

2017年2月

QIAsymphony® DSP Circulating DNAキット

性能特性

IVD

CE

MAT 937556

目次

性能特性.....	4
基本的性能.....	4
ランの正確さ.....	6
2mlと4mlのプロトコールで同等の性能.....	6
サイズ分布.....	7
溶出液安定性.....	9

QIASymphony DSP Circulating DNAシステムはヒト血漿や尿からヒト循環セルフリーDNA (ccfDNA)の定性精製を行う、ready-to-useのin vitroシステムです。

QIASymphony DSP Circulating DNA キットはQIASymphony SP装置と組み合わせのみで使用します。

QIASymphony DSP Circulating DNAキットは全自動で試薬を供給し、同時に幅広いヒト血漿由来 (EDTAまたはクエン酸で抗凝固処理し、ccfDNA安定化採血チューブで採取した血漿)、およびヒト尿由来 (安定化および非安定化) のヒトccfDNA精製を行います。各採血チューブの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。

精製したccfDNAは幅広い下流アプリケーションに適します。QIASymphony SPは精製手順ステップすべてを行います。24をバッチとして、96サンプルまで1回のランで処理できます。尿サンプルは手作業のサンプル前処理が必要になることがあります。

性能特性

基本的性能

QIASymphony DSP Circulating DNAキットの基本性能は、安定血漿4ml、および4ml EDTA血漿と4ml安定化尿から抽出された48名の個人ドナーからのccfDNAキットで評価されました。ccfDNA収量は社内リアルタイムPCRアッセイで18SリボソームRNAコード配列から決定されました。

図1 (4ml安定化血漿)、図2 (4ml EDTA血漿)、図3 (4ml安定化尿)の収量差 (log10 コピー/ml) は、一般に各サンプル物質中に同量含まれるccfDNAの、ドナーに強く依存した濃度を反映しています。安定化血漿とEDTA血漿間のccfDNA収量は、2種のBCT由来の血漿を使用した48名の個人ドナーに高い相関があります (図1及び2)。

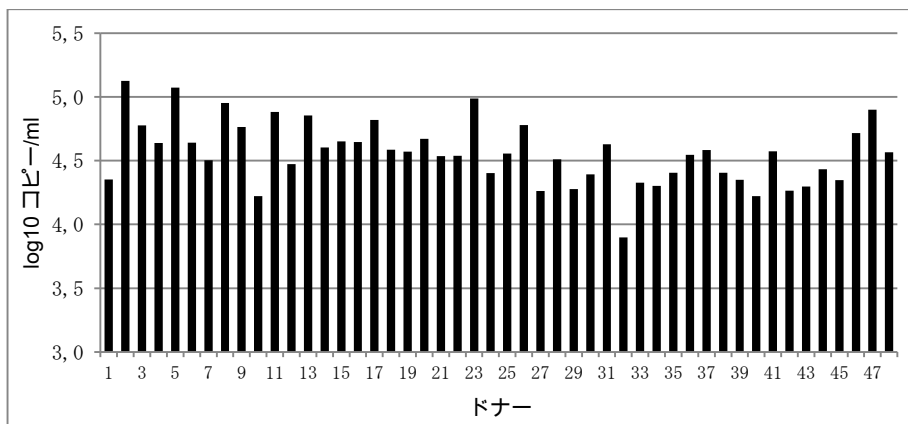


図 1. 48名の個人ドナーから採取したccfDNAの収量：ccfDNA安定化採血チューブ。48名の個人ドナーからccfDNA安定化採血チューブで採血を行いました。ccfDNAはQIASymphony DSP Circulating DNAキットで4ml血漿から抽出し、ccfDNA収量は社内のリアルタイムPCRアッセイで18Sコード配列を用いて定量しました。結果はターゲットコピー/血漿投入量mlとして計算しました。

