연구장비성능평가 절차서: PE-DPCR-001-2022

디지털 PCR의 DNA 측정정밀도 · 정확도 성능평가 절차
- Performance Evaluation Procedure for DNA measurement precision and accuracy using digital polymerase chain reaction -

KRISS 한국표준과학연구원
Korea Research Institute of Standards and Science

KRISS	성능평가 절차서	절차서 등록번호	PE-DPCR-001-2022
		제·개정번호	00
	디지털 PCR DNA 측정 정밀도·정확도 성능평가 절차	제정일	2022.12.00
		최종 개정확인일	

□ 성능평가 절차서 담당부서 : 화학바이오표준본부 바이오분석표준그룹

□ 절차서 작성자 : 배영경, 김세일, 이다혜, 유희민

□ 제·개정 이력 내역

구분	제·개정번호	최종 개정·확인일자	제·개정 내용 요약
제정	00	2022. 12. 00	ISO/IEC 17025의 요건에 따라 제정

□ 절차서 목차

1. 적용범위 ····· 2
2. 인용표준 ····· 3
3. 용어의 정의 ····· 3
4. 평가내용 ····· 5
5. 준비사항 ····· 6
6. 소요장비 명세 ····· 7
7. 평가 방법 ····· 9
8. 평가 결과의 기록 ····· 16
9. 성능평가결과서 작성방법 ····· 17
10. 유효성 검증방법 ····· 18
11. 기타 ····· 18

[별첨 1] 기술절차서 유효성 자체평가서 ·····

[별첨 2] 성능평가 결과서 작성 예시 1 ·····

[별첨 3] 연구장비성능평가 결과서 표지 예시 1 ·····

서론

본 성능평가 절차서는 연구장비로써 개발된 디지털 PCR 성능을 측정정밀도와 정확도에 초점을 맞추어 측정장비로서의 성능을 평가하는 방법을 기술한다.

디지털 PCR장비는 특정 염기서열을 지닌 증폭가능한 유전자 조각의 복제수를 측정한다. 그러므로, 본 절차를 따르면 하나의 디지털 PCR 장비를 이용하여 특정 유전자 복제수를 측정하고, 해당 측정불확도를 평가하게 된다. 그 측정값의 표준편차를 바탕으로 정밀도 등을 평가할 수 있다. 하지만 타 방법으로 검증된 값의 비교를 통해 측정값 자체의 정확도를 평가할 수 있다. 이는 인증표준물질을 이용하여 구현될 수 있으며, 특정 인증표준물질의 인증값과 평가 대상 장비의 측정값을 비교하여 평가한다.

1. 적용범위

본 성능평가 절차서는 디지털 PCR을 이용하여 특정 서열을 지닌 DNA를 정량하였을 때 도출될 수 있는 정밀도와 정확도를 평가하는 절차를 서술한다. 그러므로 이 평가절차는 염기서열을 알고 있는 DNA 조각을 포함한 분자의 복제수를 측정하는 방법이다. 원칙적으로 DNA 분자의 형태를 가진 모든 DNA 종류에 적용될 수 있다. 주로 유전체 DNA (genomic DNA), 플라스미드(plasmid DNA) 등을 정량하는 데에 활용된다. 다양한 매질(혈장, 혈청, 세포배양액 등)에서 추출된 DNA도 정량의 대상이 될 수 있으나, 추출 효율 등은 본 절차서의 고려대상이 아니다. 또한 RNA에서 만들어진 complementary DNA도 template DNA로서 사용될 수 있으나, RNA를 DNA로 변환하는 역전사(reverse transcription) 효율은 본 절차서에서 고려하지 않는다.

다만, PCR 반응의 내재적 특성상, 염기서열을 특이적으로 인식하는 primer의 annealing이 타겟 DNA 양끝에 필요하다. 그러므로 약 50 basepair 이하의 DNA 조각들은 PCR 방법으로 amplification될 수 없으므로 dPCR을 통한 정량 대상이 아니다.

PCR assay 디자인의 검증 및 최적화는 dPCR 기반 정량의 기본이다. 본 절차서에는 기본적으로 검증되고 최적화된 PCR assay가 있는 상황에서 적용된다. 관심 타겟에 따라 검증된 어세이를 사용하면 다양한 염기서열을 가진 DNA에 적용할 수 있다. 다중 타겟 DNA의 경우에도 적용될 수 있으나, 여러 프라이머와 프로브 간의 dimer 형성 등은 결과값에

영향을 주므로 사용될 assay들의 상호영향없음이 신청기관에 의한 검증 후 평가 가능하며 정밀도 평가에만 적용가능하다.

2. 인용표준

① ISO 20395:2019 Biotechnology — Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences — qPCR and dPCR [1]

② ISO 17511:2020 — In vitro diagnostic medical devices — Requirements for establishing metrological traceability of values assigned to calibrators, trueness control materials and human samples [2]

③ ISO 18153:2003, In vitro diagnostic medical devices — Measurement of quantities in biological samples — Metrological traceability of values for catalytic concentration of enzymes assigned calibrators and control materials [3]

④ ISO/IEC Guide 98-2008, Uncertainty of measurement [4]

⑤ ISO/IEC 17025: Testing and calibration laboratories

3. 용어의 정의

3.1 cDNA (상보적 DNA, complementary DNA)

RNA 염기서열에 상보적인 서열을 갖는 DNA를 의미하며 역전사효소에 의하여 만들어진다.

3.2 Copy number (복제 개수)

해당 서열을 가진 유전자 가닥의 개수를 의미하며 예를 들어 10 copy number/μL는 1 μL 물 또는 완충액에 포함된 특정서열을 가진 RNA 혹은 DNA 유전물질이 10 가닥 들어 있음을 나타낸다.

3.3 DNA (deoxyribo nucleic acid)

DNA는 데옥시리보핵산 deoxyribonucleotide monomer (단량체)의 고분자 물질로써 생명체의 유전 정보를 저장하는 물질이다.

3.4 dPCR (digital polymerase chain reaction, 디지털 PCR)

PCR mixture를 droplet (오일방울)이나 microfluidic (미소유체) chip을 이용하여 구획을 아주 작은 단위로 분리시켜 PCR을 진행하는 방식이다. 한 구획 안에 미세량((0 - 2) copies)의 DNA가 들어가 증폭하게 되면 표준곡선없이 세밀한 정량이 가능한 기술이다.

3.5 EP tube (microcentrifuge tube)

1.5 mL 까지 용액을 넣을 수 있는 폴리프로필렌(polypropylene) 재질이며, 경첩형태의 뚜껑(hinged lid)이 달린 용기로 시약을 섞을 때 사용한다.

