

DS3000 Compact CE Sequencerを用いた細胞認証の実例

概要

細胞株の誤認や汚染は、実験結果とその解釈に大きく影響します。そのため、細胞認証(Cell Line Authentication: CLA)を定期的に実施して、外来細胞の混入や置換がないことを確認することが推奨されています。CLAではSTR (Short Tandem Repeat)を対象とした解析が広く用いられています。STRはゲノムに散在する、2-7塩基の短い繰り返し配列です。STRの繰り返しの回数(アレル)は個体間で異なるため、DNA鑑定において有用なマーカーとなります。CLAではまず初めに複数のSTRをPCRで増幅した後、キャビラリ電気泳動によりそれぞれのアレルを同定します。次に、同定したアレルを、ATCC(American Type Culture Collection)などの生物資源バンクに登録された各細胞株のアレル(以下、参照アレルと表記します)と比較することで、細胞株を同定します(1)。このとき、信頼性の高い結果を得るために、装置に高い分析性能が要求されます。

ここではDS3000 Compact CE Sequencer (以下、DS3000と表記します)を用いたCLAの実例を紹介します。GenePrint® 10 SystemおよびGenePrint® 24 System (Promega®)を用いて検証したところ、DS3000を用いて得られたアレルは参照アレルと80%以上一致しました。CLAではサンプルのアレルと参照アレルが80%以上一致する場合に、同一細胞であると判断します(2)。以上からDS3000はCLAを行うための分析性能を持つことがわかりました。

結果

単一細胞株由来ゲノムDNAの検出

5種類のヒト細胞株由来ゲノムDNA (HeLa, Jurkat, MCF7, K562, 2800M DNA)をGenePrint® 10 SystemおよびGenePrint® 24 Systemのプロトコルに従いPCRでSTR領域を増幅しました。次に、得られたPCRアンブリコンをDS3000で電気泳動しました。電気泳動データはGeneMarker HID (ver.2.9.0)およびGeneMapper ID-X (ver.1.6)を用いて解析しました。図1はGenePrint® 10 Systemを用いて、図2はGenePrint® 24 Systemを用いて得られた波形データの一例を示します。図からは予想された遺伝子型のピークが検出されていることが分かります。表1、2に各細胞株で同定したアレルおよび参照アレルについてまとめました。5種類の細胞株由来ゲノムDNAを用いて同定したアレルと参照アレルが80%以上一致することを確認いたしました。同様の結果はGenePrint® 24 Systemを用いた際にも確認できました。なお、一致するアレルの割合はMastersの式(同定したアレルと参照アレル間で合致した数/同定したアレルの全数)を用いて算出しました(2)。



