

기술 설명서

Maxwell[®] CSC Rapid ccfDNA Kit

제품 사용 지침서
AS1580

주의: 카트리지를 주의하여 취급하십시오. 싺 부분의 모서리가 날카로울 수 있습니다.

참고: Maxwell[®] CSC Rapid ccfDNA Kit를 사용하려면, Maxwell[®] CSC Rapid ccfDNA 싺험 방법을 Maxwell[®] CSC 또는 Maxwell[®] CSC 48 Instrument에 로드해야 합니다.



제품 사용
지침서

AS1580



Maxwell[®] CSC Rapid ccfDNA Kit

모든 기술 관련 문헌은 www.promega.com/protocols/에서 이용하실 수 있습니다.
 본 기술 설명서의 최신 버전을 사용하고 있는지 확인하기 위해 웹사이트를 방문하십시오.
 본 시스템 사용에 대해 궁금한 점이 있으면 [Promega Technical Services\(techserv@promega.com\)](mailto:techserv@promega.com)로 이메일을 보내 주십시오.

1. 설명	2
2. 제품 구성품, 보관 조건 및 기호 키	3
3. 제품의 의도된 목적/의도된 사용	5
4. 제품 사용 시 제한 사항	5
5. 혈장 샘플 준비	5
6. Maxwell [®] CSC Rapid ccfDNA Cartridges 준비	6
7. Maxwell [®] Instrument 설치 및 작동	9
8. 정제 후	10
9. 분석 성능 평가	11
9.A. ccfDNA 수량 및 품질	11
9.B. 증폭 가능성 및 억제(간섭 물질)	12
9.C. 형광 염료와 qPCR을 이용한 ccfDNA 정량화	13
9.D. 재현성	13
9.E. 교차 오염	14
9.F. 차세대 시퀀싱과의 호환성	14
9.G. 디지털 PCR과의 호환성	14
10. 임상 성능 평가	14
11. ccfDNA 작업 시 고려 사항	15
11.A. 혈장 준비	15
11.B. ccfDNA 정량에 대한 권장 사항	15
12. 문제 해결	16
13. 관련 제품	17

Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit는 특정 국가에서만 사용할 수 있습니다.

1. 설명

Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit는 인간 혈장 샘플 1~4ml에서 순환성 세포 유리 DNA(ccfDNA)를 효율적으로, 자동으로 추출하고 정제하는 쉬운 실험 방법을 제공하는 표 1에 명시된 Maxwell® Instruments와 함께 사용합니다. Maxwell® CSC Instruments는 사전 조제된 시약 카트리지와 사전 프로그래밍이 된 추출법을 함께 사용하도록 설계되어 단순성과 편의성을 극대화했습니다. Maxwell® CSC Rapid ccfDNA 실험 방법은 Maxwell® CSC Instruments 기기가 지원하는 최대 샘플 수를 30분 이내에 처리할 수 있습니다. 추출된 ccfDNA는 디지털 PCR 및 차세대 시퀀싱(NGS)과 같은 다양한 후속 응용 분야에 직접 사용할 수 있습니다.

표 1. 지원 기기.

기기	Cat.#	기술 설명서	최대 샘플 수
Maxwell® CSC	AS6000	TM457	16
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623	48

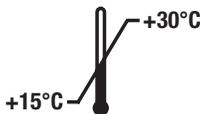
실험 방법 원리

Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit는 상자성 입자를 사용하는 혈장 샘플에서 ccfDNA를 정제하여 ccfDNA의 샘플 캡처, 세척 및 정제를 최적화하는 이동성 고체상을 제공합니다. Maxwell® Instruments는 자성 입자 처리 기기로 미리 채워진 카트리지의 첫 세 개 웰에 있는 상자성 입자에 ccfDNA를 효율적으로 결합합니다. 샘플은 ccfDNA 용출 전 일련의 세척을 통해 처리됩니다. 이러한 자성 포획의 접근 방식은 팁이 막히거나 시약의 일부만 전달하는 등 일반적인 문제를 방지할 수 있습니다. 이런 문제들은 다른 일반적으로 사용되는 자동화 시스템에서 부적절한 정제 처리를 야기합니다.

2. 제품 구성품, 보관 조건 및 기호 키

제품	크기	CAT. #
Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit	48회 전처리	AS1580

체외 진단용. 전문가 전용. 혈장 샘플로부터 48회 자동 ccfDNA 분리를 위한 충분한 시약이 포함됨. 카트리지는 일회용입니다.



포함 품목:

- 48 Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges(CSCS)
- 50 CSC/RSC Plungers
- 50 Elution Tubes (0.5ml)
- 20ml Elution Buffer (RCFD)
- 1ml Proteinase K(PK2) 용액

보관 조건: Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit를 15~30°C 사이에서 보관합니다.



안전 정보: 자세한 안전 정보는 안전보건 자료(SDS)를 참조합니다. 이 시스템에 사용되는 모든 화학 폐기물을 취급하고 폐기하기 위해 해당 연구소의 지침을 준수하십시오.



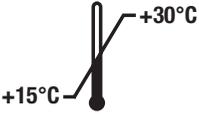
Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges(CSCS)는 잠재적인 감염 물질과 함께 사용하도록 설계되었습니다. 감염 물질을 취급하는 경우 적절한 보호 장비(예: 장갑 및 고글)를 착용하십시오. 이 시스템에 사용되는 모든 감염 물질의 취급 및 폐기는 해당 연구소의 지침을 준수하십시오.