3.6 PCR (중합효소 연쇄 반응, polymerase chain reaction)

PCR은 시험관에서 특정 DNA 또는 유전자 절편을 선택적으로 증폭해 내는 반응이다. PCR로 증폭된 DNA는 특정 유전자의 존재 유무 분석, 병원균 감염 정량 분석, 돌연변이 검출, 유전자 발현 측정, 유전자 조작 등 다양한 생물학적, 의학적 사용 용도를 갖는다. PCR을 수행하기 위해서는 분석 대상 시료 DNA, 증폭될 DNA 위치를 결정하는 특정한 염기서열을 가진 프라이머 쌍, 내열성 DNA 중합효소, DNA 합성에 필요한 핵산 단량체 등이 필요하며 일반적으로 (50 - 94) ℃의 열순환 반응을 프로그램에 따라 수행하는 특수한 열순환 반응기를 필요로 한다.

3.7 Template DNA (주형 DNA)

PCR 반응 서열을 갖는 DNA를 말하며 합성 제조, PCR 생산물, 플라스미드, 생명체 유래 genomic DNA 등이 해당된다.

3.8 Partition (droplet, chamber)

PCR 반응액이 나뉘어진 작은 볼륨 (대부분 1 nL 이하)의 단위이며, 반응 후에 각 단위당 정량하고자 하는 DNA가 포함되어 형광값이 나오면 양성 파티션 (positive partition)으로, 타겟 DNA가 포함되지 않아 형광값이 매우 낮으면 음성 파티션 (negative partition)으로 구분된다.

3.9 Rain

형광의 세기가 양성과 음성 파티션의 그룹핑에서 사이를 가지는 중간 형광값의 파티션을 칭한다.

3.10 threshold

PCR 반응이 끝난 후에 형광의 세기를 기준으로 양성과 음성 파티션을 나누는 기준선이다.

3.11 NTC (no template control)

template DNA가 제외된 음성 컨트롤 PCR 반응이다. 이는 시약 및 환경으로부터의 DNA 오염이 없음을 확인하기 위하여 각 실험마다 반드시 포함되어야 하며, 주로 nuclease free water를 template DNA 대신 넣는다.

3.12 PCR assay

증폭하고자 하는 염기서열의 양 끝에 위치하는 primer 한 쌍을 기본적으로 칭하며, hydrolysis probe (aka. Taqmann probe)를 사용하는 경우에는 probe를 포함하여 assay라고 칭한다.

4. 평가내용

본 절차는 디지털 PCR 성능관련 다음의 2가지 항목중 하나 또는 그 이상을 평가한다.

1) DNA 측정의 정밀도
2) DNA 측정의 정확도

4.1 개요

정밀한 핵산 측정법으로 알려진 digital PCR (dPCR, 디지털 중합효소연쇄반응)을 이용한다. 본 절차서에서 다루는 용액 속의 DNA를 측정하면서 다음 값들을 기록하여 분석에 활용한다.

- 반응에 들어가는 template DNA의 부피
- dilution factor
- the number of accepted droplets/partitions (유효한 미세방울/파티션 개수)
- copy number concentration(복제 개수 농도)

4.1.1 횟수

dPCR은 기본 한 PCR plate당 3회 반복을 기본으로 하며, 가능하다면 assay 별 반복을 기본으로 하며 NTC를 반드시 포함시킨다 (그림 1). 성능평가 시 DNA 표준물질을 검증된 어세이와 섞은 후 한 tube에서 3번 샘플링하여 dPCR 수행한다. 실험적 반복성을 확인하기 위하여 시료를 준비하는 것부터 일시 혹은 실험자를 변화시켜 3회 반복 실험한다.

4.1.2 평가항목

DNA 특정 염기서열을 가진 유전자가 속한 DNA 조각의 copy number concentration (복제 개수 농도)를 측정하는 용도로 개발된 dPCR 연구장비의 성능평가를 위해서는 두 가지 측정항목을 고려할 수 있다.

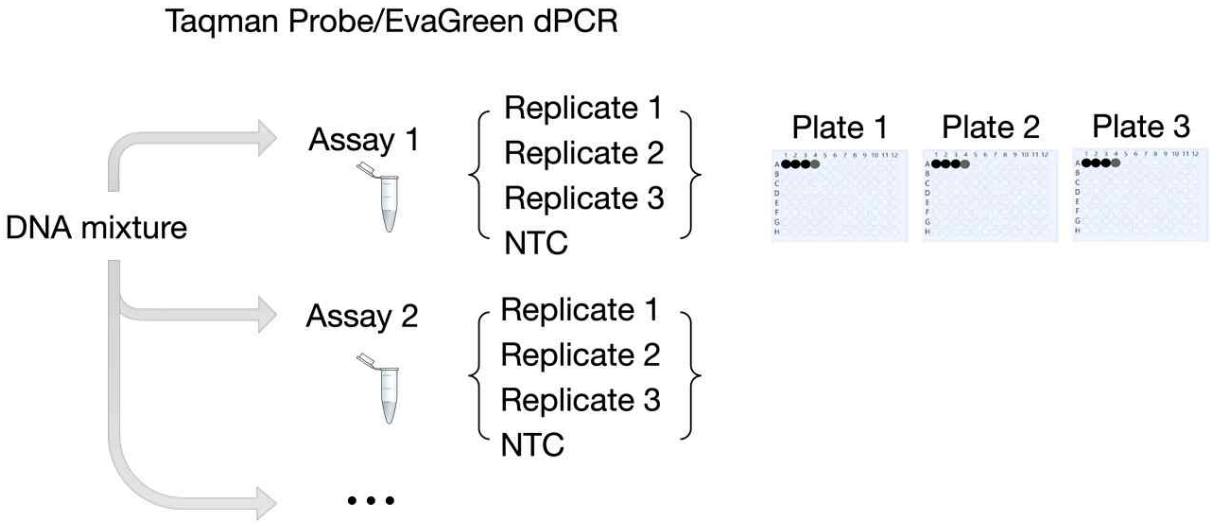


그림 1 dPCR 실험 기본 세팅

(1) precision (정밀도): 이는 특정 DNA 타겟을 하나 이상의 최적화된 PCR assay로 측정하였을 때의 측정불확도로 판단한다. 정밀도를 판단하는 최적의 DNA 농도 범위는 해당 장비의 dynamic range를 고려하여 설정한다.

