




性能特性

QIAamp® DSP Circulating NA Kit、バージョン 1 **REF** 61504

バージョン管理

  	検査を実施する前に、 www.qiagen.com の製品番号および製品リソースで、新しい電子的標識付けの改訂版が利用できるかどうかを確認してください。
---	--

導入・一般事項

QIAamp DSP Circulating NA Kit は、ヒトの血漿サンプルから循環セルフリー (circulating cell-free, ccf) DNA および RNA の分離・精製にシリカ系分離膜技術 (QIAamp テクノロジー) を用いるシステムです。

この製品は、分子生物学技術について訓練を受けた技師や医師などのプロフェッショナルな使用者向けのものです。

QIAamp DSP Circulating NA Kit は体外診断用です。

精製核酸 (Nucleic Acid, NA) の収率

血漿サンプルでは、精製核酸の収率のばらつきが大きくなる可能性があります。そのため、実験室で特定のターゲットやダウンストリームアプリケーション用に血漿のインプットや溶出体積を最適化する必要があります。

このキットを QIAGEN® ダウンストリームアプリケーションと組み合わせて使用する場合、関係するハンドブックを参照してください。

ダウンストリームアプリケーションの解析

QIAamp DSP Circulating NA Kit で分離した核酸は、すでに様々なダウンストリームアプリケーションで使える状態になっています。性能評価のため、ヒトシングルドナー血漿から、3 種類の血液採取チューブ (BD Vacutainer® K2EDTA Tube、Becton Dickinson®; PAXgene® Blood ccfDNA Tube、PreAnalytiX; および Streck® Cell-Free DNA Blood Collection Tube (BCT)®、Streck; 各々ドナー n=24) を使用して核酸を分離しました。血漿インプット 1 ml からの溶出液を、定量 PCR (quantitative PCR, qPCR、図 1A)、デジタルドロップレット PCR (digital droplet PCR, ddPCR、図 1B)、ならびに逆転写 qPCR (reverse transcription qPCR, RT-qPCR) を用いて、RNA について検査しました (BD Vacutainer K2EDTA Tube 血漿のみ、図 2)。