주의: 카트리지를 주의하여 취급하십시오. 쉘 부분의 모서리가 날카로울 수 있습니다.

추가 정보: Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit의 구성품은 키트와 함께 작동될 수 있도록 적합성 및 품질 관리 검사를 받았습니다. 다른 키트 로트 간에 키트 구성품을 섞어서 사용하지 마십시오. 키트에 제공된 구성품만 사용하십시오. 추가 안전 정보에 대하여, 다음 주소에 있는 안전보건 자료(SDS)를 참조하십시오: www.promega.com

기호 키

기호	설명	기호	설명
	체외 진단용 의료 기기		공인된 대리점
	15~30°C 사이에서 보관하십시오.		제조사
	주의		자극성
	건강 위험		"n"회 테스트에 충분한 분량 포함
	Conformité Européenne		경고. 생물 재해.
	경고. 핀치 포인트 위험.		카탈로그 번호
	로트 번호		재사용 금지

3. 제품의 의도된 목적/의도된 사용

Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit는 Maxwell® CSC Instruments 및 Maxwell® CSC Rapid ccfDNA 실험 방법과 함께 인간 혈장 샘플에서 순환성 세포 유리 DNA(ccfDNA)를 자동으로 분리하는 체외 진단(IVD) 의료기기로 사용됩니다. 정제된 ccfDNA는 디지털 PCR을 포함한 증폭 기반 체외 진단 분석에 사용하기에 적합합니다.

Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit는 15~30°C 사이에서 사용하게 되어 있습니다. 이 온도 범위를 벗어나는 사용은 부적절한 결과를 야기할 수 있습니다.

Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit는 전문적인 목적으로만 사용할 수 있습니다. 이 시스템으로 정제된 ccfDNA를 사용하여 획득한 진단 결과는 다른 임상 또는 실험실 데이터와 연계하여 해석되어야 합니다.

4. 제품 사용 시 제한 사항

Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit의 성능은 Streck Cell-Free DNA BCT에서 채취한 전혈과 K₂EDTA 항응고제가 포함된 혈액 채취 튜브에서 준비한 인간 혈장 표본을 사용하여 평가되었습니다. 사용자는 다른 혈액 채취 튜브에서 채취한 혈장에서 ccfDNA를 정제하기 위해 Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit의 사용을 검증할 책임이 있습니다.

Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit를 사용하여 정제된 핵산의 차세대 시퀀싱(NGS) 사용에 대한 적합성은 제품 개발 중에 입증되었으나 검증되지는 않았습니다.

Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit로 정제한 ccfDNA를 사용하는 후속 진단 응용 분야는 적절하게 제어되어야 합니다. 후속 진단 응용 분야에 필요한 성능 특성을 확립하는 것은 사용자의 책임입니다.

5. 혈장 샘플 준비

사용자가 준비해야 하는 재료

- 전혈 또는 혈장
- 벤치탑 원심분리기

EDTA 튜브에서 채취한 전혈의 경우, 채취 즉시 혈액을 처리하거나 혈장 준비가 될 때까지 +2°C에서 +10°C에 보관해야 합니다. EDTA 튜브에서 채취한 전혈을 $\geq 2,000 \times g$ 에서 ≥ 10 분 동안 원심 분리하여 적혈구와 백혈구를 펠릿화합니다. Streck Cell-Free DNA BCT® 기기의 경우, 제조사 지침을 따릅니다. Streck Cell-Free DNA BCT® 또는 EDTA 혈액 채취 튜브에서 원심분리를 한 후, 피펫을 사용하여 연막을 손상하지 않고 조심스럽게 최대한 많은 혈장을 제거한 후 새 튜브로 옮깁니다. 백혈구가 옮겨지지 않도록 하려면, 혈장을 $\geq 2,000 \times g$ 에서 ≥ 10 분 동안 두 번째로 원심 분리한 후 상층액을 깨끗한 튜브로 옮깁니다.

혈장은 2~10°C로 최대 1주일까지 보관할 수 있습니다. 혈장을 더 오랫동안 보관하려면, -30~-10°C(또는 -65°C 이하)로 보관합니다. 혈장을 반복하여 냉동, 해동하지 않도록 하십시오. 냉동된 혈장을 사용할 때의 고려 사항은 섹션 11.A를 참조하십시오.

6. Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges 준비

1. Maxwell® CSC Cartridges, CSC/RSC Plungers 및 Elution Tubes(0.5ml)를 취급하기 전에 장갑을 교체하십시오. 용출 튜브와 마주하지 않도록 놓은 웰 #1(카트리지의 첫 번째 가장 큰 웰)과 함께 Maxwell® CSC/RSC 데크 트레이에 사용할 카트리지를 배치합니다. 해당 위치에 고정하기 위해 카트리지를 아래로 누릅니다. 전체 싺이 카트리지 상단에서 제거되도록 싺을 조심하여 벗겨내십시오. 장비 안에 카트리지를 위치시키기 전에 모든 싺 테이프 및 잔여 접착제가 제거되었는지 확인하십시오.



주의: 카트리지를 주의하여 다루십시오. 싺의 모서리가 날카로울 수 있습니다.

2. 총 혈장 샘플량에 따라 혈장을 표 2에 있는 Maxwell® CSC Rapid ccfDNA 카트리지의 웰 #1(가장 큰 첫 번째 웰), 웰 #1과 #3(첫 번째 및 세 번째 가장 큰 웰), 또는 웰 #1, #2 및 #3(세 개의 가장 큰 웰)로만 옮깁니다. 교차 오염을 방지하기 위해 서로 다른 혈장 샘플 간에 피펫 팁을 교체합니다.