DS3000
Compact CE Sequencer

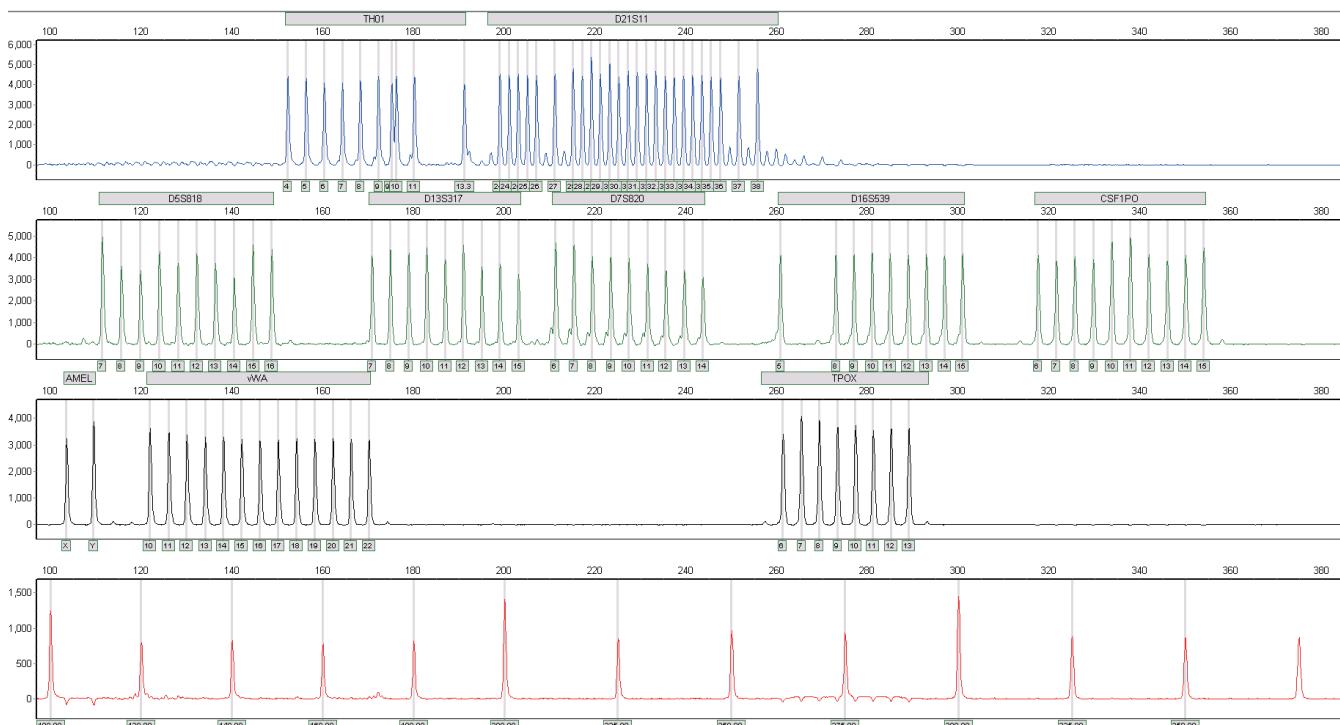
表1: GenePrint® 10 Systemを用いて検出されたマーカーとアレル

マーカー	HeLa				Jurkat				MCF7			
	同定したアレル		参照アレル		同定したアレル		参照アレル		同定したアレル		参照アレル	
AMEL	X		X		X	Y	X	Y	X		X	
CSF1PO	9	10	9	10	11	12	11	12	10		10	
D13S317	12		12	13.3	8	12	8	12	11		11	
D16S539	9	10	9	10	11		11		11	12	11	12
D21S11	27	28			31.2	33.2			30			
D5S818	11	12	11	12	9		9		11	12	11	12
D7S820	8	12	8	12	8	12	8	12	8	9	8	9
TH01	7		7		6	9.3	6	9.3	6		6	
TPOX	8	12	8	12	8	10	8	10	9	12	9	12
vWA	16	18	16	18	18		18		14	15	14	15

マーカー	K562				2800M DNA			
	同定したアレル		参照アレル		同定したアレル		参照アレル	
AMEL	X		X		X	Y	X	Y
CSF1PO	10		9	10	12		12	
D13S317	8		8		9	11	9	11
D16S539	11	12	11	12	9	13	9	13
D21S11					29	31.2	29	31.2
D5S818	11	12	11	12	12		12	
D7S820	9	11	9	11	8	11	8	11
TH01	9.3		9.3		6	9.3	6	9.3
TPOX	8	9	8	9	11		11	
vWA	16		16		16	19	16	19

