



2022 年 6 月

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

第 2 版



供体外诊断使用

与 QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit 一起使用



937556



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, 德国

R1

性能特点有电子版，可以在 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) 产品页面 resource（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 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，每种采血管的性能特点未得到确定，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，荧光定量分析或 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 workflow 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 workflow，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（log10 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。

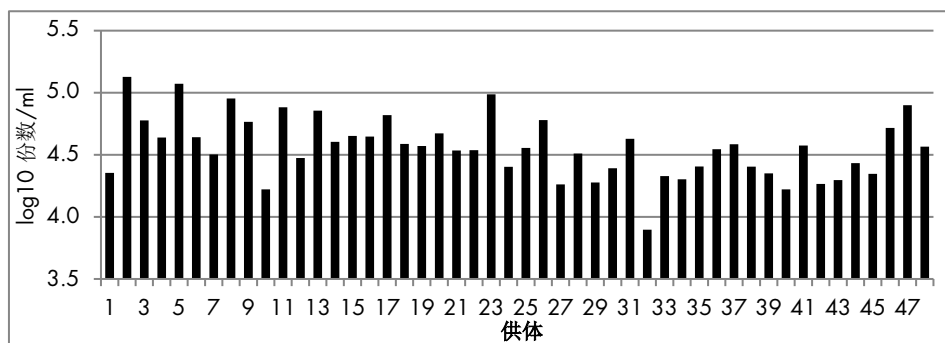
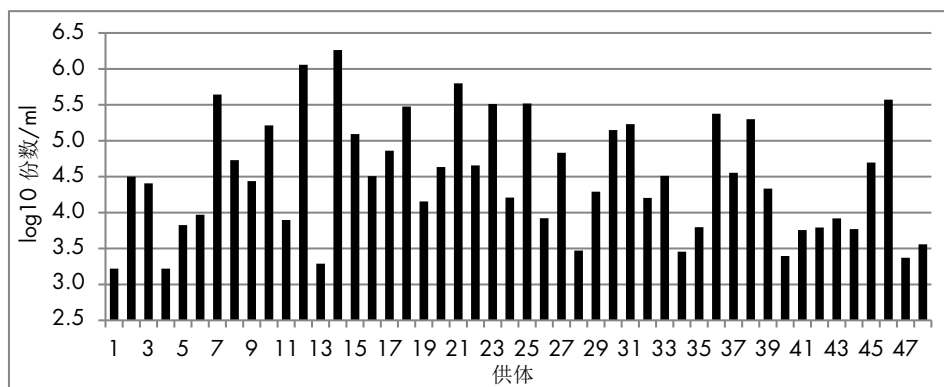


图 1.来自 48 个单一供体的血浆的 ccfDNA 产量。使用 Cell-Free DNA BCT (Streck) 采集 48 个单一供体的供血。使用 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 从 4 ml 血浆中提取 CcfDNA。ccfDNA 产量是通过内部 real-time PCR 检测 18S 编码序列来量化的。结果按每 ml 血浆输入的目标份数计算。



**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 QIAasymphony 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。

## 运行精度

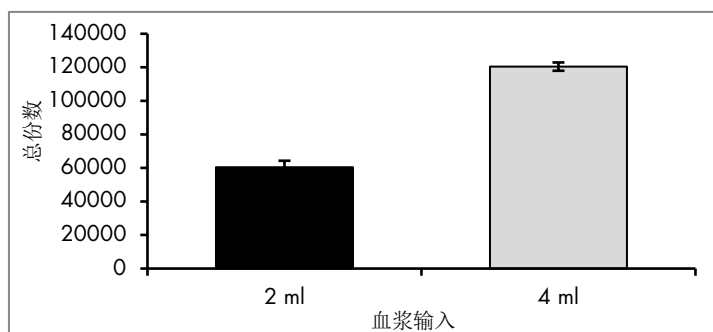
确定从 EDTA 血浆进行的人 ccfDNA 提取的变化系数 (CV)。为了进行精确分析，ccfDNA 是通过 内部 real-time PCR 检测 18S 核糖体编码序列来量化的。总计 4 个批次（每批 8 个复制品）中，每批执行 10 次 QIAasymphony 运行。表 1 中显示了精确数据。