(2) accuracy (정확도): 특정 장비의 측정 정확성을 평가하기 위해서 실험을 디자인하는 경우, 측정의 대상은 측정소급성을 지닌 인증표준물질으로 하는 것이 바람직하다. dPCR의 측정성능을 평가하기 위해서는 인증값으로 DNA 분자수 농도가 특정된 인증표준물질을 사용한다. 이 인증표준물질의 인증값이 증폭기반인 dPCR 방법만 사용한 것보다, 이를 포함하여 직접계수법 혹은 분석화학적 접근법을 이용하여 결정된 경우 성능평가의 신뢰도를 더욱 높일 수 있다. 기준물질로 사용되는 물질은 성능평가를 의뢰한 기업에서 제공할 수 있다. 이 경우에도, 측정소급성이 확보된 인증표준물질일 경우에만 측정정확도 평가가 가능하다. 또한, 인증표준물질의 정보값을 dPCR로 제공할 때 사용되었던 PCR assay를 원칙적으로 사용한다. 해당 장비의 측정 정확성은 통계적으로 인증값과 측정값을 비교하여 종합적으로 판단한다.

4.2 성능평가를 위한 측정의 원리

• Digital PCR

PCR 반응할 때와 마찬가지로 측정하고자 하는 주형 DNA, primer-probe, Taq polymerase, dNTP, 버퍼 등을 넣어 만든 PCR 반응혼합액이 작은 부피(주로 0.8-1.0nL, 장비마다 상이)의 파티션으로 나누어진다. PCR은 각 파티션 안에서 단독적으로 수행되며, 주형 내 특정 염기서열과 프라이머가 결합하면서 증폭된다. 증폭되는 과정에서 형광물질이 달린 프로브가 끼어 들어가 형광을 배출하는데, 이때 나온 각 파티션 당의 형광의 세기를 기준으로 양성 파티션은 '1'로 읽고 음성 파티션은 '0'으로 읽는다. 전체 파티션의 수와 양/음성 파티션의 비율을 바탕으로 Poisson distribution (포아송 분포)에 의해 증폭된 타겟 DNA 분자수를 확률적으로 계산하고 이를 바탕으로 PCR reaction에 쓰였던 template DNA 내 총 DNA 분자수 혹은 복제수 농도를 얻는다.

현재 다양한 방식의 파티셔닝을 기반으로 한 dPCR이 개발되어 상용화되고 있다. 현재 상용화된 모든 방식의 상용장비의 사용법을 나열하는 것보다는, 본 절차서에는 droplet dPCR의 실험 과정을 예제로 제시하였다. 최근에 개발되고 있는 마이크로웰 방식의 dPCR도 기술의 성숙도가 검증된 경우 수요가 있을 때 적용가능하며, 결과해석하는 데에는 아래와 유사한 분석법이 쓰인다.

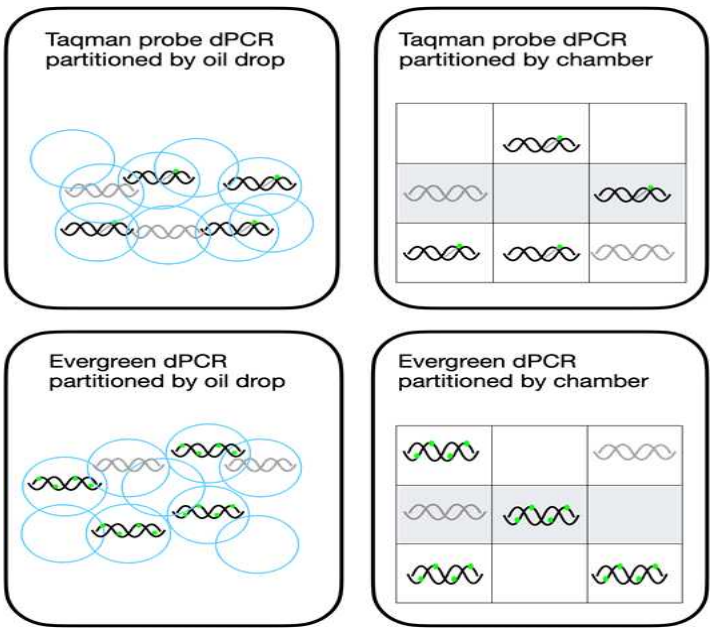


그림 2 파티션을 통한 dPCR 개념. droplet을 이용한 partition 방식의 digital PCR (왼), 및 chamber/well/chip을 이용한 partition 방식의 digital PCR (오). 위는 Taqman probe 사용 아래는 Evagreen 사용 digital PCR 원리

5. 준비사항

5.1 측정 전 준비물

원칙적으로 아래 시약과 유사하거나 그 이상의 성능을 가진 시약을 사용한다 [1-6, 15-18].

기타	• Sterilized & Nuclease-free 1.5 mL EP tube 및 PCR tube • Nuclease free water 및 filter pipet tip • 20 μL, 200 μL, 1000 μL 기계식 pipets • 96-well reaction plate (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) • 멸균된 0.2 mL PCR Tubes (PCR Tubes with Flat Cap, 0.2 mL, Axygen USA) • dNTP mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) • 보호장갑, 보호의 및 고글을 포함한 개인보호구 • 70% 에탄올(EtOH)

5.2 필요 환경조건

(1) 실험실 환경으로부터의 오염이 없는 PCR 전용 시약, 소모품 및 피펫을 사용한다.
(2) 실험 수행자 및 보조 수행자는 실험복, 방진마스크, 장갑을 착용한다.
(3) 시약은 온도에 민감하므로 기본적으로 냉장 상태를 유지할 수 있도록 하고, 적정온도에서 작업이 이루어지도록 한다.
(4) 작업 전후에 벤치 및 기구는 70% EtOH (에탄올) 등을 사용하여 멸균하고 오염을 제거한다.
(5) 발생한 폐기물은 물질별로 폐기물 배출기준에 따라 처리 및 처분한다.
(6) 생물 및 유전자재조합 실험 심의 결과에 따른 생물안전등급에 적절한 연구시설에서 작업이 수행되어야 한다.

6. 소요장비 명세

공통적으로, 예시와 동일한 등급 혹은 그 이상의 품질의 장비 및 시약을 사용할 것을 권고한다.