灰色は参照アレルに記載のないマーカーを示します。

A



B

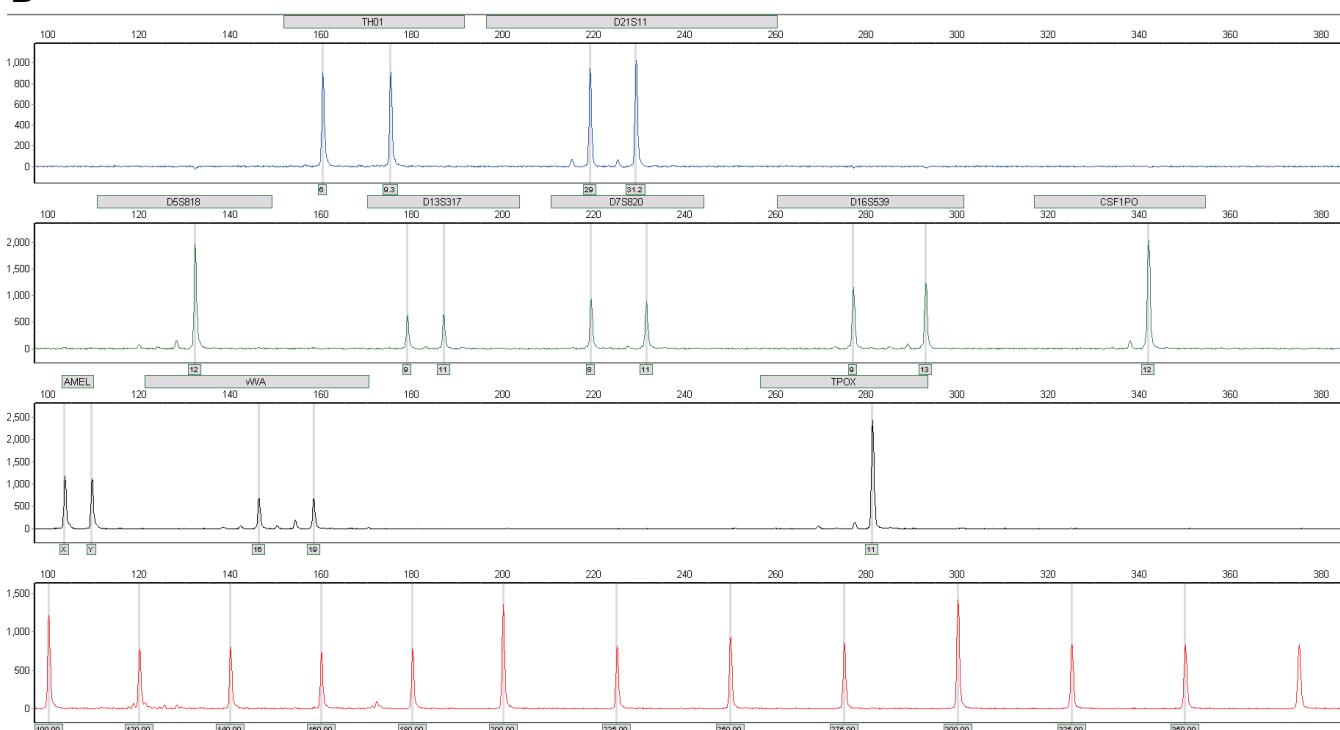


図1:GenePrint® 10 Systemの波形データ

Allelic ladder (A)と2800 M DNA (B)の結果を示します。X軸は塩基長(bp)、Y軸は信号強度(RFU)を表します。

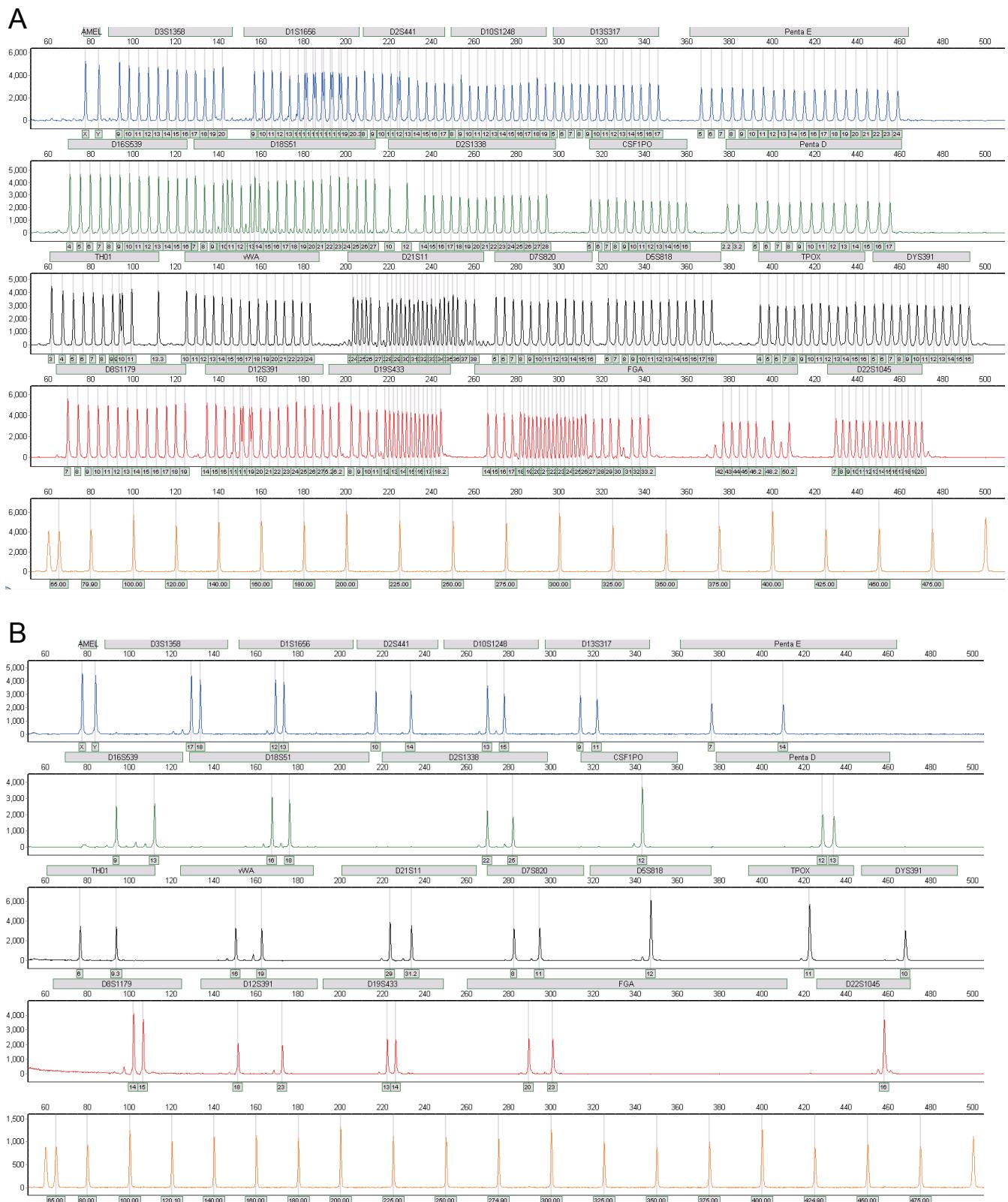


図2: GenePrint® 24 Systemの波形データ

Allelic ladder (A)と2800 M DNA (B)の結果を示します。X軸は塩基長(bp)、Y軸は信号強度(RFU)を表します。

混合サンプルの検出

ここでは2種類のゲノムDNAを様々な比率で混合して、サンプルの汚染を検出できるか確認しました。まず、JurkatのゲノムDNAに対してMCF7のゲノムDNAを次の比率で混合しました(MCF7の比率:0、1、2、3、4、5、10、30、100%)。これらのサンプルをGenePrint® 10 SystemおよびGenePrint® 24 Systemを用いてSTR領域を増幅させました。その後DS3000を用いてSTR解析を実施いたしました。観測されるデータの一例として、GenePrint® 10 SystemのマーカーD13S317における波形データを図3に示します。Jurkat固有のアレル8と12が確認されます。これに対し、MCF7が混入すると、MCF7由来のアレル11が検出され、MCF7の量比が大きくなるにつれて蛍光強度が増加しました。サンプル中のMCF7の比率とJurkatの参照アレルに対する一致率を図4にまとめました。図から、MCF7が3%混入したときに、Jurkat固有のアレルと参照のアレルとの一致率が80%を下回ることが分かります。以上から、Jurkat細胞に対してMCF7細胞が少なくとも3%混入した場合、DS3000で混入を確認できることがわかりました。

