

DS3000 Compact CE SequencerとMutation Surveyorを用いた低頻度変異の検出

概要

低頻度変異は細胞集団のごく一部で確認される突然変異です。がんの発生や進行の原因となることがあるため、がん研究における有用性が認められています。低頻度変異に由来するシグナルは、サンプルの大多数を占める野生型DNAのシグナルに埋もれてしまいます。そのため低頻度変異の検出には特に高い感度と精度が要求されます。一般的にキャピラリーシーケンサーを用いたサンガー法では、約25%を下回る頻度の変異を検出することが困難と考えられています。ここではDS3000 Compact CE Sequencer(以下DS3000と表記します)とMutation Surveyor(SoftGenetics社)を用いて、変異検出の感度を向上させる一例を紹介します。その結果、遺伝子によって検出感度にばらつきがみとめられたものの、一部の遺伝子では5%の低頻度変異を検出することができました。

本製品は研究用であり、薬機法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。診断目的およびその手続き上での使用はできません。



DS3000
Compact CE Sequencer

結果

Mutation Surveyorは独自のベースコーラーを実装し、raw dataから波形データの描画や塩基配列の同定を行います。そこで、同一の電気泳動データをMutation SurveyorとDS3000とで分析して、波形データの比較を行いました(図1)。波形やバックグラウンドノイズの描画に多少の差異が認められますが、どちらのベースコーラーでも目的の混合塩基(S)を検出出来ていることが分かります。次に、変異の検出率をベースコーラーごとに比較しました(図2)。Mutation Surveyorを使用すると、10%以下の低頻度変異の検出率が大きく改善されました。そこで、以降の解析にはMutation Surveyorのベースコーラーを使用しました。図3に、正解の変異率とMutation Surveyorで計測された変異率を遺伝子ごとにまとめました。対象となる遺伝子やアレルによって、感度と定量性にばらつきが認められます。EGFR、GNAS、KRAS、NRASなど、5%程度の低頻度変異を検出する例もある一方で、BRAF(V600K)では20%以下の変異を検出できていません。また、GNAS(R201C)では、変異率0%の野生型DNA(図3赤枠部分)で擬陽性が検出されました。

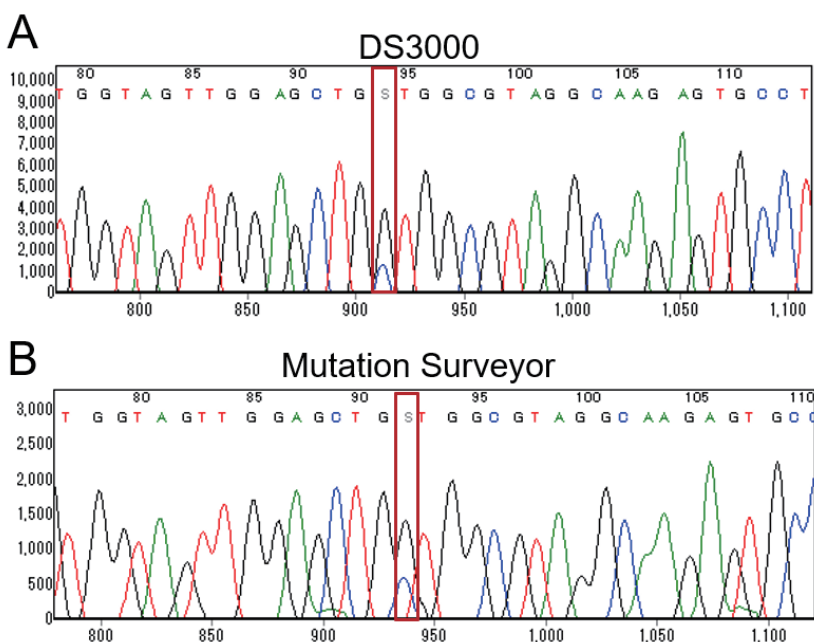


図1: 波形データの比較

DS3000(A)またはMutation Surveyor(B)に実装されているベースコーラーを用いて、同一の電気泳動ファイルを分析しました。サンプルはKRASのG12A(変異率20%)を使用しました。どちらのベースコーラーでもGとCの混合塩基(S)が検出されています。横軸は塩基長(上段)とフレーム数(下段)を、縦軸は信号強度(RFU)を示します。