**表 1. 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 方案的同等性能

使用从人类 EDTA 血浆池提取的内源性 ccfDNA 评估 QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit 的 2 ml 和 4 ml 样本输入的方案性能是否相同。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 3）。表 2 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 3. 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 2.2 和 4 ml 方案之间的差异 (N = 256)

参数	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）。

## 大小分布

为了评估样本输出的大小分布，使用 QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit 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 的 Agilent® 2100 Bioanalyzer 对 1  $\mu$ l 的洗脱液进行大小分析。总计执行 5 次独立复制。图 4 显示血浆的一种代表性 DNA 图谱，图 5 显示尿液的一种代表性 DNA 图谱。

图 4 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 5 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 5 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。

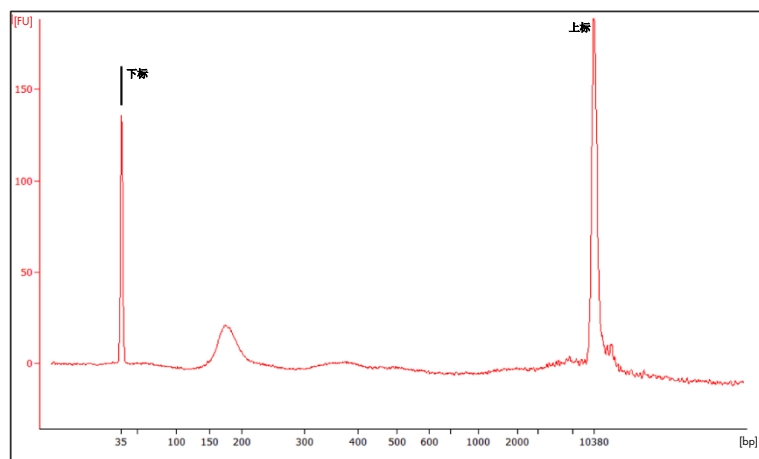


图 4. 取自血浆的 ccfDNA 的大小分布（生物分析仪图谱）。使用 QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit 从 4 ml EDTA 血浆中提取 ccfDNA；使用 Agilent High Sensitivity DNA Chip 对 1  $\mu$ l 洗脱液进行分析。x 轴：碱基对尺寸 (bp)；y 轴：荧光单位 (FU)。

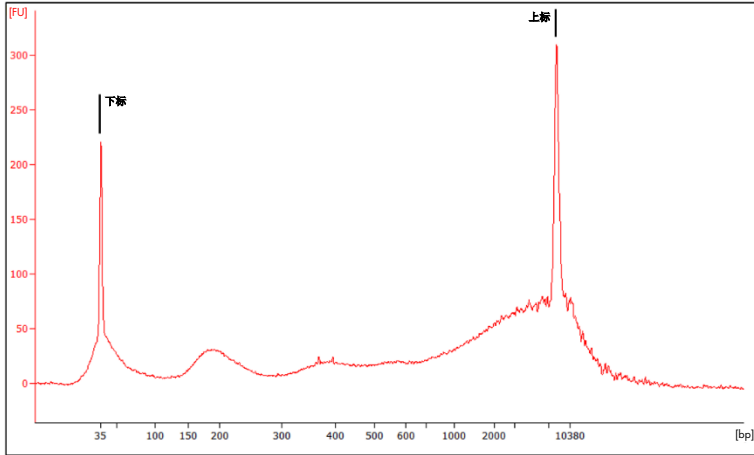


图 5. 取自尿液的 cfDNA 的大小分布 (生物分析仪图谱)。使用 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 从 4 ml 尿液中提取 cfDNA; 使用 Agilent High Sensitivity DNA Chip 对 1  $\mu$ l 洗脱液进行分析。x 轴: 碱基对尺寸 (bp); y 轴: 荧光单位 (FU)。