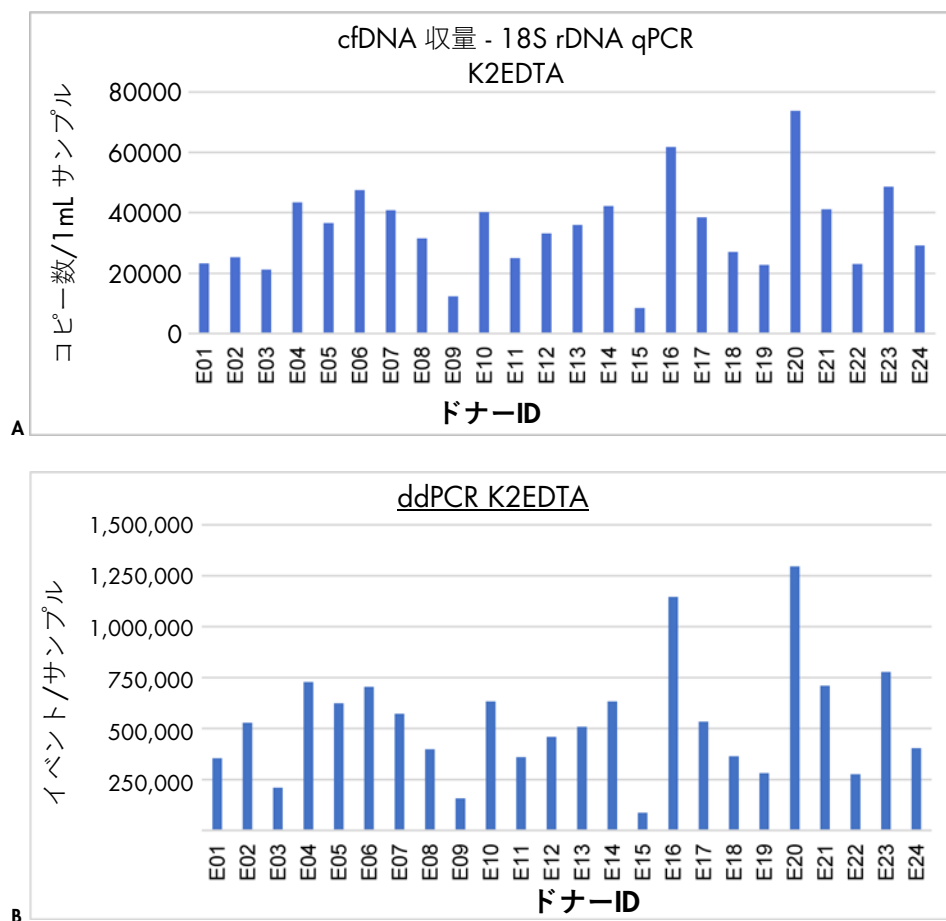


図 1. シングルドナー血漿（1 ml インプット）について qPCR と ddPCR（Bio-Rad®）間の比較

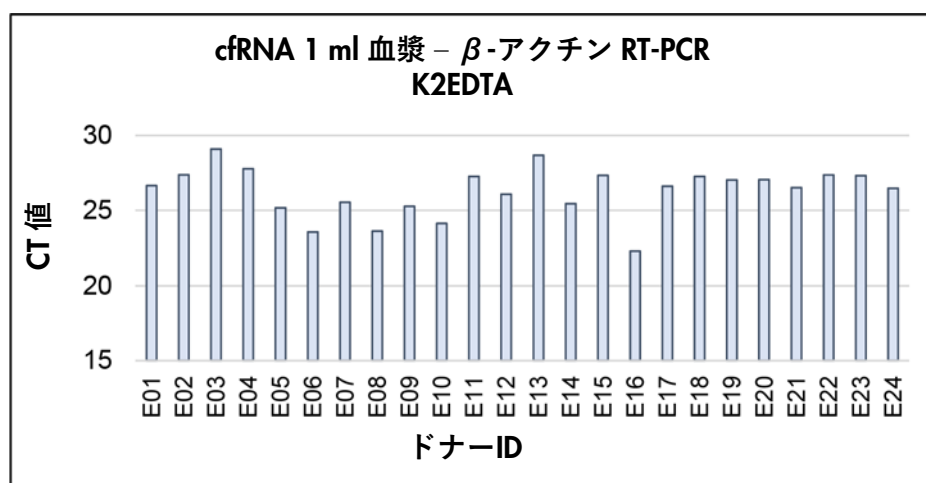


図 2. ヒト β -アクチン遺伝子（293 bp 断片長）について、逆転写 qPCR アッセイを用いた、シングルドナー血漿（1 ml インプット）中のセルフリーRNA の検出。

次世代シーケンシング (Next Generation Sequencing, NGS) 解析用に、5 ml 血漿インプットからの溶出液 (BD Vacutainer K2EDTA Tube、PAXgene Blood ccfDNA Tube、および Streck Cell-Free DNA BCT、各々ドナーn=8) を生成しました。5 ml 血漿の DNA の合計収量は、Qubit® HS dsDNA アッセイによる検出では 50 ng~150 ng でした。NGS 解析は、GeneRead® QIAact Actionable Insights Tumor Panel と GeneReader™ システムを用いて実施しました。すべてのサンプルは濃縮に成功し、ライブラリを作成しました。得られたリードの 98% 超がヒトゲノムにマップされ、対象領域の 99.8% 超の位置が 500x 以上の塩基カバレッジでした。

いずれの種類の核酸 (DNA と RNA) でもダウンストリームアプリケーション技術の成功が示されました (図 3)。

	qPCR	ddPCR	RT-qPCR	NGS
K2EDTA	✓	✓	✓	✓
PAXgene	✓	✓	未検査	✓
Streck	✓	✓	未検査	✓

図 3.異なるダウンストリームアプリケーションでの分離された核酸の有効活用。

ユーザーは、対象分子用の血漿インプットと溶出体積、また実験室で採用する以降の手順を最適化するか、関連するダウンストリームアプリケーションの具体的な性能を参照する必要があります。