표 2. 샘플 입력량에 따라 Maxwell® CSC Cartridge의 다른 웰로 혈장 샘플을 이동합니다.

샘플량(ml)	샘플 이동 지침
1.0ml에서 1.5ml 혈장	웰 #1에만 혈장을 추가합니다. 그림 1, 패널 A 참조.
혈장 >1.5ml에서 ≤3.0ml	웰 #1과 #3에 동일한 양의 혈장을 추가합니다. 그림 1, 패널 B 참조.
혈장 3.0ml에서 4.0ml	웰 #1, #2, #3에 동일한 양의 혈장을 추가합니다. 그림 1, 패널 C 참조.

참고:

- **웰당 혈장을 1.5ml 이상 분배하지 마십시오.**
- **혈장 입력 용량이 1.0~1.5ml인 경우, 전체 혈장 샘플을 웰 #1에만 로드해야 합니다.** 웰 #2 또는 #3에 혈장을 로딩하면 ccfDNA 복구에 부정적인 영향을 미칩니다.
- **혈장 입력 용량이 1.5~3.0ml인 경우, 혈장을 웰 #1과 #3에만 로드해야 합니다.** 다른 웰 구성(예: 웰 #2와 #3 또는 웰 #1과 #2)에 혈장을 로딩하면 ccfDNA 복구에 부정적인 영향을 미칩니다.

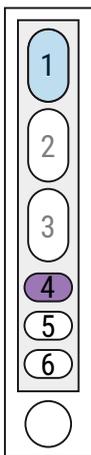
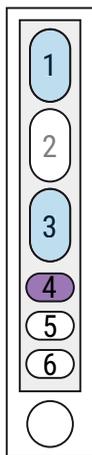
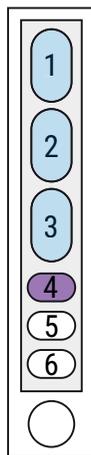
A. 1.0~1.5ml 혈장

B. 1.5~3.0ml 혈장

C. 3.0~4.0ml 혈장

19206MA

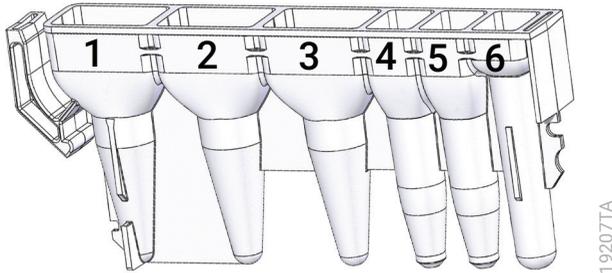
그림 1. Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridge에 있는 다른 웰로의 혈장 샘플 이동은 샘플 입력량을 기준으로 합니다. 1.0~1.5ml 혈장 샘플의 경우, 전체 샘플을 웰 #1로 옮깁니다(**패널 A**). 1.5~3.0ml 혈장 샘플의 경우, 동일한 양의 혈장을 웰 #1과 #3 양쪽으로 옮깁니다(**패널 B**). 3.0~4.0ml 혈장 샘플의 경우, 동일한 양의 혈장을 웰 #1, #2, #3으로 옮깁니다(**패널 C**). Proteinase K(PK2) 용액 10 μ l를 웰 #4에 분배합니다. Elution Tube(각 패널 하단에 원으로 표시)에 Elution Buffer(RCFD) 50 μ l를 추가합니다. 플런저를 웰 #6에 넣습니다.

3. Proteinase K(PK2) 용액 10 μ l를 웰 #4에 분배합니다.
4. 플런저 하나를 각 카트리지의 웰 #6에 넣습니다.
5. 데크 트레이의 각 카트리지에 빈 Elution Tube를 용출 튜브 위치에 놓습니다. 각 Elution Tube 하단에 Elution Buffer(RCFD) 50 μ l를 추가합니다.
6. 섹션 7, Maxwell® Instrument 설치 및 작동으로 진행합니다.

참고:

- a. 데크 트레이에 유출된 표본 또는 시약 유출액은 세정 용액으로 세척하고 살균 스프레이 또는 물티슈를 사용한 다음 물로 씻어야 합니다. Maxwell® Instrument 부품에는 표백제를 사용하지 마십시오.
- b. 키트에서 제공된 0.5ml Elution Tubes만 사용하십시오. 다른 튜브는 Maxwell® Instrument와 호환되지 않습니다.
- c. 제공된 Elution Buffer(RCFD)는 효율적인 ccfDNA 복구에 필수적입니다. Elution Buffer(RCFD)를 다른 용출 버퍼로 교체하지 마십시오. 다른 용출 버퍼를 사용하면 ccfDNA 복구에 부정적인 영향을 미칩니다.
- d. Elution Buffer(RCFD)가 50 μ l 미만일 경우 더 높은 ccfDNA 농도를 얻을 수 있지만, 총 수율은 감소할 수 있습니다.

6. Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges 준비(계속)



사용자가 추가하는 웰 내용물:

1. 혈장 샘플(자세한 내용은 표 2 및 그림 1 참조)
또는
- 1.,3. 혈장 샘플
또는
- 1.,2.,3. 혈장 샘플
4. Proteinase K (PK2) Solution
6. CSC/RSC Plunger

그림 2. Maxwell® CSC Cartridge. 혈장 샘플을 샘플량에 따라 웰 #1(샘플 1.0~1.5ml), 웰 #1 및 #3(샘플 1.5~3.0ml) 또는 웰 #1, #2 및 #3(샘플 3.0~4.0ml)에 추가하며, Proteinase K(PK2) 용액 10 μ l를 웰 #4에 분배하고 플런저를 웰 #6에 추가합니다.



그림 3. 데크 트레이의 설치 및 구성. Elution Buffer(RCFD)를 표시된 바와 같이 용출 튜브에 추가합니다. 플런저는 카트리지의 #6 위치에 있습니다. 표시된 데크 트레이는 Maxwell® CSC Instrument(Cat.# AS6000)에서 가져온 것입니다.

7. Maxwell® Instrument 설치 및 작동

자세한 정보는 Maxwell® CSC Instrument를 위한 작동 설명서를 참조하십시오. 표 1을 참조하십시오.

1. Maxwell® Instrument와 태블릿 PC를 켭니다. 태블릿 PC에 로그인하고, 바탕화면에서 아이콘을 더블 터치하여 Maxwell® CSC IVD-mode 소프트웨어를 시작합니다. 모든 동작 부품에 대한 자기 점검과 제 위치 확인을 통해 장비가 가동됩니다.
2. 'Home(홈)' 화면에서 **Start(시작)**을 선택하십시오.
3. Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit의 라벨의 우측 상단 모서리에 있는 바코드를 스캔하거나 입력하고 **OK(확인)**를 선택하여 실행할 방법을 자동으로 선택합니다(그림 4).

참고: Maxwell® CSC Instruments에서 ccfDNA 정제를 위해 Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit 실험 방법 바코드는 필수입니다. 키트 라벨에는 두 개의 바코드가 있습니다. 실험 방법 바코드는 그림 4에 표시되어 있습니다. 바코드를 스캔할 수 없으면, Promega Technical Services로 연락하십시오.



그림 4. 스캔용 바코드를 표시하는 키트 라벨. 정제 실행 시작을 위한 스캔용 바코드는 키트 라벨에서 파란색 상자 안에 있습니다.

4. 'Cartridge Setup(카트리지 설정)' 화면에서 Maxwell® CSC Rapid ccfDNA 실험 방법이 화면 상단에 표시되는지 확인합니다. 카트리지 위치를 선택하여 추출 실행에 사용할 모든 위치를 선택 또는 선택 해제합니다. 필요한 샘플 추적 정보를 모두 입력하고 **Proceed(진행)** 버튼을 선택하여 계속합니다.

참고: Maxwell® CSC 48 Instrument에서 **Front(앞으로)**와 **Back(뒤로)** 버튼을 사용하여 각 데크 트레이의 카트리지 위치를 선택하거나 선택 해제합니다.

5. 도어가 오픈된 후, 모든 추출 체크리스트 항목이 수행되었는지 확인하십시오. 혈장 샘플이 카트리지의 적절한 웰에 추가되었는지, Proteinase K(PK2) 용액이 카트리지의 웰 #4에 추가되었는지, 플런저가 웰 #6에 있는지, 카트리지가 기기에 로드되어 있으며 용출 튜브가 열려 있고 Elution Buffer(RCFD)가 있는지 확인합니다. 준비된 카트리지가 들어 있는 데크 트레이를 Maxwell® Instrument 플랫폼으로 옮깁니다.

Maxwell® 데크 트레이 삽입: 데크 트레이에서 카트리지 가 이탈되는 것을 방지하기 위해 데크 트레이 측면을 잡으십시오. 도어에 근접한 용출 튜브가 있는 Maxwell® Instrument에 데크 트레이가 위치되어 있는지 확인하십시오. 데크 트레이 후면 각도를 아래쪽으로 낮추어 장비 안으로 넣어 데크 트레이 후면이, 장비 플랫폼의 후면에 닿을 수 있게 합니다. 데크 트레이의 전면을 눌러 데크 트레이를 장비 플랫폼에 장착합니다. 데크 트레이를 플랫폼에 맞추기 힘든 경우, 데크 트레이가 올바른 방향으로 되어 있는지 확인하십시오. 데크 트레이가 기기 플랫폼 위에 평평하게 완전히 장착되었는지 확인하십시오.

참고: 24개 위치의 Maxwell® 데크 트레이에 있는 식별자를 확인하여 기기의 전면 또는 후면에 배치할지 결정합니다.

7. **Maxwell® Instrument 설치 및 작동(계속)**

6. **Start(시작)** 버튼을 선택하여 추출 실행을 시작합니다. 플랫폼이 들어가고 도어가 닫힙니다.



경고: 핀치 포인트 위험.

참고: 48개 위치의 Maxwell® Instrument를 사용한다면, Vision System이 활성화된 경우 플랫폼이 닫히면서 데크 트레이가 스캔 됩니다. 데크 트레이 설정의 오류(예: 플런저가 웰 #6에 들어가 있지 않고, 용출 튜브가 존재하지 않거나 열려 있음)는 소프트웨어가 'Cartridge Setup(카트리지 설정)' 화면으로 되돌아가게 하며, 문제 위치에는 느낌표가 들어간 빨간색 원이 표시됩니다. 오류에 대한 설명은 느낌표를 선택하고 모든 오류 상태를 해결합니다.

