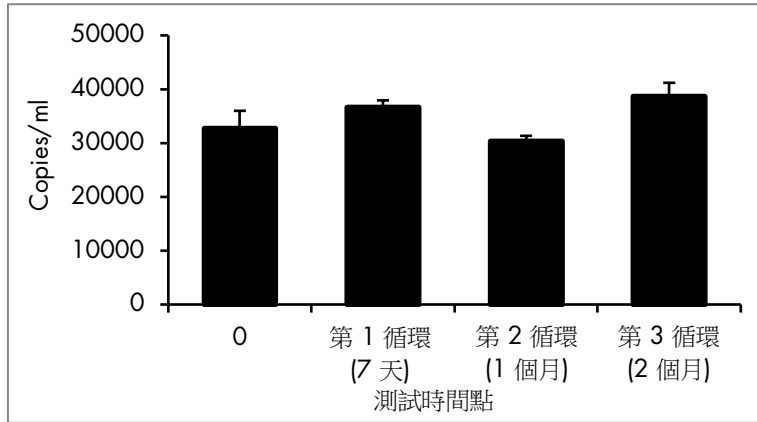


圖 7：在 -15°C 至 -30°C 下儲存洗脫液中的 ccfDNA 穩定性，包括 3 次冷凍解凍循環。使用 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 從 EDTA 血漿萃取 ccfDNA，並在 -15°C 至 -30°C 以 1.5 ml Eppendorf LoBind 試管儲存。透過在 3 次冷凍解凍循環使用相同的洗脫液，在 3 個測試時間點確認 ccfDNA 的產量。使用針對 18S 編碼序列的內部 real-time PCR 檢測定量 ccfDNA 產量。結果計算為每毫升血漿輸入的目標複製數。

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 3），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 18S 編碼序列的內部 real-time PCR 和採用高靈敏度 dsDNA 檢測 Qubit® 螢光計，分析洗脫液。

表 3：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 3 所列的物質皆不會造成干擾，除了具有高濃度 γ 球蛋白 ($> 30 \text{ g/liter}$) 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 QIASymphony 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，以利下游應用開發。

交叉污染

透過在 QIASymphony SP 儀器使用交替棋盤排列批次（陽性和陰性樣本交替放置）執行三次 96 份樣本運行，分析 QIASymphony DSP Circulating DNA 系統的交叉污染風險。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） $1.0\text{E}+05$ 個 SRY1 基因複製數的剪切男性 gDNA，作為模型系統的樣本材料。使用 4 ml 操作程序進行樣本製備，包括每個 2 ml 體積的兩次獨立樣本移液。使用 Y 染色體特異性基因 SRY1 的 real-time PCR 分析洗脫液，評估萃取運行期間陰性女性血漿樣本的可能污染。

沒有檢測到樣本間、批次間或運行間的交叉污染。

不同下游應用的相容性

在 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 的開發過程使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、圖 2、圖 3、圖 6、圖 7）、Qubit 螢光計（蛋白質檢測和高靈敏度 dsDNA 檢測）、資料庫（請參閱圖 8）和次世代定序 (Next Generation Sequencing, NGS)。

圖 8 電泳圖顯示轉接子接合及後續 ccfDNA 擴增的成功範例。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。

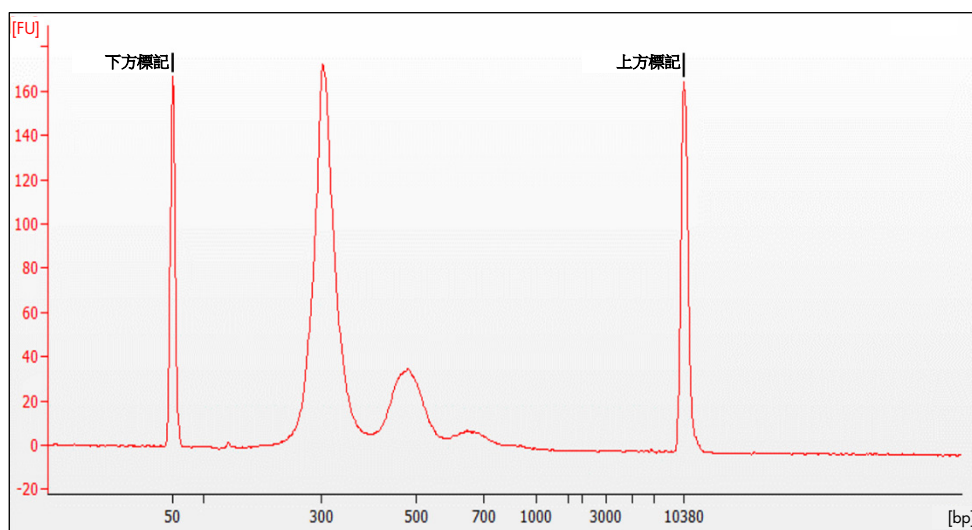


圖 8：使用 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 萃取的 ccfDNA（單一捐贈者）DNA 資料庫。使用 4 ml 操作程序從 Streck 血漿萃取 ccfDNA，接著將 35 μ l 洗脫液移液至 NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit (Biolabs)。在擴增和 AMPure XP 清除後，使用 Agilent 7500 DNA Kit 分析 1 μ l 洗脫液。

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
	含有足夠進行 <N> 次反應的試劑
	使用期限
	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
	批號
	材料編號（即，元件標籤）
	成分
	內含物
	數量
	全球交易品項識別代碼
Rn	R 是表示使用說明的修訂版，而 n 是修訂版號
	溫度限制
	製造商
	參閱使用說明
	警告/警示
	蛋白酶 K
	孔編號（即，試劑盒孔）
	試劑盒

符號

符號定義

Sodium azide

疊氮化鈉

EtOH

乙醇

UDI

獨特裝置識別碼

修訂歷程記錄

修訂	描述
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

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 上下載，或者從 QIAGEN 技術服務部或當地經銷商處取得。

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.)；Qubi® (Thermo Fisher Scientific 或其子公司)。縱使未特別標明，本文件中使用的註冊名稱、商標等皆不應視為不受法律保護。

HB-3034-D01-001 © 2022 QIAGEN，保留所有權利。

此頁刻意留白