結論

このレポートではMutation Surveyorを用いて低頻度変異の検出率を向上させる一例を示しました。DS3000の電気泳動データをMutation Surveyorで解析することで、検出率が大きく向上し(図2、3)、一部の遺伝子では5%の低頻度変異を検出しました。対照的にBRAF(V600K)のように20%以下の変異を検出できない例もありました。またGNAS(R201C)では擬陽性が認められました。これらのばらつきは希釈DNAのハンドリング、PCRおよびサイクルシーケンス反応時の増幅バイアス、蛍光色素間の感度差などが複合的に組み合わさって発生したと考えられます。信頼性の高い結果を得るためには、実験の反復回数、反復のタイミング*1などを十分に検討する必要があります。

*1:反復実験では反復のタイミングを考慮することで実験誤差の要因を切り分けることが可能です。代表的な反復実験を下記に示します。

1, Biological replicates

対象となる細胞集団から複数回サンプリングを行います。

2, Technical replicates

細胞集団から採集したサンプルを、実験の過程で複数のチューブに分取します。分取を複数のタイミングで行うと切り分けの精度が向上します。

3, PCR replicates

PCRの直前にサンプルを複数のチューブに分取します。PCRの増幅バイアスを検討するために行います。低頻度変異のように、分子数の少ないDNAの増幅はバイアスがかかりやすいため、PCR replicatesによる検証が重要になります。

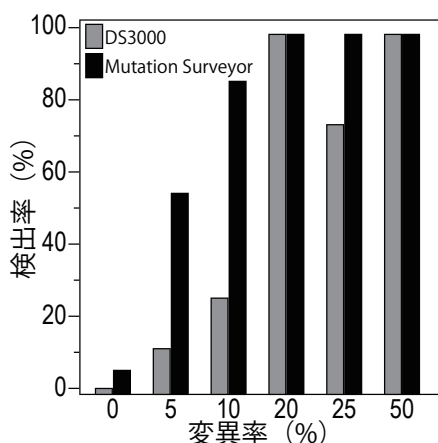


図2: ベースコーラーごとの検出率の比較

遺伝子解析用標準サンプルを野生型のゲノムDNAで段階希釈して、X軸に示す頻度の変異サンプルを作成しました。各サンプル(反復回数8回以上)で、正解の変異を検出した割合をY軸に示します。