6.1 주요장비

(1) PCR 장비 (Veriti 96-Well Thermal Cycler)

- 용도: PCR cycling 및 other temperature-controlled experiments [5]

	Veriti™ 96-Well Thermal Cycler
Block format	0.2 mL alloy
Features	Standard 0.2 mL format and sample block

Max block ramp rate	3.9 °C/s
Max sample ramp rate	3.35 °C/s
Enabled to run Fast chemistry	Yes
Temperature accuracy	±0.25 °C ((35 - 99.9) °C)
Temperature range	0 °C–100.0 °C
Temperature uniformity	<0.5 °C (20 sec after reaching 95 °C)
PCR volume range	(10 - 100) µL

(2) dPCR 장비 (예시: QX200, Bio-Rad)

- 용도: droplet digital PCR용 droplet generating and reading [10]

QX200 Droplet Generator	
Starting sample size	20 µL
Capacity	(1 - 8) samples/cartridge
Droplets per sample	20,000
QX200 Droplet Reader	
Precision	±10 %
Linear dynamic range	5 orders of magnitude
Capacity	1-96 samples
Droplets per 96-well plate	Approximately 1,500,000
Sample illumination	Light-emitting diodes
Sample detection	Multipixel photon counter
Detection channels	FAM (EvaGreen), HEX (VIC)

- ddPCR automated droplet generator (if applicable) [11]

Starting sample size, µL	20
Automated Droplet Generator capacity	(1 - 96) samples/run
Droplets per 20 µl sample	20,000
QX200™ Droplet Reader capacity	(1 - 96) samples
Sample illumination	Light-emitting diodes
Sample detection	Multi-pixel photon counter
Detection channels	FAM (EvaGreen), HEX (VIC)
Linear dynamic range	5 orders of magnitude
Precision	±10 %
Droplets per 96-well plate, million	~1.5

6.2 보조장비

- Mettler XP205 Analytical Balance [6]

Maximum Capacity	220 g
Readability	0.01 mg
Repeatability	(0.015 - 0.03) mg
Linearity	0.1 mg
Adjustment with internal weights	proFACT, fully automatic time- and temperature-controlled adjustment
Sensitivity temperature drift	1 x 10^-6/°C ·Rnt

Taring range	(0 - 220) g
Minimum weigh (typical acc. USP)	21 mg
Minimum weigh (typical, U=1%, sd=2)	1.4 mg
Eccentric Load	0.2 mg
Sensitivity offset	2x10^-6·Rnt
Settling Time	1.5 s
Usable height of draft shield	235 mm
Sensitivity Accuracy	2x10^-6·Rnt
Sensitivity Stability	1x10^-6/a·Rnt

7. 평가 방법

7.1 평가 절차

7.1.1. (선택) 전처리 과정 – 희석

필요한 경우 시료를 측정하기에 적정 농도가 되도록 순차적으로 희석한다. dPCR로 얻은 값은 무게법으로 기록한 희석비율로 나누어 최종 측정값을 구한다.

7.1.2 digital PCR (디지털 중합효소연쇄반응) 셋업

Digital PCR 기기 제조사에서 제공하는 반응액 제조법에 따라 반응혼합물을 제조하며, 이것의 조성과 총 부피는 이미 장비에 적용될 수 있는 조건으로 주어지므로 특정 지을 수 없다. 그렇지만 기본적으로 PCR에 필수적인 화학조성 (dNTP, assay, polymerase, Mg^{2+}, template DNA, distilled water, buffer)이 포함된다.

DNA 시료와 시약을 섞은 반응 혼합물이 만들어지면 vortexer (교반기)를 이용해 잘 섞어주고, 원심분리기로 혼합물을 가라앉힌 후, 제조사에서 제공하는 방법에 따라 파티셔닝을 수행한다. 일례로 droplet generation (미세방울 생성)이 필요한 장비의 경우 아래 그림과 같은 절차를 거쳐 PCR을 진행한 후 형광값을 읽는 리더기(그림 3)를 이용하여 분석을 시작한다.

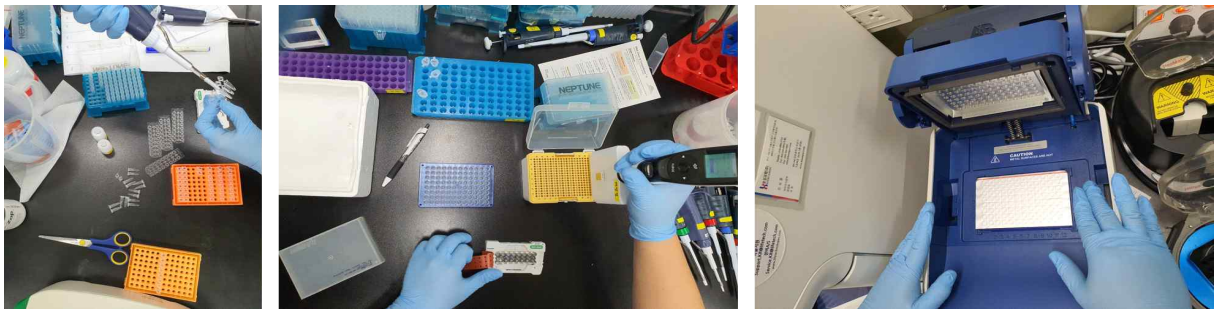


그림 3 과정 사진: 반응액 준비 (왼쪽), 오일 방울 형성 후 PCR plate로 옮기는 모습 (가운데), PCR 기계에 넣는 모습 (오른쪽)

PCR 조건은 에세이마다 차이가 있을 수 있으나 대략적으로는 다음과 같다.

Cycling step	Temperature, ℃	Time	Ramp Rate	Number of cycles
Enzyme activation	95	10 min	2 ℃/s	1
Denaturation	95	30 s		40-70
Annealing/extension	58-60	1 min		
Droplet stabilization	98	10 min		1
Hold (optional)	4	∞		1

7.1.3 데이터 분석

원본 데이터를 분석 소프트웨어에서 형광값의 threshold (기준)를 결정하여 positive (양성)와 negative (음성)를 나눈다 (그림 4). 이 때 negative sample (DNA를 넣지 않은)의 형광값이 negative (음성)의 수준을 결정하는 기준이 된다. 이때, 명백한 양성군과 음성군 사이에 존재하는 파티션인 'rain' 이 존재하는 경우 thereshold 세팅에 따라 결과값이 달라진다. 이는 하나의 불확도 요인으로 평가되어야 한다. 측정결과는 copy number concentration (복제 개수 농도)이 담긴 Microsoft Excel로 내보내어 분석된다.