Start(시작) 버튼을 다시 선택하여 데크 트레이의 스캐닝을 반복하고 추출 작동을 시작합니다.

7. Maxwell® Instrument가 즉시 정제법을 실행합니다. 수행된 단계와 대략적인 잔여 실행 시간이 스크린에 표시됩니다.

참고:

- a. **Abort(강제 종료)** 버튼을 선택하면 실행이 중단됩니다. 실행이 중단된 모든 샘플은 손실됩니다.
- b. 실행이 완료되기 전에 중단된 경우, 플런저가 여전히 Maxwell® Instrument 플런저 바에 장착되어 있는지 확인하라는 메시지가 표시될 수 있습니다. 플런저 바에 플런저가 있으면 요청 시, **Clean Up(클린업)**을 수행합니다. 플런저 바에 플런저가 없으면 요청 시 **Clean Up(클린업)** 건너뛰기를 선택할 수 있습니다. 이 경우 샘플이 손실됩니다.

8. 실행이 완료되면, 정제가 종료되었음을 알리는 메시지가 사용자 인터페이스에 표시됩니다.

실행 종료

9. 실행 방법 종료 시 도어를 열기 위해 온-스크린 지침을 따르십시오. 실행 종료 시 플런저가 카트리지의 웰 #6에 있는지 확인하십시오. 플런저가 플런저 막대에서 제거되지 않은 경우, Maxwell® Instrument에 대한 기술 설명서 (표 1 참조)의 지침에 따라 **Clean Up(클린업)** 절차를 수행해 플런저를 장착 해제합니다.

10. 실행 후 용출액의 증발을 방지하기 위해 데크 트레이를 장비에서 즉시 제거하십시오. ccfDNA가 포함된 용출 튜브를 제거하고 튜브를 닫으십시오.

UV 살균 프로토콜을 실행하기 전에 핵산의 손상을 방지하기 위해 기기에서 정제된 핵산 샘플을 확실히 제거하십시오.



11. Maxwell® 데크 트레이에서 카트리지와 플런저를 제거하십시오. 해당 연구소의 절차에 따라 유해 폐기물을 폐기하십시오. Maxwell® CSC Cartridges, CSC/RSC Plungers 또는 용출 튜브를 재사용하지 마십시오.



8. **정제 후**

후속 분석에 사용하기 전에 정제된 ccfDNA 샘플이 후속 분석의 입력 요건을 충족하는지 확인하십시오. 정제된 ccfDNA 샘플을 즉시 처리하지 않는 경우, ccfDNA 샘플을 4°C에서 최대 7일 동안 보관합니다. 장기간 보관하려면 -20°C 또는 -70°C 이하에서 냉동합니다. 특정 ccfDNA 샘플의 보관 및 처리 권장 사항에 대해 후속 응용 분야를 위한 지침서를 참조하십시오.

9. 분석 성능 평가

Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit의 분석 성능은 Maxwell® CSC 및 Maxwell® CSC 48 Instrument에서 처리된 인간 혈장 샘플을 사용하여 평가되었습니다. ccfDNA의 양, 품질, 증폭 가능성, 재현성 및 교차 오염과 같은 주요 지표를 평가하여 후속 응용 분야용 Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit로 추출한 ccfDNA의 신뢰성과 적합성을 확인했습니다.

9.A. ccfDNA 수량 및 품질

혈장 샘플이 K₂EDTA 튜브 또는 Streck Cell-Free DNA BCT® 기기에서 채취한 6명의 개인의 혈액에서 분리되었습니다. ccfDNA는 Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit를 사용하여 1~4ml의 혈장 샘플에서 추출되었습니다. ccfDNA 양과 품질은 조건별로 하나의 생물학적 복제본을 TapeStation 분석(Agilent Technologies, Inc.)을 사용하여 평가하였으며, 이는 단편 품질을 반영하는 세포 유리 DNA(cfDNA)의 비율과 가장 큰 DNA 피크 크기에 중점을 두었습니다. cfDNA 비율은 TapeStation 분석에 의해 결정된 정제된 샘플 내에서 50~700bp 범위의 DNA 단편이 전체 DNA 양에서 차지하는 비율을 의미합니다. 이 값은 ccfDNA에 대한 샘플 농축의 척도를 제공하며, 이는 세포 사멸 후 분절된 DNA에서 유래하였으므로 일반적으로 크기가 더 작습니다.

TapeStation 분석 결과, cfDNA 비율은 76~93% 범위였으며, 모든 정제된 ccfDNA 샘플에서 가장 큰 피크 크기는 177~203bp 사이였습니다. 다양한 항응고제 튜브 또는 다양한 혈장 샘플 입력 용량에서 추출한 ccfDNA의 비율이나 품질에는 유의미한 차이가 없었습니다.

표 3. 다양한 혈장 샘플 입력 용량과 항응고제에서 세포 유리 DNA 비율과 최대 피크 크기를 보여주는 정제된 ccfDNA TapeStation 분석.