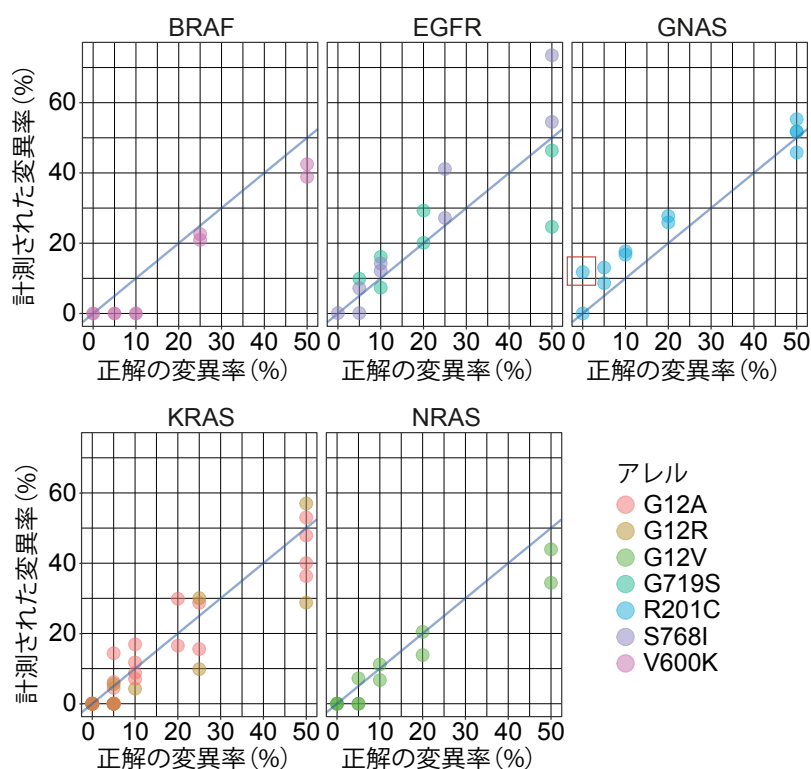


図3: 計測された変異率の比較

図中の直線は正解と計測値が完全に一致する場合を示します。赤枠部分はGNASで確認された擬陽性を示します。

実験手法

サンプル調製

遺伝子解析用標準サンプル(Horizon Discovery, Ltd)を使用しました。このサンプルは、ゲノム編集により変異を導入した細胞株から抽出されたゲノムDNAで、変異の導入部位と頻度が共に公開されています。これを野生型のDNAで希釈して、様々なアレル頻度を調製しました。このレポートで使用したサンプルを表1にまとめました。次に、希釈したゲノムDNAを用いてPCRを行いました(表2~4)。PCRアンプリコンの精製にはDNA Clean & Concentrator™ Kit (Zymo Research社)を使用しました。アンプリコンは10μLのEBで溶出した後、QuBit™ (Invitrogen™ 社)で定量しました。続いて、10 ngのアンプリコンを用いてサイクルシーケンス反応を行いました(表5、6)。反応産物はキットに添付のブロットコルに従い、エタノール沈殿で精製し10 μLのHiDi™ formamide(Applied Biosystems™)に溶解しました。シーケンシング解析はDS3000上で行いました(表7)。この時、ネガティブコントロールとして野生型のDNAを並行して電気泳動しました。得られた電気泳動データ(ab1ファイル)をMutation Surveyor(ver. 5.1.2, SoftGenetics社)で解析しました。

データ解析

Mutation Surveyorを用いた変異解析では、コントロールとなる野生型DNAの電気泳動データが必要となります。なお、低頻度変異の解析を行う際は、順鎖と逆鎖の両方をシーケンシング解析することを強くお勧めします。また、可能であればポジティブコントロールの電気泳動データを取得しておく、より高い精度の解析が可能です。ここでポジティブコントロールとは変異の割合が既知であるサンプルの電気泳動データを指します。解析に当たってMutation Surveyorで実施する操作の一例を示します。

ファイル読み込み前の設定

まず、Mutation Project Settingsの設定を行います。Mutation Surveyorのホーム画面から"Process"、"Settings"の順に選択し、Mutation Project Settingsにアクセスします。"Input"および"Display"タブを選択して、図4に従って設定します。

ファイル読み込み時の設定

ホーム画面から"Open Files"を選択します。図5に従ってGenBank Sequence File、Reference Files、Sample Filesを入力します。Reference FilesはSample Filesと同じランで取得することをお勧めします。

検出処理時の設定

図6に従って、"Mutation Quantifier"の設定を行います。ポジティブコントロールがある場合は図7に従って"Quantification Group Editor"上で登録してください。

表1: 解析に用いたサンプル

製品番号	遺伝子名	変異	アレル	アンプリコンのサイズ(bp)	プライマーID	PCR条件
HD239	BRAF	V600K	GT/AA	513	1	1
HD253	EGFR	G719S	G/A	408	2	2
HD261	EGFR	S768I	G/T	373	3	3
HD674	GNAS	R201C	C/T	246	4	4
HD265	KRAS	G12A	G/C	246	4	4
HD287	KRAS	G12R	G/C	385	5	5
HD302	NRAS	G12V	G/T	351	6	6

表2: PCRプライマーとアニール温度

プライマー ID	Forward Primer	Reverse Primer	アニール温度(°C)
1	CTGGGCCTACATTGCTAAAT	AGTTGAGACCTTCAATGACTTTCTA	54
2	GCTGAGGTGACCCTTGTCTC	GTCAATGGCCCCTTTCATAA	56
3	CTCTCCCACTGCATCTGTCA	ACACACCAGTTGAGCAGGTA	56
4	GGTGGAGTATTTGATAGTGTATTAACC	AGAATGGTCCTGCACCAGTAA	54
5	TAAGGATGGGGGTTGCTAGA	TGGGTAAAGATGATCCGACA	54
6	GGA CTCTGAGCCCTCTTTCC	CACAGCATCCTACCGTTGAA	56

