

DS3000を用いたマイクロサテライト不安定性分析の紹介

概要

マイクロサテライト不安定性(MSI)はマイクロサテライト領域と呼ばれる反復配列上で生じる突然変異であり、ミスマッチ修復酵素の異常を予測するバイオマーカーとして知られています。MSIの分析は、一塩基単位で分布するシグナルを検出、比較する必要があるため、サイジングの精度や再現性に高い性能が要求されます。

ここではMSI分析の一例として、DNA抽出からデータ解析までの一連のフローを、市販のバラフィン包埋切片を用いて紹介します。

標品について

出発試料として、MSI FFPE DNA Reference Standard (Horizon Discovery, Ltd)のうち、microsatellite instable (MSI, HD830) 及び stable (MSS, HD831) の標品を使用しました。標品は同一セルライン由来の培養細胞がホルマリン固定・パラフィン包埋され、ロール状の切片として提供されました。

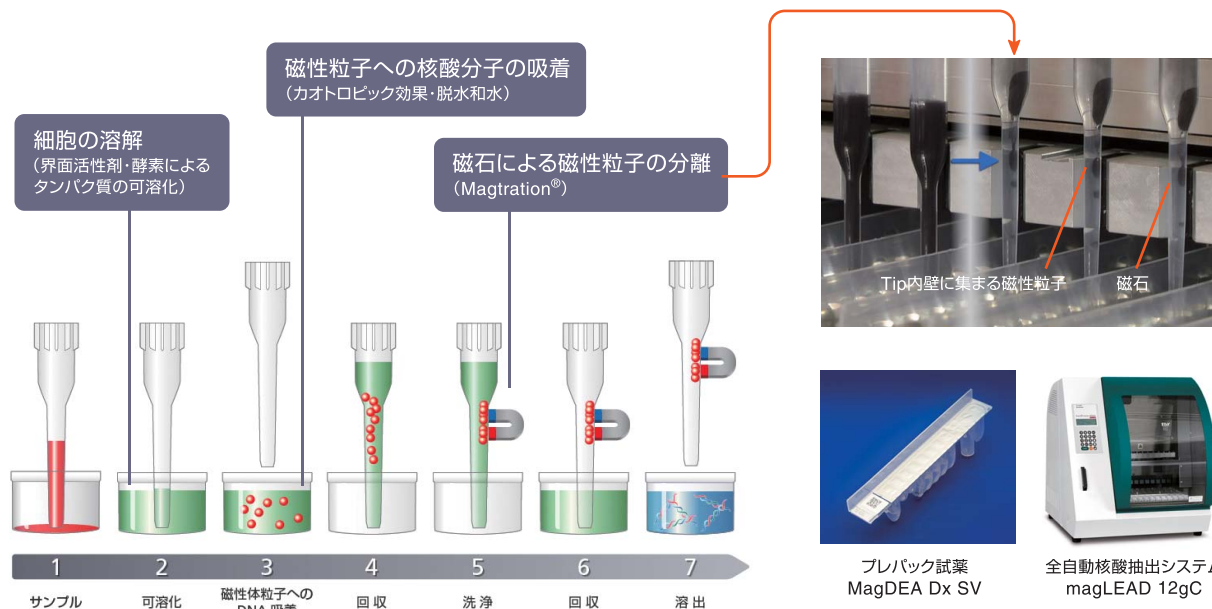
【ゲノム抽出】

ゲノムDNAは全自動核酸抽出装置magLEAD12gC (プレジジョン・システム・サイエンス社)を用いて抽出しました。15 μ m厚の切片から約10 μ gのゲノムDNAが得られました。A260/A280は1.95-1.96で、解析に十分な品質が確認されました。



DS3000
Compact CE Sequencer

■ 全自動核酸抽出装置 magLEADの動作原理



■ 抽出したゲノムDNAの品質

試料	濃度 (ng/ μ l)	収量 (μ g)	A260/A280	A260/A230
MSS	54.8	11.0	1.96	1.80
MSI	59.4	11.8	1.95	1.85

図1:ゲノム抽出の概要

【 MSI PCRおよび電気泳動 】

MSI analysis system ver.1.2 (Promega[®] 社)を用いて mononucleotide repeat marker を増幅しました。PCRには2 ngのゲノムDNAを使用しました。増幅後、Internal Lane Standard 600(Promega[®] 社)をサイズスタンダードとして、Polymer 7で泳動しました。

表1：Polymer 7の分析性能

ポリマー	泳動時間	泳動電圧
Polymer 7	約35分	13 kV

【 データ解析 】

電気泳動で得られたデータをGeneMarker v3.0.1(SoftGenetics社)で解析しました。SoftGenetics社が提供する同キット用定義情報とILS600のサイズ標準情報を適用し、同ソフト上でDS3000 Compact CE Sequencer用のキャリブレーションを実施後、ピーク領域を検出しました。