## 洗脱液稳定性

使用从人 EDTA 血浆池提取的 cfDNA, 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, 目录编号 19588) 和 1.5 ml Eppendorf® LoBind® Snap Cap Safe-Lock 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 6)。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 7)。

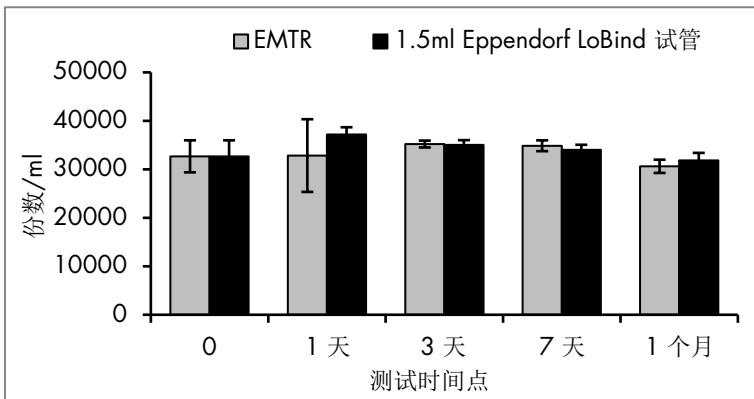
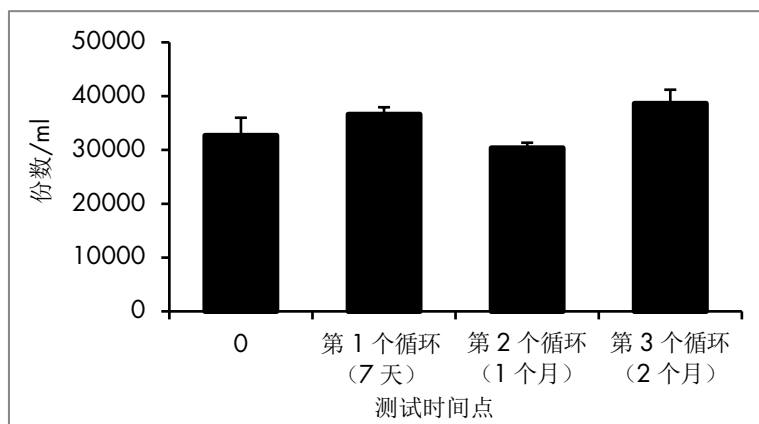


图 6. 采用 2 种试管格式, 在 2 - 8°C 的温度下存储的洗脱液中 cfDNA 的稳定性。使用 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 从 EDTA 血浆中提取 cfDNA, 并在 2 - 8°C 的温度下存储, 经过不同的测试时间点。cfDNA 产量是通过内部 real-time PCR 检测 18S 编码序列来量化的。结果按每 ml 血浆输入的目标份数计算。



**图 7. 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 3)，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 3. 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 <sup>†</sup>	-
牛血清蛋白和丙种球蛋白	高达 120 g/liter*	1 g/liter <sup>†</sup>
三酸甘油酯	5 g/liter*	-
葡萄糖	10 g/liter*	10 g/liter*
血液	-	1% <sup>†</sup>
酸碱度	-	pH 4 和 pH 9 <sup>†</sup>

\* CLSI EP7-A2 第 25 卷第 27 期

<sup>†</sup> FDA 指南草案 (11.05.2011)

除了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 3 中所列示的物质无一具有干扰性。

提示：使用下游应用示例进行测试，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 workflow 都需要进行相关物质的鉴定和测试。

## 交叉污染

通过在 QIASymphony SP 仪器上使用批次纵横交替（阳性和阴性样本交替）执行 3 次 96 个样本运行来分析 QIASymphony DSP Circulating DNA 系统交叉污染的风险。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。样本制备使用 4 ml 方案进行，包括两次样本转移，每次 2 ml。针对提取运行过程中，女性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）进行评估。未检测到样本间、批次间或运行间存在交叉污染。