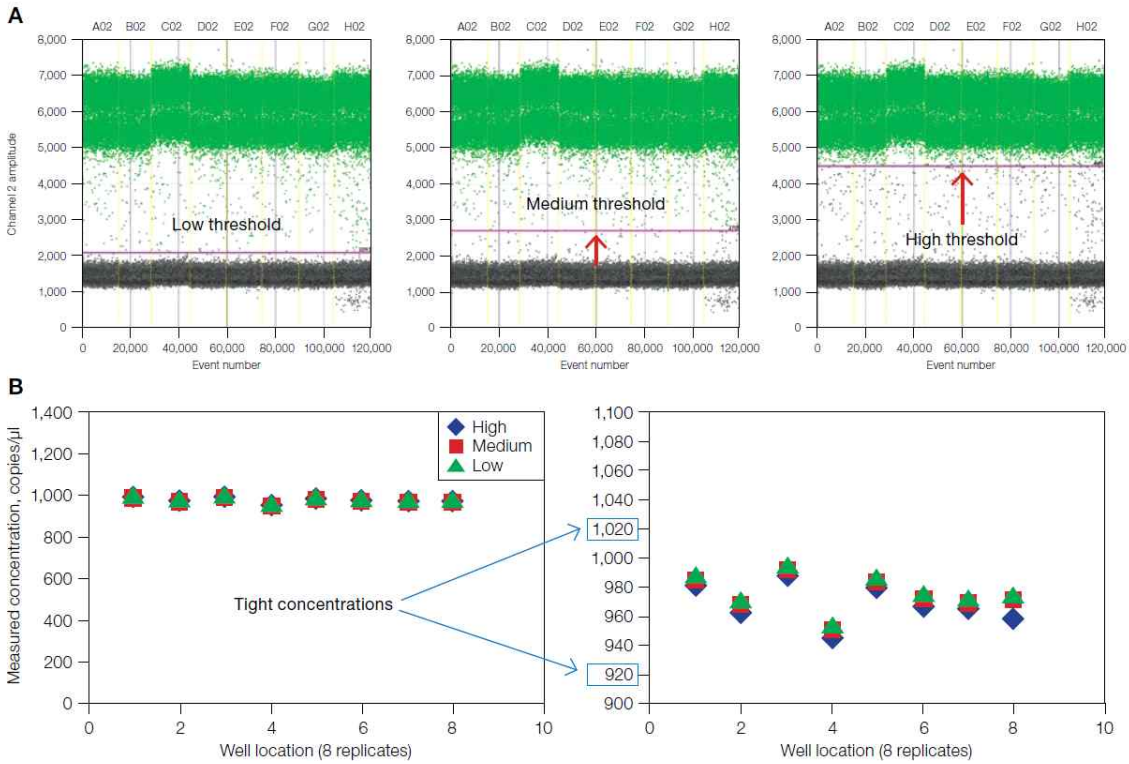


그림 4 dPCR data 분석 예시 (Biorad applications guide)

7.1.4 안전관련 주의사항 및 측정 요령

(1) PCR 장비 작동시 장비의 뚜껑 (lid)은 PCR tube와 접촉하여 105 ℃를 유지하므로 화상에 주의한다. 특히 plate sealer (180 ℃)를 이용하는 경우 고온 기기 취급에 주의한다.

(2) 각 장비는 사용 후 기기 전원을 끈다.

7.2 특정 측정기술의 신뢰성

7.2.1 PCR 기술의 공통적인 특성

PCR을 통한 유전자증폭기술은 염기서열 특이적인 반응을 기반으로 한다. 염기서열 특이성은 PCR 반응에 들어가는 oligonucleotides (올리고뉴클레오타이드)인 primer (프라이머) 한 쌍이 주형 유전자에 서열 특이적으로 반응하여 증폭시키는 과정에서 발생된다. 그러므로 primer (프라이머)의 디자인 그리고 이에 따른 PCR 반응 조건을 최적화하는 과정이 필수적으로 요구된다. 이러한 기본적인 PCR 기술은 흔히 end-point PCR이라고 불리며 특정 염기서열이 있는지 없는지 정성적으로 판단하는 데 그친다.

PCR이 정량성을 갖기 위해서는 염기서열 특이적인 유전자 정량에는 qPCR (real-time PCR) 기술이 널리 쓰인다 (그림 5). 이는 유전자 증폭과정에서 발생하는 형광물질을 실시간으로 검출하여 형광의 세기가 threshold 이상이 되는 cycle number를 기준으로 calibration을 하여, 이러한 external calibration을 통해 간접적으로 특정 유전자의 정량이 가능하다. 여기에서 쓰이는 형광물질은 double-stranded DNA에 비특이적으로 chelating 되는 SYBR green 혹은 Evagreen이다. 이러한 dye들은 PCR amplicon에 결합하여 형광을 낸다. 하지만 PCR amplification이 서열 특이적으로 일어나더라도 이 형광물질의 반응이 서열 비특이적이기 때문에 발생할 수 있는 (예: primer dimer detection, non-specific amplification) 반응이므로 정량에 있어 정확도가 비교적 낮다.

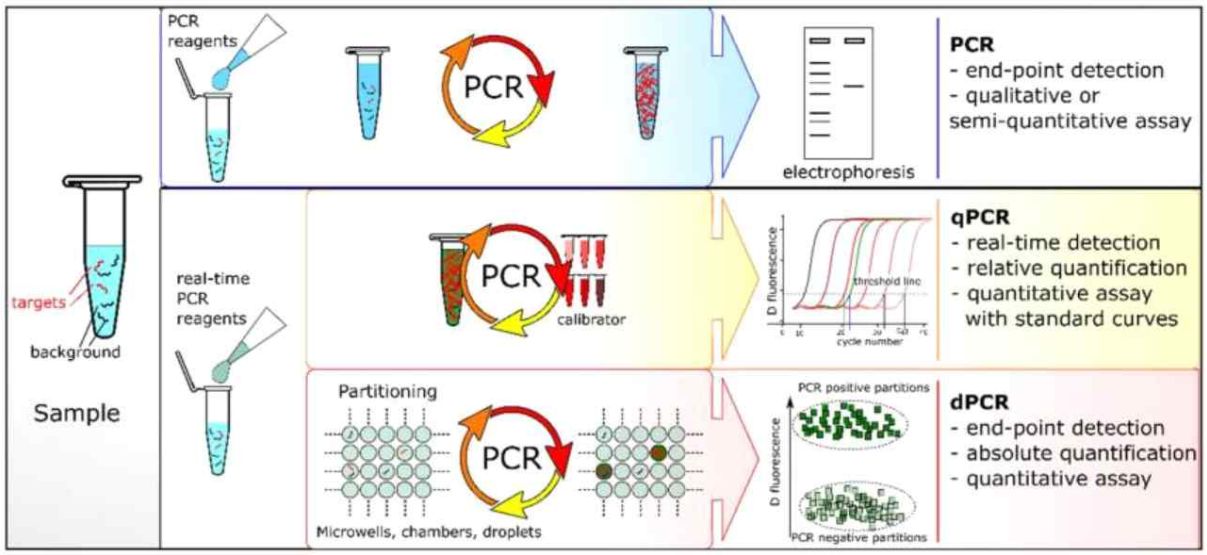


그림 5 PCR, qPCR, dPCR의 비교 [7]