샘플 ID(항응고제)	혈장 샘플 입력 용량(ml)	세포 유리 DNA 비율	최대 피크 크기(bp)
1 (K ₂ EDTA)	1.0	81	186
	1.5	79	181
	3.0	80	183
	4.0	79	183
2 (K ₂ EDTA)	1.0	81	177
	1.5	88	178
	3.0	84	179
	4.0	91	175
3 (K ₂ EDTA)	1.0	90	184
	1.5	90	187
	3.0	89	183
	4.0	88	185

샘플 ID(항응고제)	혈장 샘플 입력 용량(ml)	세포 유리 DNA 비율	최대 피크 크기(bp)
4 (Streck)	1.0	93	195
	1.5	76	200
	3.0	89	193
	4.0	84	192
5 (Streck)	1.0	92	195
	1.5	92	197
	3.0	90	195
	4.0	89	194
6 (Streck)	1.0	89	183
	1.5	79	182
	3.0	86	203
	4.0	86	203

9.B. 증폭 가능성 및 억제(간접 물질)

정제된 ccfDNA의 증폭 가능성과 억제 부족은 qPCR 분석을 사용하여 75bp DNA 표적을 증폭하고 모든 억제에 대한 qPCR 데이터를 분석하여 평가되었습니다. ccfDNA는 K₂EDTA 튜브 또는 Streck Cell-Free DNA BCT® 기기에서 6명의 개인으로부터 채취한 인간 혈장 샘플 4ml 각각에서 4회 추출되었습니다. 추출된 각 ccfDNA 샘플은 qPCR 분석을 통해 평가되었습니다. 평균 내부 양성 대조군(IPC) | ΔC_q | 값은 억제 정도를 결정하기 위해 qPCR 증폭 ccfDNA 샘플의 농도에 가장 가까운 농도의 qPCR 표준을 기준으로 값을 계산했습니다.

qPCR 결과(표 4)에 따르면, 모든 정제된 ccfDNA 샘플에서 평균 IPC | ΔC_q | 값이 ≤ 0.5 로 나타나 증폭 억제는 최소 또는 전혀 없음을 나타냈습니다.

표 4. 4ml 인간 혈장 샘플에서 추출한 ccfDNA 증폭을 통한 억제 평가.

샘플 ID(항응고제)	평균 IPC ΔC_q
1 (K ₂ EDTA)	0.2
2 (K ₂ EDTA)	0.2
3 (K ₂ EDTA)	0.4
4 (Streck)	0.5
5 (Streck)	0.3
6 (Streck)	0.3

9.C. 형광 염료와 qPCR을 이용한 ccfDNA 정량화

ccfDNA 정량의 일관성은 이중 가닥 DNA 특이형 형광 염료 기반 방법과 75bp DNA 표적을 증폭하는 qPCR 분석을 사용하여 ccfDNA 농도를 비교하여 평가되었습니다. K₂EDTA 튜브 또는 Streck Cell-Free DNA BCT® 장치에서 6명의 개인으로부터 채취한 4ml의 인간 혈장 샘플에서 4회 추출한 ccfDNA 샘플을 분석에 사용했습니다. qPCR 기반 ccfDNA 정량에 대한 형광 기반 ccfDNA 정량의 비율이 계산되었습니다.

결과는 두 정량 방법 간의 강한 상관관계를 보여주었으며, 모든 샘플에서 ccfDNA 농도 비율은 0.7에서 1.4 사이였습니다.

표 5. 형광 기반 및 qPCR 기반 정량 실험 방법을 사용한 ccfDNA 농도 비교.

샘플 ID(항응고제)	형광 대 qPCR 농도 비율
1 (K ₂ EDTA)	0.7
2 (K ₂ EDTA)	1.3
3 (K ₂ EDTA)	0.9
4 (Streck)	1.3
5 (Streck)	0.9
6 (Streck)	1.4

9.D. 재현성

Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit 사용 시 ccfDNA 추출 재현성은 ccfDNA 수율에 대한 실행 중 및 실행 간 백분율 변동 계수 (CV)를 분석하여 평가되었습니다. K₂EDTA 항응고제에 채취된 혈장 4ml를 이용해 Maxwell® CSC 및 Maxwell® CSC 48 Instruments를 모두 사용하여 3회 연속 추출 실행을 통해 ccfDNA를 추출했습니다. 각 추출 실행에서 24개의 ccfDNA 용출액이 생성되었으며, ccfDNA 수율은 75bp DNA 표적을 증폭시키는 qPCR 분석을 사용하여 정량화되었습니다.

결과에 따르면 Maxwell® CSC Instrument 및 Maxwell® CSC 48 Instrument의 실행 중 백분율 CV 값은 각각 11%와 14%였습니다. 실행 중 백분율 CV 값은 두 기기 모두에서 5%였습니다.

표 6. ccfDNA 수율의 실행 중 및 실행 간 변동성

기기	항응고제	혈장 샘플 입력 용량(ml)	실행 중 백분율 변동 계수	실행 간 백분율 변동 계수
Maxwell® CSC	K ₂ EDTA	4	11%	5%
Maxwell® CSC 48	K ₂ EDTA	4	14%	5%

9.E. 교차 오염

Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit를 사용한 ccfDNA 추출 중 교차 오염 가능성은 Maxwell® CSC 및 Maxwell® CSC 48 기기의 교대 데크 위치에 배치된 인간 및 소 혈장 샘플을 처리하여 평가했습니다. 소 혈장에서 추출된 ccfDNA 용출액은 인간 특이적인 75bp DNA 표적을 증폭하는 qPCR 분석을 통해 인간 DNA가 오염되어 있는지 확인했습니다.

인간 혈장 샘플을 소 혈장 샘플에 인접한 Maxwell® Instrument 데크 위치에서 처리한 경우, qPCR 분석에서 모든 소 ccfDNA 용출액은 정량화 가능한 양의 인간 DNA를 나타내지 않았으며, 이는 검출 가능한 교차 오염이 없음을 확인해 줍니다.