溶出の安定性

溶出の安定性は、分離する核酸の含有量と種類、溶出体積、保存の条件に左右されます。溶出安定性は、ユーザーが特定の要件に応じて適宜設定することを推奨します。

溶出安定性は、BD Vacutainer K2EDTA Tube (Becton Dickinson) および安定化剤入り採取チューブ (PAXgene Blood ccfDNA Tube および Streck Cell-Free DNA BCT) から得られたヒト血漿由来の DNA と溶出液について検査しました。溶出液は、-30~-15 °C、-90~-65 °C で保存しました。最長 12 か月間、劣化は認められませんでした。2~8 °C および室温 (15~25 °C) で保存した溶出液は、最長 48 時間安定していました。ヒト 18S rDNA 遺伝子をターゲットとした qPCR で、すべての条件を評価しました。

溶出安定性は、BD Vacutainer K2EDTA Tubes (Becton Dickinson) から得られたヒト血漿由来の RNA と溶出液について検査しました。溶出液は、-30~-15 °C、-90~-65 °C で保存しました。最長 6 か月間、劣化は認められませんでした。2~8 °C で保存した溶出液は、最長 48 時間安定していました。ヒト β -アクチン遺伝子をターゲットとした RT-qPCR を使用して、すべての条件を評価しました。

このキットを QIAGEN ダウンストリームアプリケーションと組み合わせて使用する場合は、該当するキットのハンドブックを参照してください。

NA 分離の精度

ヒト血漿を用いて精度を評価し、ヒト 18S rDNA 遺伝子をターゲットとした qPCR で条件を評価しました。

実験設定は 12 の精製ランにより構成され、それぞれ 12 個のレプリケートを用いました (合計 144 の精製)。精製は、QIAamp DSP Circulating NA Kit の 3 つの異なるロットを用いて、3 つの異なる装置により、3 日に分けてオペレーター 3 名が行いました。各パラメーターと、QIAamp DSP Circulating NA Kit の全体的変動 (合計) について、標準偏差 (Standard Deviation, SD) と変動係数 (Coefficient of Variation, CV) を測定しました (表 1)。

表 1. 精度の結果

精度			
パラメーター	平均コピー数/ml	SD	CV (%)
実行 (ラン) 間	25894	461	1.78
オペレーター間		1392	5.38
装置間		228	0.88
日にち間		2096	8.09
ロット間		969	3.74
合計		3120	12.05

直線性

BD Vacutainer K2EDTA Tube、PAXgene Blood ccfDNA Tube、および Streck Cell-Free DNA BCT に保存した血液由来の血漿インプット量 1~5 ml についてデータが得られました。すべての BCT について、直線的な DNA 収量増が認められました (図 4 を参照)。BD Vacutainer K2EDTA Tube では、RNA の場合も同様でした。

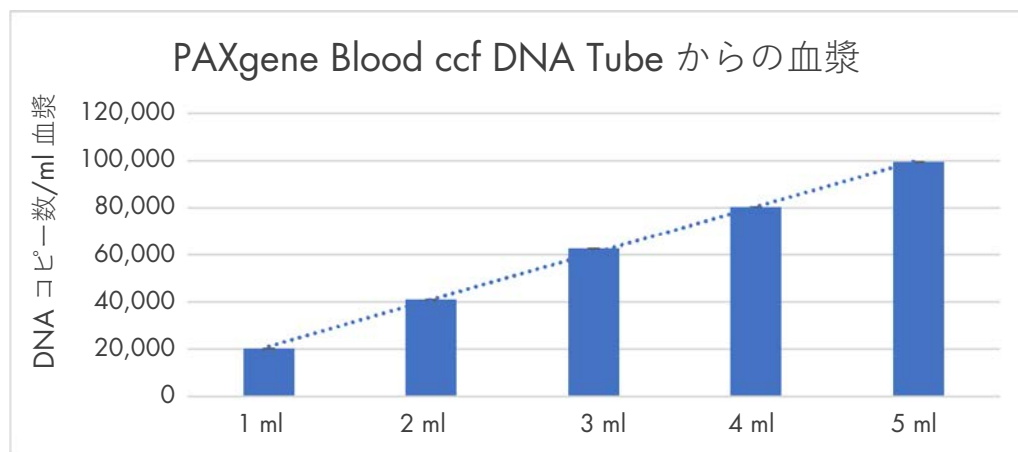


図 4. 異なる血漿インプットについて合計 DNA 収率 (DNA コピー数/ml 血漿インプット) の直線的増加。PAXgene Blood ccfDNA Tube から得られた血漿のデータを表示。BD Vacutainer K2EDTA Tube (DNA/RNA) および Streck Cell-Free DNA BCT から得られた血漿についても同様の結果となった。