qPCR의 염기서열 특이적 정량성은 형광물질과 quencher (퀜처)를 포함한 probe를 더하여 향상될 수 있다. 이 probe (프로브)는 PCR primer pair (프라이머쌍)의 사이에 존재하는 염기서열을 포함하는 single stranded DNA (단일가닥 DNA) 형태이며, 증폭 과정에서 가수분해 (hydrolysis)며 형광물질이 unquench (퀜처에서 벗어나게)되어 발생하는 형광 세기를 측정한다. 염기서열 특이성이 probe (프로브)의 상보적인 결합에 의해 한층 더 보완되는 것이다.

7.2.2 digital PCR (디지털 중합효소연쇄반응)

• **dPCR 기술의 신뢰성**

dPCR (디지털 중합효소연쇄반응)은 calibration-free, high sensitivity, high precision (민감도가

높고, 정밀하며 기준물질에 의존하지 않는)으로 염기서열 특이성 유전자 절대정량이 가능하다는 검증받은 기술이다. 이를 이용한 DNA의 copy number concentration (복제 개수 농도) 값의 정확도 (accuracy)는 flow cytometry (유세포분석기)와 isotope dilution-mass spectrometry (동위원소 질량분석법)와의 비교연구를 통해서도 확인되었다 [8, 9]. 또한, 다양한 dPCR 형식의 복수 장비 간에도 동등한 값을 보인다 [8, 10]. 물론 이를 위해서는 PCR 반응중에 일어날 수 있는 molecular drop-out을 최소화하여야 한다. PCR assay design (primer와 probe design), cycling condition (반응 조건) 등을 포함한 체계적인 최적화 과정이 필수적이다. 또한, 정확한 값을 얻기 위해서는 PCR 반응당 적정한 농도의 positive molecule이 나오도록 주형 DNA 양 조정이 필요하다.

dPCR 기술로 얻을 수 있는 값은 특정 염기서열을 갖는 유전자의 amplifiable copy number concentration (증폭 가능한 복제 개수 농도)이다. 이와 같은 dPCR을 통한 enumeration-based (계수기반) 측정법은 primary reference measurement procedure (최상위 측정법)가 될 수 있으며 이를 인정받기 위한 노력이 시작되고 있다. Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM) database에도 reference measurement procedure (기준 측정법)로 dPCR (디지털 중합효소연쇄반응)을 이용한 특정 DNA 정량법이 한 건 등록되었다 [9]. 하지만 신뢰성을 확보하기 위해서는 상기한 사전 검증을 통해 최적화가 필요하며, 측정불확도를 제시해야 한다.

• dPCR 측정값의 신뢰의 수준 확보를 위한 고려사항

(1) partition number

Digital PCR은 반응이 수만 개 이상의 partition (구획) 또는 droplet (미세방울)로 나누어진 상태에서 일어난다. 한 반응이 나누어지는 평균 partition (구획) 또는 droplet (미세방울)의 개수는 상용화된 장비에 따라 다르다. partition (구획) 또는 droplet (미세방울)로 개수 자체는 dPCR 측정값의 dynamic range와 신뢰의 수준을 좌우하는 척도이다. 하나의 장비를 이용한다면 적정선 이상의 partitioning에 의해 나온 측정값만을 취하는 것이 필요하다. 예시로 QX200 장비를 이용하는 경우, dPCR 이후 각 partition (구획) 또는 droplet (미세방울)이 가지는 형광값을 읽는 과정에서 accepted droplet (유효 미세방울 개수)의 수를 샘플 별로 확인하여 9,000개 이상인 well에서 나온 측정값만 취한다. 다른 장비를 이용할 경우, 유사하게 최소 파티션의 수를 지정할 수 있다.

(2) partition volume

dPCR을 이용하여 특정 유전자 절대 정량을 copy number concentration (복제 개수 농도)는 Poisson distribution을 이용한 다음과 같은 수식으로 얻어진다.

$$C = -\ln\left(1 - \frac{N_{positive}}{N_{total}}\right) \times \frac{10^3}{Vp} \times D$$

C: copy number concentration (copy number per μL) in the dPCR reaction, $N_{positive}$: the number of positive partitions, N_{total}: the number of total accepted partitions, Vp: partition volume in nL. D: dilution factor from the test solution to the dPCR mix when prepared volumetrically

그러므로 Vp값의 불확도를 반영하여 기준값인 copy number concentration (복제 개수 농도)를 제시한다. Vp에 대한 측정을 dPCR 실험을 수행할 때마다 하는 것을 비현실적이므로 문헌조사를 통해 Vp의 실제 측정값의 range를 얻어 이를 copy number concentration (복제 개수 농도)에 반영하도록 한다. Vp 실제 측정값은 카트리지의 종류, PCR premix의 종류, 등에 따라 차이가 있다고 알려져 있다.

(3) the mean number of target copies per partition

위에서도 잠시 언급된 the mean number of target copy per droplet (λ)은 아래 수식으로 얻어진다.

$$\lambda = -\ln\left(1 - \frac{N_{positive}}{N_{total}}\right)$$

λ는 dPCR 측정값의 불확도에 영향을 미친다. 다양한 파티션 수 (미세방울 개수)에 따라 불확도의 값은 상이하지만, 어떠한 경우에라도 λ 값이 ~1.6인 경우에 불확도가 가장 낮다는 점은 같다.

(4) PCR efficiency to prevent molecular drop-out

PCR 효율 확인은 dPCR assay 최적화 과정에 해당된다. 순차적으로 희석된 샘플을 이용하여 qPCR C_q value 기울기 값을 통해 구할 수 있다. 이론적으로 cycle마다 효율이 100%이면 cycle 별로 2배가 늘어난다. 이러한 효율는 assay design, 효소 활성정도, template DNA의 형태(genomic DNA, plasmid DNA, fragmented DNA 등)에 의해서도 영향을 받는다.