表3: PCR条件

温度(°C)	時間(秒)	サイクル
98	30	×35
表2に記載	30	
72	30	
70	300	×1
4	hold	

表4: PCRミックス

試薬	液量(μL)
TaKaRa Ex Taq HS (5U/μL)	0.25
10×Ex Taq Buffer (Mg2+ plus)	5
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4
10μM Forward Primer	2
10μM Reverse Primer	2
DNA (10 ng/μL)	1
PCR grade water	35.75

表5: サイクルシーケンス反応条件

温度(℃)	時間(秒)	サイクル
96	60	×1
96	10	×35
54	5	
60	240	
4	hold	

表6: サイクルシーケンス反応系

試薬	液量(μL)
PCRアンプリコン(5~10 ng/μL)	2
BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	4
10 μM Primer	0.64
BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5×Sequencing Buffer	2
PCR grade water	11.36

表7: 電気泳動条件

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
Polymer 7	AB_Seq_36_Std	約60分	7.5 kV

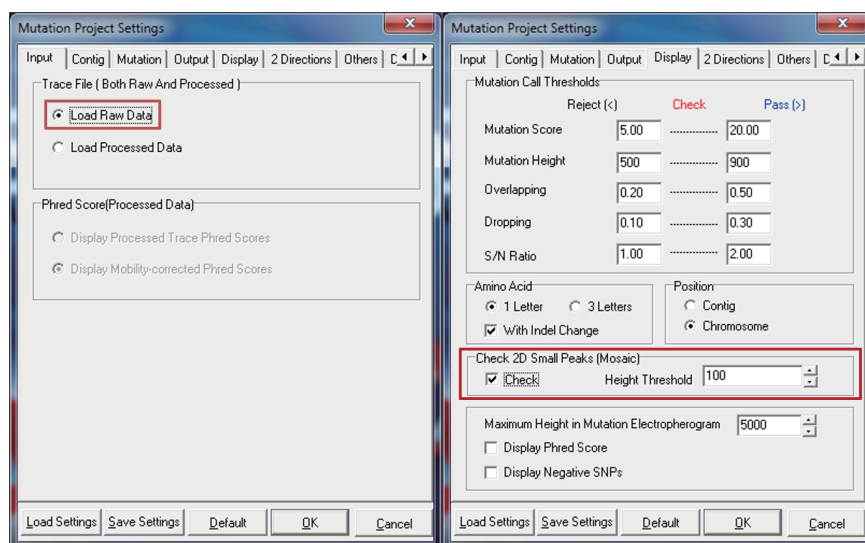


図4: ファイル読み込み前の設定

“Load Raw Data”を選択することでMutation Surveyor独自のベースコーラーを使った解析が可能になります。

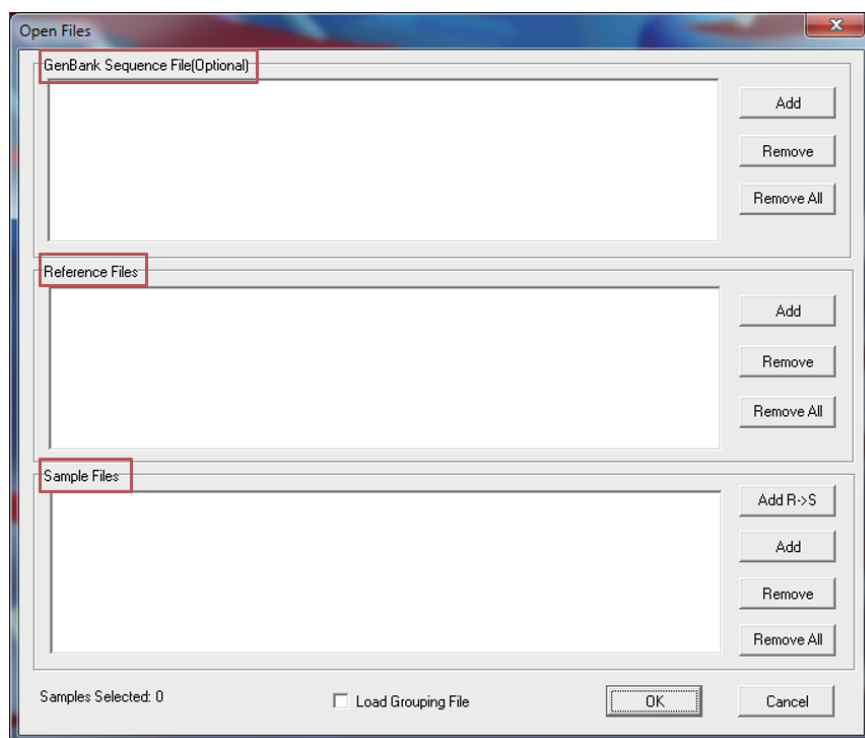


図5: ファイル読み込み時の設定

GenBank Sequence Files: リファレンスとなるGenBankファイル(.gbk)を選択します。

Reference Files: ネガティブコントロール(変異0%)のシーケンスデータ(.ab1)を選択します。

精度の高い解析を行うにはReference FilesとSamples Filesを同一のランで取得することを強くお勧めします。

Sample Files: 解析対象となるシーケンスデータ(.ab1)を選択します。

Reference Filesと同じネガティブコントロールをSample Filesとしても読み込んでおくと、後の解析の際に便利です。

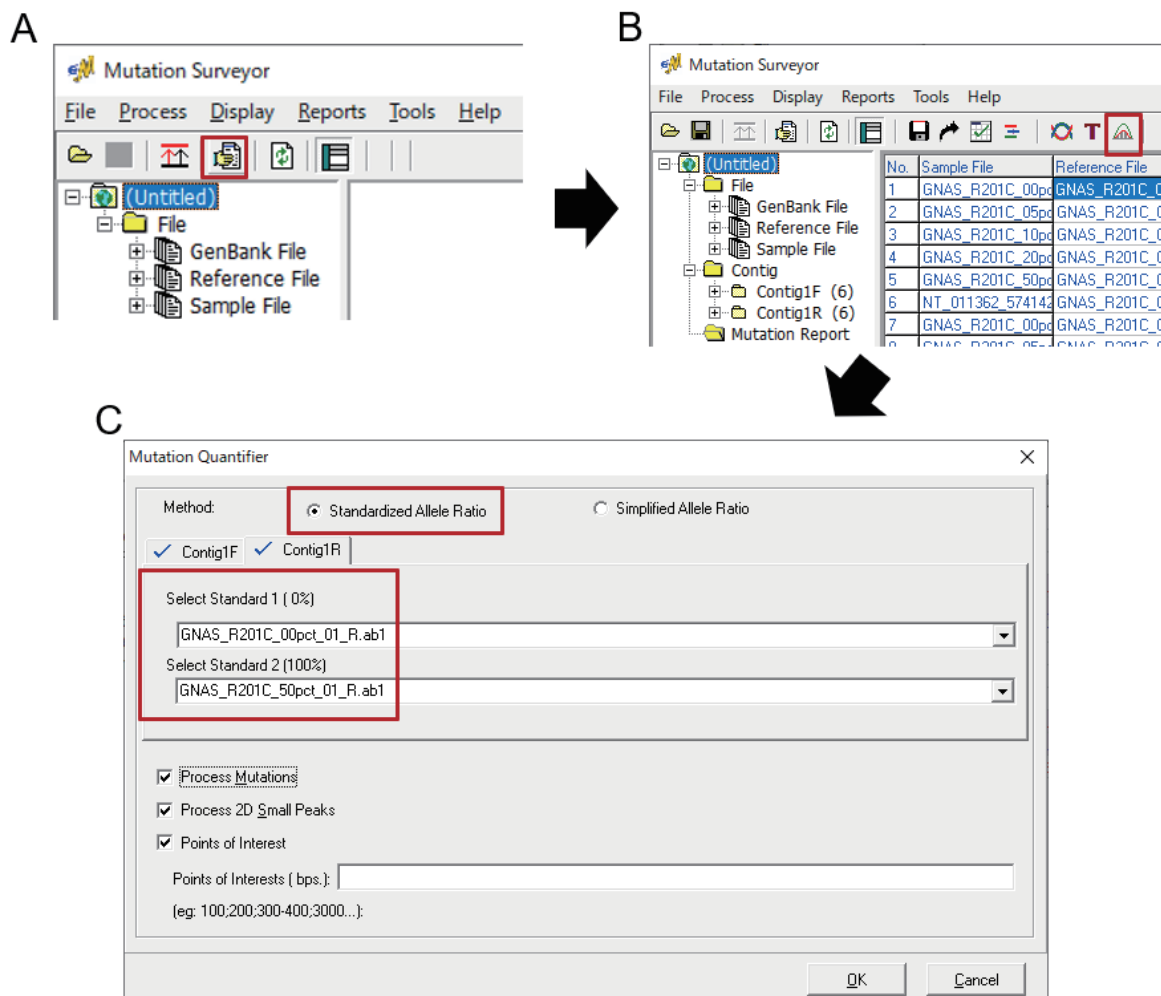


図6: ファイル読み込み後の設定1