表2: GenePrint® 10 Systemを用いて同定したアレルと参照アレルの一致率

検証項目	HeLa	Jurkat	MCF7	K562	2800M DNA
参照アレルと一致したアレルの数(個)	15	15	14	13	15
同定したアレルの全数(個)	15	15	14	13	15
一致率	100%	100%	100%	100%	100%

一致率はMastersの式(同定したアレルと参照アレル間で一致したアレル数/同定したアレル全数)(2)を用いて算出しました。

結論

本レポートではDS3000を用いてCLAが可能であるかを検証いたしました。5種類の単一細胞由来ゲノムDNAを用いてSTR解析を実施したところ、全てにおいて同定したアレルと参照間でのアレルが80%以上一致することを確認いたしました。

またMCF7とJurkat細胞株由来ゲノムDNAの混合率を変化させたサンプルを用いて混入サンプルの検出を行いました。その結果、混入した細胞が少なくとも3%あればDS3000で検出可能であることを確認いたしました。

以上より、DS3000は今回使用した細胞株由来ゲノムDNAおよびSTR試薬を用いて、CLAで要求される性能を十分に有していることがわかりました。

参考文献

- (1) American Type Culture Collection, Authentication of Human Cell Lines: Standardization of STR Profiling. ANSI/ATCC ASN-0002-2011.
- (2) Capes-Davis, A., et al. Match criteria for human cell line authentication: Where do we draw the line? Int. J. Cancer 132, 2510–2519 (2013)

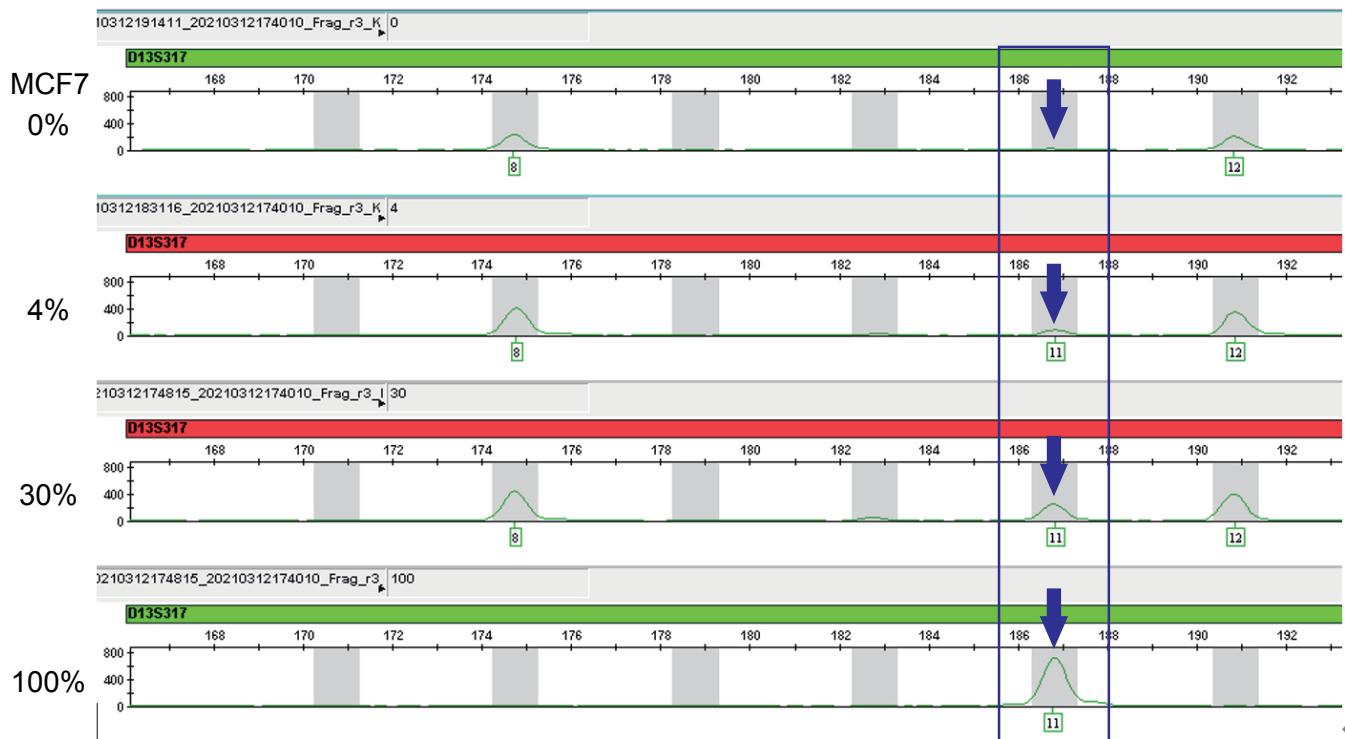
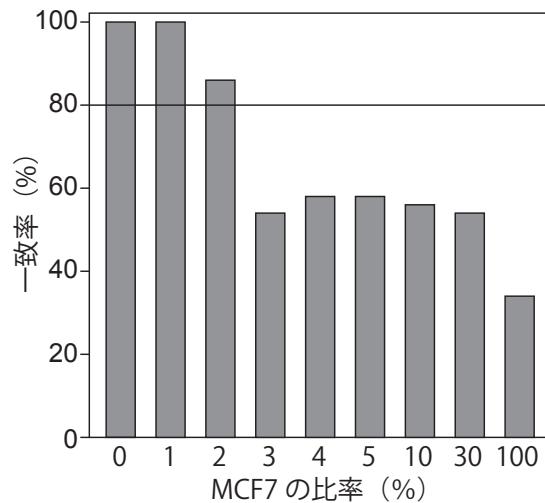