プロトコール同等性 (Breeze/Classic プロトコール)

Breeze プロトコールと Classic プロトコール間の性能の同等性は、SD を Classic プロトコール (標準条件) の観察精度として、平均 Ct 値 (RNA) または平均コピー数/ml (DNA) における対応する相違の 95% 信頼限界が $\pm 2 \times \text{STD}$ 以内に収まったことにより示されました。3 つのキットロットを使用し、オペレーター 3 名が実験を行いました。

Breeze プロトコールについて得られた Ct 値の合計精度 (SD) は、Classic プロトコールの合計精度 (SD) についての両側 95% 予測区間の上限を下回りました。ここで、予測区間は、Classic プロトコールからのデータ ($n=143$) と、本試験における Breeze プロトコールのデータポイント数 ($n=144$) を用いて、試験内で算出しました。

妨害物質

潜在的な妨害物質の源は、天然の代謝物、患者の治療中に導入される物質、患者が摂取する物質など様々です。QIAamp DSP Circulating NA Kit では、ヘモグロビン、トリグリセリド、EDTA、カフェイン、アルブミン、抱合型ビリルビン、非抱合型ビリルビンを内因性構成要素として検査しました。qPCR をダウンストリームアプリケーションとして適用した場合、影響は検出されませんでした。さらに、サンプル処理工程や核酸抽出工程で、QIAamp DSP Circulating NA Kit の構成要素 (プロテイナーゼ K、Buffer ACL、Buffer ACB、Buffer ACW1、Buffer ACW2、エタノール) に由来する影響は認められませんでした。

妨害物質は複雑であり、特定のダウンストリームアプリケーションの感度は多様であるため、ユーザーは、使用するワークフローに固有の妨害物質の影響を評価し、特定のダウンストリームの診断アプリケーションで影響を管理する手法を検証することを推奨します。

特定の QIAGEN®ダウンストリームアプリケーションにおける妨害物質の詳細については、キットのハンドブックを参照してください。

クロスコンタミネーション

クロスコンタミネーションのレベルを評価するため、 10^5 コピーの HBV ウイルスを 5 ml または 2 ml のヒト血漿に添加し (陽性サンプル)、ウイルス無添加のサンプル (陰性サンプル) の隣で、陰性サンプルのみを含む抽出ランと交互のチェッカーボード設定で分離しました (抽出ラン間、抽出ラン内のクロスコンタミネーションを評価するため)。この検証は、ターゲット分子である核酸を多く含有するサンプルが抽出手順中に他のサンプルを汚染する状況の再現を試みたものです。核酸精製は単一のロットの試薬により行いました。クロスコンタミネーションは、artus® HBV RG CE PCR Kit を使って評価しました。その結果、システム全体でクロスコンタミネーションは認められませんでした。

ノート

改訂履歴

日付	変更
R1 09/2019	初版発行
R2 08/2021	<p>DNA について検査した溶出液の安定性のための保存条件を改訂： -30~-15 °Cおよび-90~-65 °Cの保存が最長 12 か月間可能。</p> <p>RNA について検査した溶出液の安定性のための保存条件を改訂： -30~-15 °Cおよび-90~-65 °Cの保存が最長 6 か月間可能。</p> <p>性能シートの誤りを修正：RNA 保存は室温（15~25 °C）で検査されていない。</p> <p>表 1 の SD 列と CV 列の精度試験データを修正。</p>

最新のライセンス情報と製品ごと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 から取得でき、もしくは QIAGEN テクニカルサービスないしは各地の代理店でご用意いたします。

商標：QIAGEN®、Sample to Insight®, QIAamp®, *artus*®, GeneRead®, GeneReader™ (QIAGEN Group)、BD Vacutainer®, Becton Dickinson® (Becton Dickinson and Co.), Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc.), PAXgene® (PreAnalytiX GmbH)、Streck®, Cell-Free DNA BCT® (Streck Inc.), Qubit® (Thermo Fisher Scientific またはその子会社)。

HB-0466-D01-002 © 2021 QIAGEN, all rights reserved.