## 与不同下游应用的兼容性

在 QIASymphony 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、图 2、图 3、图 6 和图 7）、Qubit 荧光计（蛋白质测定法和高灵敏度 dsDNA 测定法）、文库（请参阅图 8）和新一代测序技术 (NGS)。

图 8 中的电泳图显示了一个成功的适配器连接后 ccfDNA 扩增的示例。在核小体 ccfDNA（每个适配器大约为  $165 + \text{约 } 70 \text{ bp}$ ）主要峰值 300 bp 旁边，可见约 470 bp 的两个核小体峰值。

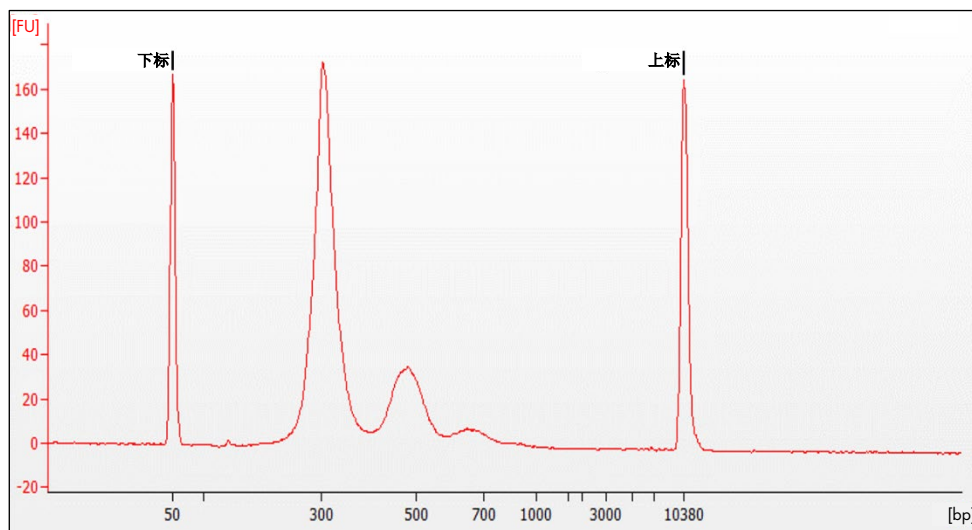


图 8. 使用 QIASymphony DSP Circulating DNA Kit 提取的 ccfDNA DNA 文库（单一供体）。使用 4 ml 方案从 Streck 血浆中提取 ccfDNA，然后将 35  $\mu\text{l}$  洗脱液转移至 NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit (Biolabs)。扩增和 AMPure XP 清理后，使用 Agilent 7500 DNA Kit 分析 1  $\mu\text{l}$  洗脱液。

## 符号

使用说明、包装和标签上可能会出现下列符号：

符号	符号定义
	包含足够进行 <N> 次反应的试剂
	有效期
	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
	批号
	材料编号（即，组件标签）
	组件
	包含
	数量
	全球贸易项目代码
Rn	R 表示使用说明为修订版，n 为修订版本号
	温度限制
	制造商
	参考使用说明
	警告/警示
	蛋白酶 K
	孔号（即，试剂卡盒孔）
	试剂卡盒
	叠氮化钠



符号

符号定义

**EtOH**

乙醇

**UDI**

唯一设备标识符

## 修订历史

修订日期	说明
R1, 2022 年 6 月	第 2 版, 修订 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>

欲获取最新的许可信息和特定产品的免责声明, 请参阅相应的 QIAGEN 试剂盒手册或用户手册。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取。

商标: QIAGEN<sup>®</sup>、Sample to Insight<sup>®</sup>(QIAGEN Group)、Cell-Free DNA Urine Preserve<sup>®</sup>、Cell-Free 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); NEBNext<sup>®</sup> (New England Biolabs, Inc.); Qubit<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific or its subsidiaries)。本文中使用的注册名称、商标等, 甚至在没有专门如此标记时, 也不得视为不受法律保护。

HB-3034-D01-001 © 2022 QIAGEN, 保留所有相关权利。

此页面有意保留空白