9.F. 차세대 시퀀싱과의 호환성

ccfDNA 용출액과 차세대 시퀀싱(NGS) 워크플로의 호환성은 ccfDNA 라이브러리 준비와 TapeStation 분석을 통해 평가되었습니다. ccfDNA는 Maxwell® CSC 또는 Maxwell® CSC 48 Instrument와 함께 Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit를 사용하여 K₂EDTA 튜브 또는 Streck Cell-Free DNA BCT® 기기에서 채취된 혈장 샘플에서 추출되었습니다. 성공적인 라이브러리 준비는 TapeStation 분석에서 특징적인 어댑터 염기쌍 이동을 관찰하여 결정되었습니다.

평가된 모든 ccfDNA 라이브러리는 예상되는 어댑터 염기쌍 이동을 보여주었고, 성공적인 NGS 라이브러리 준비를 확인했습니다.

9.G. 디지털 PCR과의 호환성

ccfDNA 용출액과 디지털 PCR(dPCR) 워크플로의 호환성은 액적 디지털 PCR 분석을 사용하여 평가되었습니다. 이 연구에는 K₂EDTA 튜브와 Streck Cell-Free DNA BCT® 기기에서 채취된 인간 혈장에서 추출한 ccfDNA 샘플이 포함되었으며, 혈장 샘플 입력 용량은 3ml 및 4ml였습니다. ccfDNA 용출액은 Copy Number Variation Assay(PIK3CA 유전자)를 사용하여 평가되었으며 액적 개수가 기록되었습니다.

결과는 테스트 된 모든 ccfDNA 샘플에서 성공적인 증폭을 보여주었으며, 반응당 액적 수는 15,000개를 초과했습니다.

10. 임상 성능 평가

Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit의 임상 성능은 Maxwell® CSC 48 Instrument로 처리된 인간 혈장 샘플을 사용하여 외부 임상 실험실에서 평가되었습니다.

첫 번째 연구에서, 두 테스터는 Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit와 실험실에서 참조로 사용하는 표준 정제 방법을 모두 사용하여 1.5ml 인간 혈장 샘플(n = 10)에서 ccfDNA를 독립적으로 정제했습니다. 결과적으로 얻어진 ccfDNA 용출액은 증폭 기반 분석을 사용하여 Rhesus 인자에 대해 분석되었습니다. Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit를 사용하여 인간 혈장 샘플에서 추출한 ccfDNA는 실험실 참조 실험 방법을 사용하여 추출한 ccfDNA로 얻은 결과와 일치하는 예상 결과를 보였습니다.

두 번째 연구에서는, 두 테스터가 Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit를 사용하여 1.5ml 인간 혈장 샘플(n = 10)에서 ccfDNA를 독립적으로 정제했습니다. 정제된 ccfDNA 용출액은 증폭 기반 분석을 사용하여 Rhesus 인자에 대해 분석되었으며, 두 테스터 간에 일치하는 결과를 얻었습니다.

11. ccfDNA 작업 시 고려 사항

11.A. 혈장 준비

ccfDNA를 정제할 때 발생할 수 있는 문제 중 하나는 용해된 백혈구에서 유래한 게놈 DNA가 오염되는 것입니다. 혈장은 일반적으로 두 번 원심 분리되며, 첫 번째 원심분리에서는 적혈구와 백혈구를 제거하고, 두 번째 원심분리에서는 잔여 백혈구를 제거합니다. 혈액 샘플을 실온에서 장기간 배양했거나 처리 전에 냉동 및 해동한 경우, 일부 백혈구가 용해되어 게놈 DNA를 혈장으로 방출했을 수 있습니다.

혈장 샘플이 냉동된 경우, 해동 후 냉동침전물이 있을 수 있습니다. 냉동침전물은 Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit를 사용한 ccfDNA 정제에는 영향을 미치지 않지만, 혈장 피펫팅에는 영향을 줄 수 있습니다. 냉동침전물을 펠릿화하려면, 처리 전에 혈장 샘플을 $\geq 1,000 \times g$ 에서 ≥ 5 분 동안 원심분리 합니다.

11.B. ccfDNA 정량에 대한 권장 사항

ccfDNA의 낮은 농도와 분절된 특성은 독특한 도전 과제입니다. 건강한 사람의 혈장에서는 혈장 밀리리터당 ccfDNA 수율은 5~30ng이 일반적입니다. 대부분의 ccfDNA 단편은 대략 160~200bp이며, 추가 단편은 대략 340~510bp입니다.

UV 정량

260nm 흡광도를 사용한 ccfDNA 농도의 정확한 측정은 낮은 농도 때문에 어렵습니다. 일부 제품은 ccfDNA 정제를 촉진하기 위해 운반체 RNA를 사용합니다. 운반체 RNA는 ccfDNA보다 훨씬 더 많은 양으로 존재하며 함께 정제됩니다. 이에 따라 잘못된 A_{260} 값이 나와 실제보다 훨씬 높은 ccfDNA 농도가 나타날 수 있습니다. 정확한 정량을 위해 형광 염료 또는 PCR을 사용합니다.