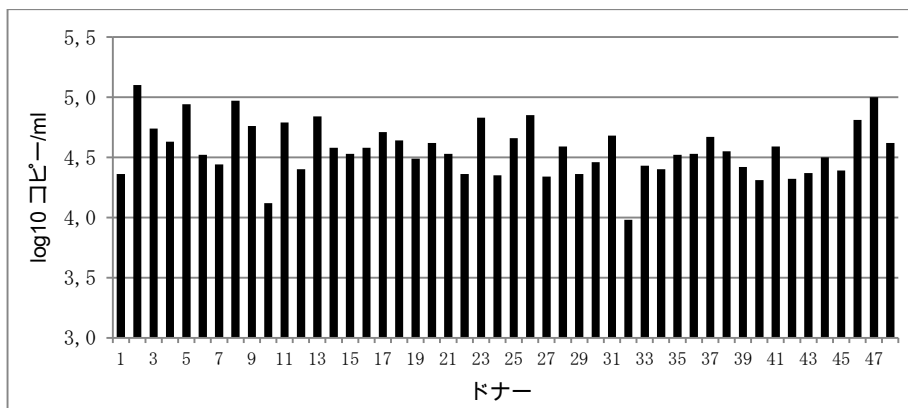


図 2。 48名の個人ドナー血漿から採取したccfDNAの収量：EDTA採血チューブ。48名の個人ドナーからEDTA採血チューブで採血を行いました。ccfDNAはQIASymphony DSP Circulating DNAキットで4ml血漿から抽出し、ccfDNA収量は社内のリアルタイムPCRアッセイで18Sコード配列を用いて定量しました。結果はターゲットコピー/血漿投入量mlとして計算しました。

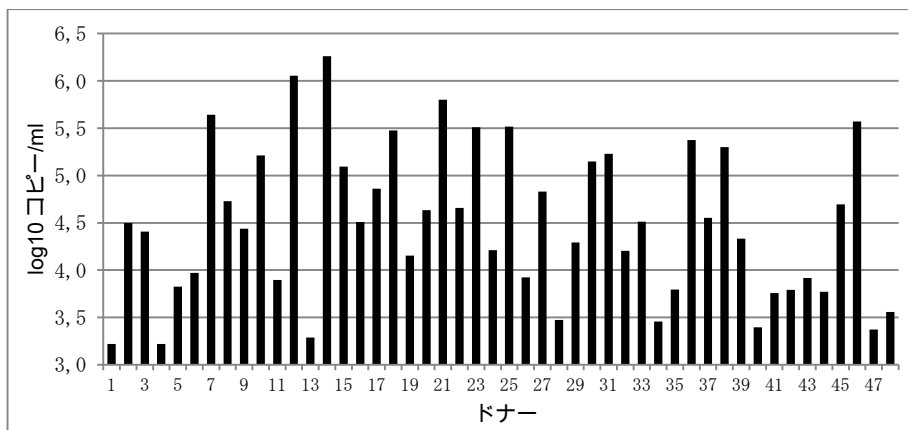


図 3。 48名の個人ドナー尿から採取したccfDNAの収量。48名の個人ドナーから採取した尿はすぐに安定化を行いました。ccfDNAはQIASymphony DSP Circulating DNAキットで4ml尿から抽出し、ccfDN

A収量は社-内のリアルタイムPCRアッセイで18Sコード配列を用いて定量しました。結果はターゲットコピー/投入尿mlとして計算しました。

ランの正確さ

変動係数(CV)はEDTA血漿から抽出されるヒトccfDNAで決定しました。正確な分析のため、ccfDNA収量は社内リアルタイムPCRアッセイで18SリボソームRNAコード配列から決定しました。合計で、QIAsymphonyランを10回、4バッチずつ行いました (バッチごとに繰り返し8回)。詳細データを表1に示します。

図 1. 正確性の推定分析

正確性	CV (%)
バッチ内	11.67
再現性	13.14
中間の正確性	13.14
全体の正確性	14.12

2mlと4mlのプロトコールで同等の性能

QIAsymphony DSP Circulating DNAキットで2mlと4mlサンプル投入量プロトコールの性能が同等であることは、ヒトEDTA血漿プールから抽出された内在性ccfDNAで評価しました。QIAsymphonyランを計8回、各ランで4バッチずつ行い、バッチごとに8回繰り返しました。QIAsymphony DSP Circulating DNAキット手順の線形範囲は、社内リアルタイムPCRアッセイ (図4) で18Sコード配列から求めました。2mlと4mlのプロトコールについて変化率を表2に示しました。(参照プロトコールはサンプル投入量4ml)

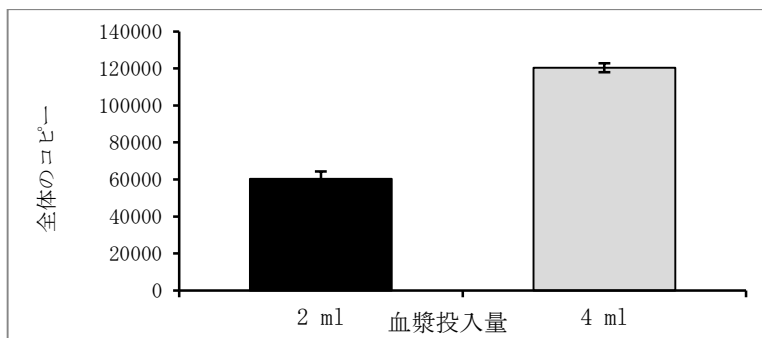


図 4. サンプル投入量2mlと4mlのプロトコールで同等の性能。ccfDNAプロトコールの線形範囲は2mlと4mlのプロトコールを用いて決定しました。ccfDNA収量は社内リアルタイムPCRアッセイで18Sコード配列から定量しました。結果は合計コピー/プロトコールとして計算しました。