始めに、ホーム画面から“Run”を選択します(A)。次に“Mutation Quantifier”を起動(B)して、(C)に従って各設定値を入力します。“Select Standard 1 (0%)”にはネガティブコントロールを、“Select Standard 2 (100%)”にはポジティブコントロール(変異率既知のサンプルデータ)を入力してください。ポジティブコントロールの変異率が100%に満たない場合は、図7に従って変異率を指定してください。

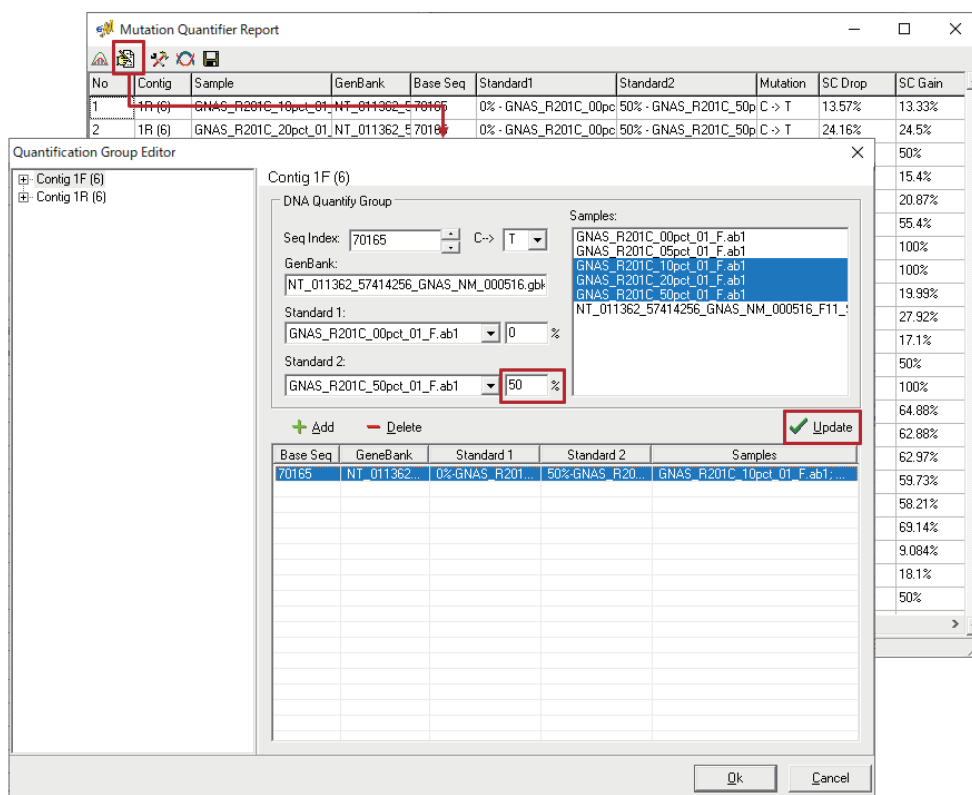


図7: ポジティブコントロールの登録

ポジティブコントロールの変異率が100%に満たない場合は、

“Quantification Group Editor”の“Standard 2”で変異率を指定した後に“Update”を実行してください。

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™ ES117 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에만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 2023 All rights reserved.

HTB-DS-J009P 2023.6