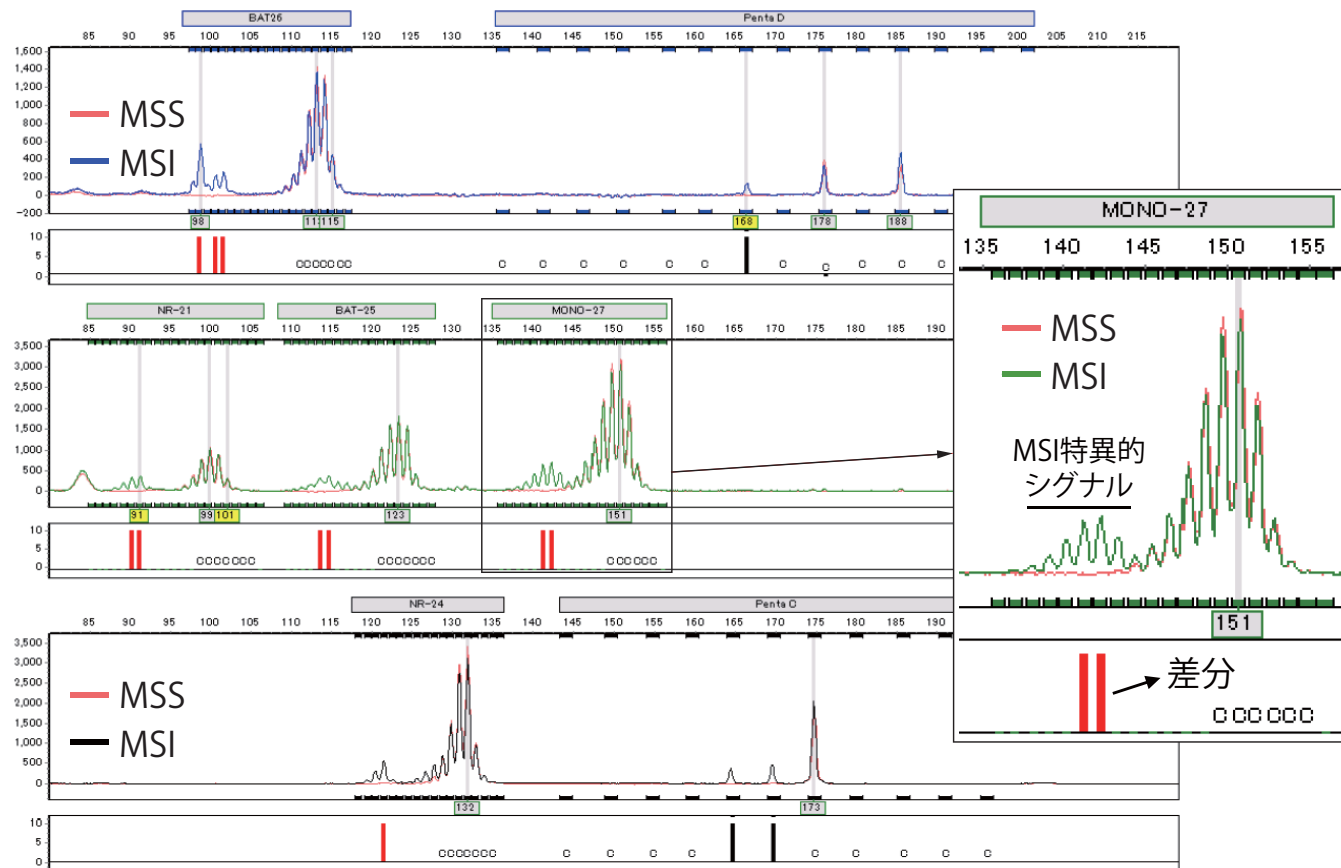


図2：MSIサンプルの解析結果

MSS(桃色線)とMSI(青、緑、黒線)の重ね合わせ波形を示します。赤い縦棒は2サンプル間で閾値以上の差のある個所を表します。

‘C’の表記がある箇所は、MSSのピークが出現する定義済み基準位置を示しています。

MSSのシグナル(桃色線)と比較して、MSIでは全てのマーカーでMSI特異的シグナルが検出されました。

対照的にMSSと共通するシグナルは、 ± 0.1 bpの範囲内で重なり合っています。

【 DNA 抽出から解析までのワークフロー 】



数値はハンズオンタイムを除いた反応時間の概算を示します。

結論

市販のパラフィン包埋切片を用いて MSI 分析を行い、それぞれの標品から泳動データを取得しました。

得られたデータをGeneMarker v3.0.1を用いて解析したところ、MSI特異的シグナルが漏れなく検出されました。更に、MSIとMSSとで共通するシグナルにおいて、塩基長の差異は0.1 bp以内でした。以上からDS3000におけるサイジング精度の信頼性が示されました。