図3: JurkatとMCF7の混合DNAにおける波形データの一例

MCF7固有のアレル(D13S317: 11)を対象として、DNAの量比に伴う信号強度の変化を示しました。
数値はサンプル中のMCF7の比率を表します。X軸は塩基長(bp)、Y軸は信号強度(RFU)を表します。

図4: JurkatとMCF7の混合DNAにおける、Jurkat由来アレルと参照アレルの一一致率
横軸にサンプル中のMCF7の比率を示します。

実験

HeLa、Jurkat、MCF7のゲノムDNAはBioChain Institute Inc.から購入しました。K562と2800M DNAはPromega[®]から購入しました。STR增幅は各キットに添付のプロトコルに従いました。PCRには5 ng(GenePrint[®] 10 System)もしくは2.5 ng(GenePrint[®] 24 System)のDNAを用いました。電気泳動は表3に記載のプロトコルに従いました。波形データの描画とサイズコール、アレルコールはGeneMarker HID (ver. 2.9.0, SoftGenetics)およびGeneMapper ID-X(ver. 1.6, Applied BiosystemsTM)を用いました。

HeLa、Jurkat、MCF7、K562の参照アレルはATCCから取得しました。2800M DNAの参照アレルはPromega[®]から取得しました。

表3: 電気泳動条件

STR增幅キット	ポリマー	電気泳動モジュール	電気泳動(時間)	電気泳動(電圧)
GenePrint [®] 10 System	Polymer4	Promega_4Dye_ILS600_36_P4	約45分	13 kV
GenePrint [®] 24 System	Polymer7	Promega_5Dye_WENILS_36_P7	約35分	13 kV

DS3000の主な仕様

■本体仕様

項目	内容
キャビラリー数	4 本
キャビラリー長	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	読み取塩基長 ^{※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

■消耗品仕様

品名	バーツナンバー	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	

※1. 読取塩基長(QV20 CRL)はBigDyeTM 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PowerPlexTM ESI17 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。

- ・研究用にのみ使用できます。診断目的およびその手続きまでの使用はできません。
- ・本製品はISO9001、ISO14001認証の日立ハイテ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 ビジネスセンター
TEL: (03) 3504-5768

E-mail:hhtgene.ai@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)

⚠ 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――

◎ 株式会社 日立ハイテクサイエンス

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 ビジネスセンター
TEL: (080) 1172-7021

URL www.hitachi-hightech.com/hhs/



●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 2022 All rights reserved.