図22mlおよび4mlプロトコール(N = 256)の差

パラメーター	値
計算されたコピー / ml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

サンプル投入量2mlと4mlのプロトコールで同等の性能であることを、計算されたコピー / mlで測定しました。

サイズ分布

サンプル産生量のサイズ分布を評価するため、サンプル投入量4mlのccfDNAをQIASymphony DSP Circulating DNAキットで抽出し、75µlで溶出し、Agilent High Sensitivity DNA Chipを用いてAgilent 2100 Bioanalyzerで溶出液1µlをサイズ分析しました。合計5回の独立複

製を行いました。1つの代表的なDNAプロファイルを、血漿は図5、安定化尿は図6に示します。

図5の血漿の電気泳動図では、160 bpからピークが多く見られ、145 bp～196 bpの範囲にわたります。これはヒストン結合したヌクレオソーム中のDNA範囲です。図6の尿の電気泳動図では、160bpから主なピークが幅広く存在し、145 bp～250 bpの範囲にあります。加えて、尿の2番目のピークは20 bpから100 bpの範囲にあり（下部マークのピークレベル）、ccfDNA分画が高度にフラグメンテーションされていることを示しています。さらに、図6では長さ2 kbから長いDNAフラグメントが多数見られます。そのようなゲノムDNAフラグメントが多量に尿サンプルに存在することは、細胞からゲノムDNAが尿に放出されたためと考えるのが最も妥当です。

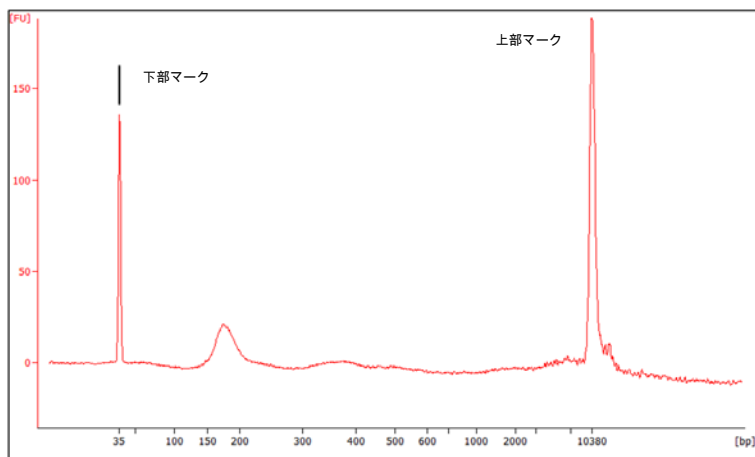


図 5. 血漿由来のccfDNAサイズ分布 (Bioanalyzerプロファイル)。 ccfDNAはQIAsymphony DSP Circulating DNAキットで4mlEDTA血漿から抽出し、1μlの溶出液にAgilent High Sensitivity DNAチップ分析を行いました。X軸：塩基対サイズ(bp)、Y軸：蛍光ユニット(FU)

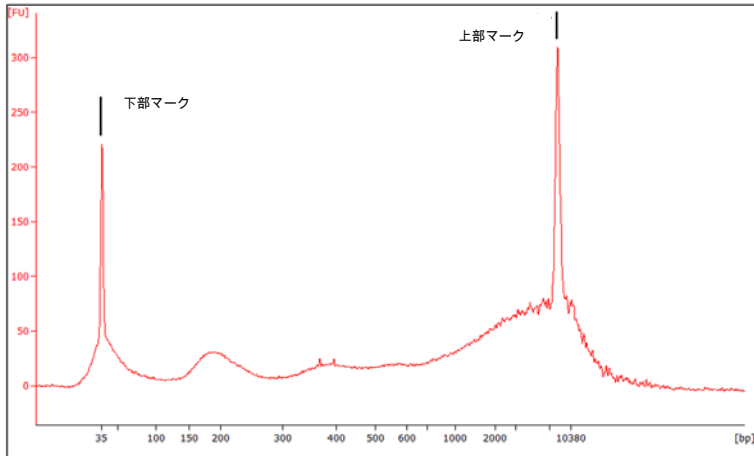


図 6. 尿由来のccfDNAサイズ分布 (Bioanalyzerプロファイル)。 ccfDNAはQIASymphony DSP Circulating DNAキットで4ml安定化尿から抽出し、1 μ lの溶出液にAgilent High Sensitivity DNAチップ分析を行いました。X軸：塩基対サイズ(bp)、Y軸：蛍光ユニット(FU)