7.3 분석 절차에 대한 유효성 평가

(1) 결과에 영향을 미치는 요인 분석 및 기준값의 정확도를 보장하기 위한 체계적인 측정법 최적화와 결과값에 영향을 미치는 요인들의 리스트와 그에 상응하는 검증방법 및 대응법은 다음과 같다.

	요인	검증방법
1	dPCR value analysis	• 사용자에 의해 흔들릴 수 있는 threshold setting (기준선 잡기) 등을 불확도에 포함 • 사용자의 에러를 최소화하는 명확한 가이드 제시
2	Assay optimization	• 복수의 assay (어세이)들간의 비교 (systemic comparison) • 프라이머-프로브 농도(primer and probe concentration)
3	PCR cycling optimization	• annealing-extension temperature and duration (PCR 반응 조건) • ramp rate (온도 변화 속도) • 위의 자세한 사항들을 가이드로 제시
4	dPCR 특이적인 요소들 - number of partitions - lambda	• partition (구획) 수를 일정값 이상일 경우에만 취함 • negative partition %를 (10 - 70) % 로 한정

(2) 결과에 대한 측정불확도 평가

Type A 와 Type B uncertainty (불확도)에 대해 항목별로 계산하고 합성한다. 기본적으로 불확도는 ISO/IEC Guide 98-3[4]에 따라 합성한다. 확장불확도를 얻기 위한 coverage factor는 95% level of confidence (신뢰의 수준)를 갖도록 반복실험의 수를 감안하여 얻는다.

(3) PCR assay들의 선형성 확인

순차희석된 DNA template를 사용하여, PCR 어세이의 선형성을 확인한다. 해당 장비의 dynamic range내에서 선형성은 그래프의 R^2값이 0.95 이하일 경우에는 불합격으로 간주한다.

(4) 인증표준물질과 이미 검증된 assay로 시험하는 것을 기본으로 하되 적용될 수 있는 인증표준물질이 없는 경우, 표준물질을 이용하여 기술을 검증한다.

8. 평가 결과의 기록

Type A	불확도 요소	설명 및 산출근거

	사용자간의 차이	사용자간 동일 시료 실험값의 표준편차
	측정법의 반복성	동일 시료 반복 실험값의 표준편차
Type B	partition volume	volume에 대한 불확도
	manual thresholding	사용자 간의 setting에 따른 값 비교
	microbalance uncertainty during gravimetric dilution	저울의 불확도
	assay간의 차이	유사한 성능을 보이는 assay 사용시 측정값의 표준편차

측정불확도를 산출하기 위해 위의 요소 등을 고려하여 합산한다. 저울을 이용하여 희석된 물질에 대한 불확도 총괄표는 다음과 같다. 파티션 부피에 대한 불확도는 기존 문헌이나 직접 측정값 등을 이용하여 구할 수 있다.

기호		불확도 요인	확률분포	감도계수	자유도	값
		표준편차 (사용자간의 차이 및 측정법의 반복성)	정규	1	9	
	s					
	$u_{S\text{-partition volume}}$	partition volume에 대한 불확도	직사각형	1		
	$u_{S\text{-manual thresholding}}$	사용자간의 setting에 따른 값 비교	정규	1	∞	
	$u_{S\text{-balance}}$	저울의 불확도	정규	1	∞	

위의 총괄표를 참고하여 각 불확도요소를 합성하여 측정불확도를 산출한다. 예를 들어 하나의 유전자 부위의 불확도는 다음과 같이 계산되어 합성된다. 희석된 물질의 경우 저울의 불확도가 포함된다. 확장불확도 = 합성불확도 × k 이다.

하나 이상의 타겟 DNA와 검증된 assay를 이용하여 측정된 값의 확장불확도는 기기의 precision에 반영될 수 있다. 하지만, 실제 실험을 디자인할 때는 위에서 언급된 lambda value, assay optimization 등이 종합적으로 고려되어야 한다.

9. 성능평가결과서 작성방법

성능평가결과서에 일반적으로 포함해야 할 사항은 다음과 같다.

(1) 평가기관명 및 의뢰기관명
(2) 평가번호
(3) 평가일자
(4) 평가환경: 평가 시 온도 및 습도
(5) 사용한 PCR 장비 제작사, 모델 및 일련번호
(6) 사용한 시료 성분의 농도 (인증표준물질을 사용한 경우, 인증값)
(7) 사용한 PCR 장비의 소급성
(8) 평가에 사용한 성능평가절차서명 또는 방법
(9) 평가결과 (불확도, 신뢰구간 등)
(10) 기타 의견 및 참고사항

10. 유효성 검증방법

유효성 검토 내용은 별첨한다.

☐ 교정용 표준기 또는 인증표준물질 이용
☐ 다른 교정·시험, 표준물질제조 인증방법으로 획득한 결과와의 비교
☐ 교정/시험기관 간 비교 및 숙련도 시험
☐ 결과에 영향을 미치는 요인에 대한 체계적인 검토
☐ 결과에 대한 측정불확도 평가
☐ 기타 유효화 방법 _____

11. 기타 (참고문헌)

[1] ISO 20395:2019 Biotechnology — Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences — qPCR and dPCR.

[2] ISO 17511:2020 — In vitro diagnostic medical devices — Requirements for establishing metrological traceability of values assigned to calibrators, trueness control materials and human samples.

[3] ISO 18153:2003, In vitro diagnostic medical devices — Measurement of quantities in biological samples — Metrological traceability of values for catalytic concentration of enzymes assigned calibrators and control materials.

[4] ISO - ISO/IEC Guide 98-3:2008 - Uncertainty of measurement — Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM:1995), https://www.iso.org/standard/50461.html (accessed June 20, 2020).

[5] Veriti Thermal Cycler User Guide, (2010) 124.

[6] Mettler XP205 Analytical Balance Manual

[7] P.L. Quan, M. Sauzade, E. Brouzes, DPCR: A technology review, Sensors. 18 (2018). https://doi.org/10.3390/s18041271.

[8] H.B. Yoo, S.R. Park, L. Dong, J. Wang, Z. Sui, J. Pavsic, M. Milavec, M. Akgoz, E. Mozioglu, P. Corbisier, M. Janka, B. Cosme, J.J.D. V. Cavalcante, R.B. Flatshart, D. Burke, M. Forbes-Smith, J. McLaughlin, K. Emslie, A.S. Whale, J.F. Huggett, H. Parkes, M.C. Kline, J.L. Harenza, P.M. Vallone, International comparison of enumeration-based quantification of DNA copy-concentration using flow cytometric counting and digital polymerase chain reaction, Anal. Chem. 88 (2016) 12169–12176. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03076.