형광 기반 정량

이중 가닥 DNA 특이형 염료의 높은 민감도는 ccfDNA 정량화에 더 적합하지만 두 가지 우려 사항이 있습니다. 첫 번째 우려 사항은 운반체 RNA와 관련이 있습니다. 이중 가닥 DNA 특이형 염료는 RNA보다 DNA에 대해 훨씬 더 높은 특이성을 가지지만, 다른 ccfDNA 키트에서 높은 수준의 운반체 RNA가 상대 형광 단위(RFU) 값을 부풀려 ccfDNA 농도가 실제 농도보다 높게 나타날 수 있습니다.

두 번째 우려 사항은 형광 염료에 사용되는 표준이 일반적으로 고분자량 게놈 또는 람다 DNA라는 것입니다. ccfDNA는 매우 분절되어 있고 분자량이 상대적으로 낮습니다. 따라서 고분자량 DNA만큼 효과적으로 형광 염료를 결합하지 못하여 농도가 낮아질 수 있습니다. 가능하면, 더 정확한 정량화를 위해 낮은 분자량 DNA 표준을 사용하는 것이 좋습니다.

증폭 기반 정량

qPCR 또는 디지털 PCR은 가장 정확한 ccfDNA 정량을 제공합니다. 민감도 외에도 증폭 기반 정량은 증폭 기반 후속 응용 분야에 대한 샘플의 적합성을 표시할 수 있습니다.

12. 문제 해결

본 문서에서 해결되지 않는 문제가 있는 경우, 현지 Promega 지사나 대리점으로 문의하십시오. 다음 주소에서 연락처 정보를 확인할 수 있습니다: www.promega.com. 이메일: techserv@promega.com

증상	원인과 설명
플런저를 픽업할 수 없는 장비	Maxwell® CSC 전용 화학 키트를 사용하고 있는지 확인하십시오. Maxwell® CSC 키트의 플런저는 지원되는 Maxwell® Instruments에 맞게 특별히 설계되어 있습니다(표 1 참조).
낮은 ccfDNA 수율	<p>Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit는 최대 4ml의 혈장 샘플을 처리할 수 있습니다. 최대 4ml의 혈장을 사용하여 반복 추출.</p> <p>1ml 미만의 혈장을 사용할 경우, ccfDNA 복구에 부정적인 영향을 미칠 수 있습니다.</p> <p>정확한 양의 Proteinase K(PK2) 용액이 카트리리지 웰 #4에 정확히 추가되었는지 확인합니다. Proteinase K(PK2) 용액 10µl를 웰 #4에 분배한 후 반복 추출.</p> <p>50µl 미만의 Elution Buffer(RCFD)에서 용출하면 수율이 감소할 수 있습니다. Elution Buffer(RCFD) 50µl를 사용하여 반복 추출.</p> <p>제공된 Elution Buffer(RCFD)는 효율적인 ccfDNA 복구에 필수적입니다. Elution Buffer(RCFD)를 다른 용출 버퍼로 교체하지 마십시오. Elution Buffer(RCFD)를 사용하여 반복 추출.</p> <p>혈장이 Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridge의 올바른 웰로 전달되었는지 확인합니다(섹션 6의 표 2 및 그림 1 참조).</p> <ul style="list-style-type: none"> • 혈장 입력 용량이 1.0~1.5ml인 경우, 모든 혈장을 웰 #1로 옮깁니다. • 혈장 입력 용량이 1.5~3.0ml인 경우, 혈장 용량을 웰 #1과 웰 #3에 동일하게 나눕니다. • 혈장 입력 용량이 3.0ml~4.0ml인 경우, 동일한 양의 혈장을 웰 #1, #2와 #3에 추가합니다.
계놈 DNA 오염	혈장 준비 과정에서 용해된 백혈구가 포함되어 있을 수 있습니다. 전혈에서 혈장 샘플을 준비하는 방법에 대한 권장 사항은 섹션 5 및 11.A를 참조하십시오.

사용자 또는 환자의 사망 또는 중상을 초래했거나 초래할 수 있는 장치와 관련하여 발생한 모든 심각한 사건은 즉시 제조사에 보고되어야 합니다. 유럽 연합 기반의 사용자는 또한 모든 심각한 사건을 사용자 및/또는 환자가 있는 회원국의 관할 당국에 보고해야 합니다.

13. 관련 제품

제품	크기	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument*	각 1개	AS6000
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	각 1개	SP6019
Maxwell® CSC 48 Instrument*	각 1개	AS8000
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	각 1개	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	각 1개	AS8402
RSC/CSC Plungers	50/팩	AS1331
Elution Tubes(0.5ml)	50/팩	AS6201
Elution Magnet, 16 위치	각 1개	AS4017
Elution Magnet, 24 위치	각 1개	AS4018

*체외 진단용. 본 제품은 특정 국가에서만 사용할 수 있습니다.

Maxwell® CSC Reagent Kits

사용할 수 있는 Maxwell® CSC 추출 키트 목록은 www.promega.com에서 확인하십시오.



© 2025 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Maxwell은 Promega Corporation의 등록 상표입니다.

Cell-Free DNA BCT는 Streck LLC의 등록 상표입니다.

제품은 특허 출원 중이거나 특허를 받았을 수 있으며 특정한 제한사항이 있을 수 있습니다. 자세한 정보는 당사 웹사이트를 참조하십시오.

모든 가격과 사양은 사전 예고 없이 변경될 수 있습니다.

제품의 청구 사항이 변경될 수 있습니다. Promega 제품의 최신 정보는 Promega Technical Services로 문의하시거나 Promega 온라인 카탈로그를 확인해 주십시오.