溶出液安定性

QIASymphony DSP Circulating DNAキットの溶出液安定性は、ヒトEDTA血漿プールから抽出されたccfDNAで評価しました。溶出液は2つの異なる溶出ラックフォーマットで保存しました。QIAGEN EMTR (Elution Microtubes CL 96 (溶出マイクロチューブ CL 96)、カタログ番号19588) および1.5 ml Eppendorf® LoBind Snap Cap Safe-Lockチューブ。溶出液は8回繰り返して分析しました。溶出液中DNAの安定性は、社内リアルタイムPCRアッセイで18SリボソームRNAコード配列から決定しました。

2~8 °Cでの溶出液の安定性は、1ヶ月までの保存時間や保存形式では影響されませんでした (図7)。LoBindチューブ中におけるDNA安定性は、7日目、1ヶ月、2ヶ月以降の凍結融解サイクル3回を含む-15~-30°Cでの保存では影響されませんでした (図8)。

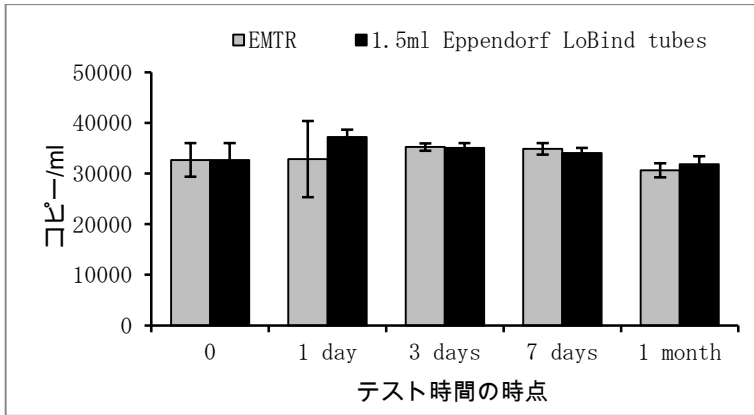


図 7. 2チューブフォーマットで、2~8°Cで保存された溶出液中ccfDNAの安定性。 ccfDNAはQIAasympy DSP Circulating DNAキットでEDTA血漿から抽出し、異なるテスト時間時点のため2~8°Cで保存しました。ccfDNA収量は社内リアルタイムPCRアッセイで18Sコード配列から定量しました。結果はターゲットコピー/血漿投入量mlとして計算しました。

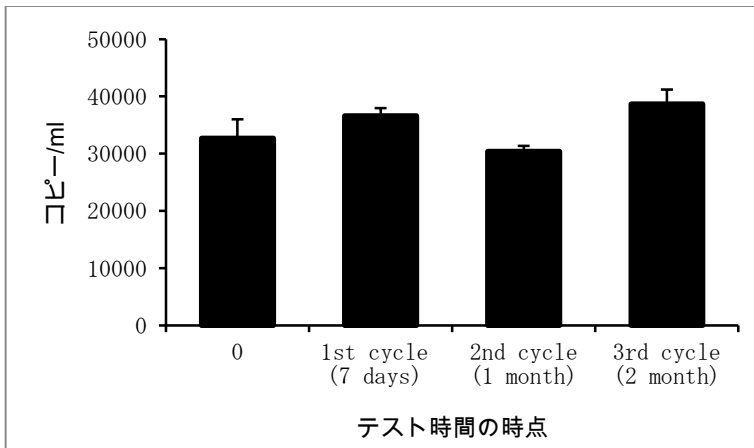


図 8. 凍結融解サイクル3回を含む、-15~-30°Cで保存された溶出液中ccfDNAの安定性。 ccfDNAはQIAasympy DSP Circulating DNAキットでEDTA血漿から抽出し、1.5 ml Eppendorf LoBind チューブ中-15~-30°Cで保存しました。ccfDNA収量は凍結融解サイクル3回を行った同一の溶出液を用いて3

テスト時間時点で決定しました。ccfDNA収量は社-内リアルタイムPCRアッセイで18Sコード配列から定量しました。結果はターゲットコピー/血漿投入量mlとして計算しました。

最新のライセンス情報および製品固有の免責条項については、各QIAGENキットハンドブックまたは使用説明書をご覧ください。QIAGENキットハンドブックおよび使用説明書は www.qiagen.com 、QIAGEN テクニカルサービス、お近くの販売業者で入手してください。

登録商標：QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Eppendorf® (Eppendorf AG).
本文中の登録名称、登録商標等は、特に記号を付していない場合でも、法律で保護されないとは見なされません。

2017/02 HB-2309-D01-001 © 2017 QIAGEN, all rights reserved.