[9] A.S. Whale, G.M. Jones, J. Pavšič, T. Dreo, N. Redshaw, S. Akyurek, M. Akgoz, C. Divieto, M. PaolaSassi, H.-J. He, K.D. Cole, Y.-K. Bae, S.-R. Park, L. Deprez, P. Corbisier, S. Garrigou, V. Taly, R. Larios, S. Cowen, D.M. O'Sullivan, C.A. Bushell, H. Goenaga-Infante, C.A. Foy, A.J. Woolford, H. Parkes, J.F. Huggett, A.S. Devonshire, Assessment of Digital PCR as a Primary Reference Measurement Procedure to Support Advances in Precision Medicine, Clin. Chem. 64 (2018) 1296–1307. https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.285478.

[10] M. Alikian, A.S. Whale, S. Akiki, K. Piechocki, C. Torrado, T. Myint, S. Cowen, M. Griffiths, A.G. Reid, J. Apperley, H. White, J.F. Huggett, L. Foroni, RT-qPCR and RT-digital PCR: A comparison of different platforms for the evaluation of residual disease in chronic myeloid leukemia, Clin. Chem. 63 (2017) 525–531. https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.262824.

[별첨 1] 기술절차서 유효성 자체평가서

기술절차서 유효성 자체평가서

1. 절차서 명 : digital PCR을 이용한 DNA 측정 절차 (Procedure for measuring sequence-specific DNA using digital PCR)

2. 개발 요구사항 및 개발내용 :

digital PCR 장비를 이용한 유전자 정량의 활용처가 증대함에 따라 해당 시험절차서의 개발하게 됨.

3. 사용기기 또는 CRM : QX200 digital droplet PCR (Bio-Rad) 등 기타 dPCR 장비

4. 유효성 확인 방법의 개요 :

(1) 기준값의 불확도에 미치는 요인들을 분석하여 불확도에 반영
(2) 표준물질 기준값 결정에 이용된 PCR assay들의 선형성 확인
(3) 기준값의 정확도를 보장하기 위한 체계적인 측정법 최적화

5. 유효성 확인 방법 (∨ 표시)

☐ 교정용 표준기 또는 인증표준물질 이용
☐ 다른 교정·시험, 표준물질제조 인증방법으로 획득한 결과와의 비교
☐ 교정/시험기관 간 비교 및 숙련도 시험
■ 결과에 영향을 미치는 요인에 대한 체계적인 검토
■ 결과에 대한 측정불확도 평가
■ 기타 유효화 방법 :
- 기준값 부여를 위해 쓰인 PCR assay의 정량 선형성 확인

2022 년 9 월 22 일

작성자 : 배영경 (인)

[별첨 2] 디지털 PCR 성능평가 결과서 작성 예시 1

성능평가 결과서

PERFORMANCE EVALUATION REPORTS

평가번호 : xx-xxxx-xxx (2) 쪽 중 (1) 쪽

1. 의뢰기관

기관명 : 000 (주)

주 소 : xxxxx

2. 평가품명

품 명 : xxxxx

제작회사 및 형식 : xxxxx, xxxxxx

3. 평가일자 : xxxx. xx. xx.

4. 평가환경

온 도 : (20 ± 3) ℃ 상대습도 : (50 ± 10) %

시험장소 : ■ 고정표준실 □ 이동시설 □ 현장

5. 측정표준의 소급성

평가방법은 한국표준과학연구원 발행 “디지털 PCR DNA 측정 정밀도 및 정확도 성능평가 절차(KRISS xxxxxx-xx-xxx-xxx)"에 따라 수행되었다.

평가에 사용한 표준시료 명세

사용품명	제작회사	기기번호		시험기관
디지털 PCR	xxxx	xxxx		xxxx
(인증)표준물질	xxxx	xxxx		xxxx

6. 평가결과 : 별첨 연구장비성능평가 결과서 참조

7. 측정불확도 : 별첨 연구장비성능평가 결과서 참조

확인	작성자 : 성 명 : 0 0 0 (서명)	승인자 직 위 : 책임연구원 성 명 : 0 0 0 (서명)

위 평가결과는 국가표준기본법 제 14조 규정에 의거하여 국가측정표준과 소급성이 확립된 측정기로서 시험한 성능평가 결과서임을 증명합니다.

한국표준과학연구원

원장 O O O (인)

대전시 유성구 가정로 267, 042-868-5000

성능평가 결과서

PERFORMANCE EVALUATION RESULTS

평가번호(Cer. No.) : xx - xxxx - xxx

■ **평가품명** : XXXXXX (XXXXXX XX-XXX S/N : XXXX)

1) **표준물질 :** KRISS CRM xxx-xx-xxx

2)

정밀도: (xx - xxx) %
등 기재

3) **평가방법 :** 최소한 3번 반복 실험 x 3 days (자세한 절차는 성능평가 절차서 참조)
분석 프로그램: 마이크로 소프트 엑셀 및 제조사 분석 소프트웨어

4) **평가결과 :** 측정정밀도: 5.5% (lambda = x), 13.2% (lambda = y)
측정정확도: 인증값과 측정값을 아래 표로 정리함

항목	표시값	평가값	불확도*
측정정밀도			
측정정확도			

* k=2 인 확장불확도

[별첨 3] 연구장비성능평가 결과서 표지 예시 1

연구장비성능평가 결과서

연구장비성능평가 장비명	
신청 기업명	

20XX년 00월 00일

KRISS 한국표준과학연구원
Korea Research Institute of Standards and Science

이 문서는「연구산업진흥법」제8조제1항 및 같은 법 시행령 제10조제3항에 따른 연구장비성능평가 결과서로 평가기관의 사전승인 없이는 문서의 일부분만을 발췌·인용하여 사용하거나 배포할 수 없습니다.

<목 차>

1. 성능평가 개요
 1.1. 성능평가 장비의 개요 및 구성
 1.2. 성능평가 수행 일정

2. 성능평가 신청 정보
 2.1. 성능평가 신청 개요
 2.2. 성능평가 세부 사양서
 2.3. 성능평가 항목 제안서

3. 성능평가 항목 및 항목별 기준

4. 성능평가 수행 방법 및 절차

5. 성능평가 결과
 5.1. 해당 장비의 성능평가 결과
 5.2. 비교 장비의 성능평가 결과
 5.3. 성능평가 항목별 적합성

6. 최종 결론

7. 참고 문헌

8. 특이사항

※ 성능평가 신청 장비의 유형·특성에 따라 결과서의 목차는 일부 변동될 수 있습니다.