注意

- ・DS3000 Compact CE Sequencerは医療機器ではありません。
- ・本資料は限定された試料、環境下における検証の一例を示すものです。
- ・あらゆる試料、環境下で本資料と同等のデータが得られることを保証するものではありません。

DS3000の主な仕様

■ 本体仕様

項目	内容
キャピラリー数	4 本
キャピラリー長	36 cm
サンプルトレイ	8連チューブ×4
装置制御	タッチパネルPC
同時検出	6 色
アプリケーション	シーケンシング解析/フラグメント解析
サイズ	400 (W)×600 (D)×600 (H) mm
重量	45 kg
性能保証温度	15–30 °C
性能保証湿度	20–80% RH(結露しないこと)
電源	100–240 ±10% VAC、50/60 Hz
定格電力	260 VA
対応二次解析ソフトウェア	・Mutation Surveyor (SoftGenetics社製 別売り) ・GeneMarker (SoftGenetics社製 別売り) ・GeneMarker HID (SoftGenetics社製 別売り)

■ ランモジュール仕様

ランモジュール	アプリケーション	ポリマータイプ	読取塩基長 ^{※1} (QV20 CRL)	平均ランタイム (分)
Fast_Sequence36_Polymer7	シーケンシング解析	Polymer7	≥600	≤32
Standard_Sequence36_Polymer7	シーケンシング解析	Polymer7	≥700	≤60
BDx_Fast_Sequence36_Polymer7	BDx シーケンシング解析	Polymer7	≥600	≤32
BDx_Standard_Sequence36_Polymer7	BDx シーケンシング解析	Polymer7	≥700	≤60
ランモジュール	アプリケーション	ポリマータイプ	平均ランタイム (分)	サイジング精度 ^{※2} (50–400 bp)
Fragment_Analysis36_Polymer7	フラグメント解析	Polymer7	≤35	NA
Fragment_Analysis36_Polymer4	フラグメント解析	Polymer4	≤44	<0.16

※1. 読取塩基長(QV20 CRL)はBigDye[®] Terminator v3.1 Sequencing Standard Kit(Thermo Fisher Scientific社製 別売り)を用いて検証されています。

※2. サイジング精度(50–400 bp)はPowerPlex[™] ES17 Fast Allelic LadderとWEN ILS 500 ESS(Promega社製 別売り)を用いて検証されています。

■ 消耗品仕様

品名	パーツナンバー	内容	備考
Capillary Cartridge 36 cm	613-0330	1個	保管温度:15–30 °C
Buffer	613-0252	Anode Buffer Cartridge×2個 Cathode Buffer Cartridge×2個	保管温度: 2–10 °C
Polymer7	613-0251	Cartridge×4個	保管温度: 2–10 °C
Polymer4	613-0250	Cartridge×4個	保管温度: 2–10 °C
Septa for Cathode Buffer Cartridge	613-7231	10個	
Retainer for Cathode Buffer Cartridge	613-7233	4個	
Septa for 8 well tubes	613-7230	24個	
Base and Retainer for 8 well tubes	613-7232	4個	
Anode Electrode Assembly	613-7263	1個	

- ・研究用にのみ使用できます。診断目的およびその手続き上での使用はできません。
- ・本製品はISO9001、ISO14001認証の日立ハイテック那珂地区において設計・製造されています。
- ・本カタログ中の会社名、商品名は各社の商標および登録商標です。
- ・PromegaはPromega Corporationの登録商標であり、PowerPlexはPromega Corporationの商標です。
- ・本カタログに記載のデータは測定例を示すもので、数値の保証をするものではありません。

株式会社 日立ハイテック

本社 〒105-6409 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門ヒルズ ビジネスタワー
TEL: (03)3504-5768
E-mail: hhtgene.aj@hitachi-hightech.com

URL www.hitachi-hightech.com/jp/science/

分析機器に関する
各種お問い合わせは...

お客様サポートセンタ (03)3504-7211

受付時間 9:00～11:50 12:45～17:30 (土・日・祝日および弊社休日を除く)

株式会社 日立ハイテックスサイエンス

本社 〒105-6411 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門ヒルズ ビジネスタワー
TEL: (080)1172-7021

URL www.hitachi-hightech.com/hhs/



⚠ 安全に関するご注意

●ご使用の前に「取扱説明書」をよくお読みのうえ正しくご使用ください。

お問い合わせは—

- このカタログに掲載した製品は、改善のため外観または仕様の一部を予告なく変更することがあります。
- Copyright(C) Hitachi High-Tech Corporation 2021 All rights reserved.

HTB-DS-J003 | 2021.06