

DS3000 Compact CE Sequencerを用いた次世代シーケンステータの確認

概要

次世代シーケンスで検出されたゲノム上の突然変異(以下、NGSバリアントと呼びます)は、分析の簡便さからサンガーシーケンスで確認されることがあります(参考文献(1))。ここではDS3000 Compact CE Sequencer(以下、DS3000と略します)を用いて、NGSバリアントを解析した実例を紹介します。初めに、ヒト結腸ガン細胞株(HCT116)から抽出したゲノムDNAを用いて、計12個の一塩基置換を解析しました。DS3000のベースコーラーは一塩基置換を漏れなく検出できました。さらに、DS3000で得られた波形データをMutation Surveyor(ver. 5.1.2, SoftGenetics社)で解析することで、変異率の定量、塩基挿入や欠失の検出が可能になりました。

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・認証等を受けた製品ではありません。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

一塩基置換

参考文献(2)で検出されたHCT116のNGSバリアントから、12個の一塩基置換を無作為に抽出しました(表1)。シーケンスプラットフォームはHiSeq2000(Illumina社)です。

まず、ホモ接合型の一塩基置換を解析しました。DS3000のベースコーラーは計5個の一塩基置換を全て検出しました(表1、ID:1~5)。次にヘテロ接合型の変異7個を解析しました(表1、ID:6~12)。ヘテロ接合型の一塩基置換は特定の部位に2種類のピークが重なり合って検出されます。この変異をコールするためには、両方のピークを正しく同定する必要があるため、装置にはより高い信頼性が求められます。DS3000のベースコーラーはヘテロ接合型の一塩基置換も漏れなく同定しました(表1)。図1にDS3000で得られた波形データの一例(表1、ID:9)を示します。次世代シーケンスで示されたようにシトシンとチミンのピークと、混合塩基(Y)が正しくコールされています(図1 A)。

次に、ヘテロ接合型(表1、ID:6~12)の変異率をMutation Surveyorで定量しました。アレルによってばらつきが認められるものの、おおむね50%を中心に分布していました(図2)。DS3000は2種類のシーケンス用アッセイを実装し、解析の目的に応じて使い分けることができます。一般的にFast sequencingは短時間でできるだけ長い読み取り塩基長を得たい場合に使用し、Standard sequencingはFast sequencingよりも長い読み取り塩基長を得たい場合に適しています。図2から、Fast sequencingとStandard sequencingとで定量結果に有意差がないことがわかります。

表1.一塩基置換の解析結果

ID	変異の種類	遺伝子	野生型	HiSeq2000	DS3000
1	ホモ接合型	KLHL34	C	T	T
2	ホモ接合型	LHFPL1	C	T	T
3	ホモ接合型	LMBRD2	G	C	C
4	ホモ接合型	USP9Y	A	G	G
5	ホモ接合型	USP9Y	G	A	A
6	ヘテロ接合型	KRAS	C	C,T	Y
7	ヘテロ接合型	MYCBP2	C	C,T	Y
8	ヘテロ接合型	MYCBP2	A	A,G	R
9	ヘテロ接合型	MYCBP2	C	C,T	Y
10	ヘテロ接合型	PARK2	T	A,T	W
11	ヘテロ接合型	PIK3CA	A	A,G	R
12	ヘテロ接合型	PINK1	G	A,G	R

Y: C or T, R: A or G, W: A or T

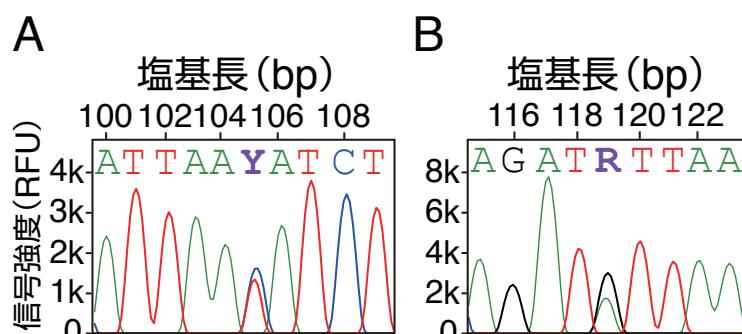


図1. MYCBP2(表1、ID:9)で認められたヘテロ接合型一塩基置換の波形データ

- A. 順鎖の波形データを示します。
このデータは表1の表記と対応します。
NGSで確認された、シトシンとチミンのピークと混合塩基(Y)が認められます。
- B. 逆鎖の波形データを示します。
こちらのデータは表1および図1 Aの相補鎖になります。
アデニンとグアニンのピークと混合塩基(R)が確認できます。

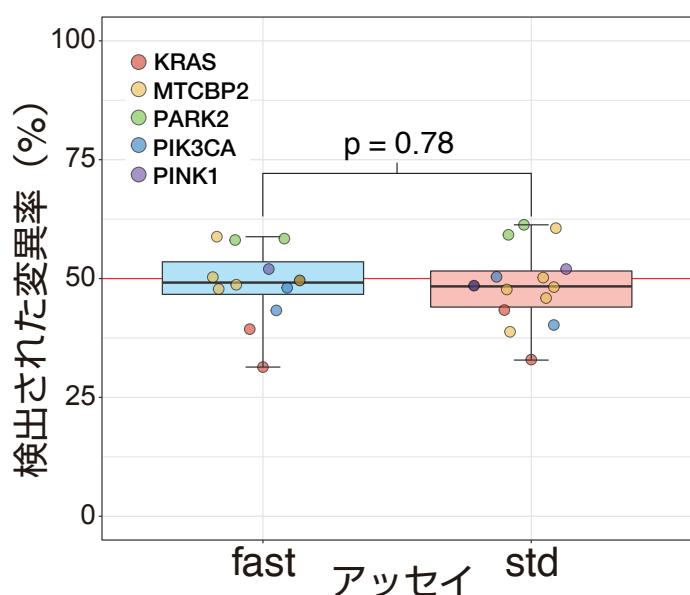


図2. DS3000とMutation Surveyorを用いた変異率の定量

変異率は50%を中心に分布しています。
これは各変異アレルがヘテロ接合であることを示します。
またFast sequencing(fast)とStandard sequencing(std)との間に有意差は認められませんでした。
検定には両側t-検定を使用しました。

塩基插入、欠失

細胞核内で2つあるゲノムDNAの一方に塩基の挿入や欠失が発生すると、2種類のピーク波形が広い範囲で重なり合うため変異アレルの同定が困難になります(図3)。DS3000の波形データは、Mutation Surveyorと組み合わせることで、塩基挿入や欠失を同定することが可能になります。なお、欠失の解析には野生型ゲノムDNAのデータが必要になります。波形データの品質を揃えるため、野生型ゲノムDNAのデータは変異サンプルと同じインジェクションで取得することをお勧めします。次世代シーケンスの結果から、CTNNB1ではシトシン-チミン-チミン(CTT)の欠失、PLA2G15ではグアニン(G)の挿入が起きていることが示されています(表2)。図3からそれぞれを正しく検出できていることがわかります。

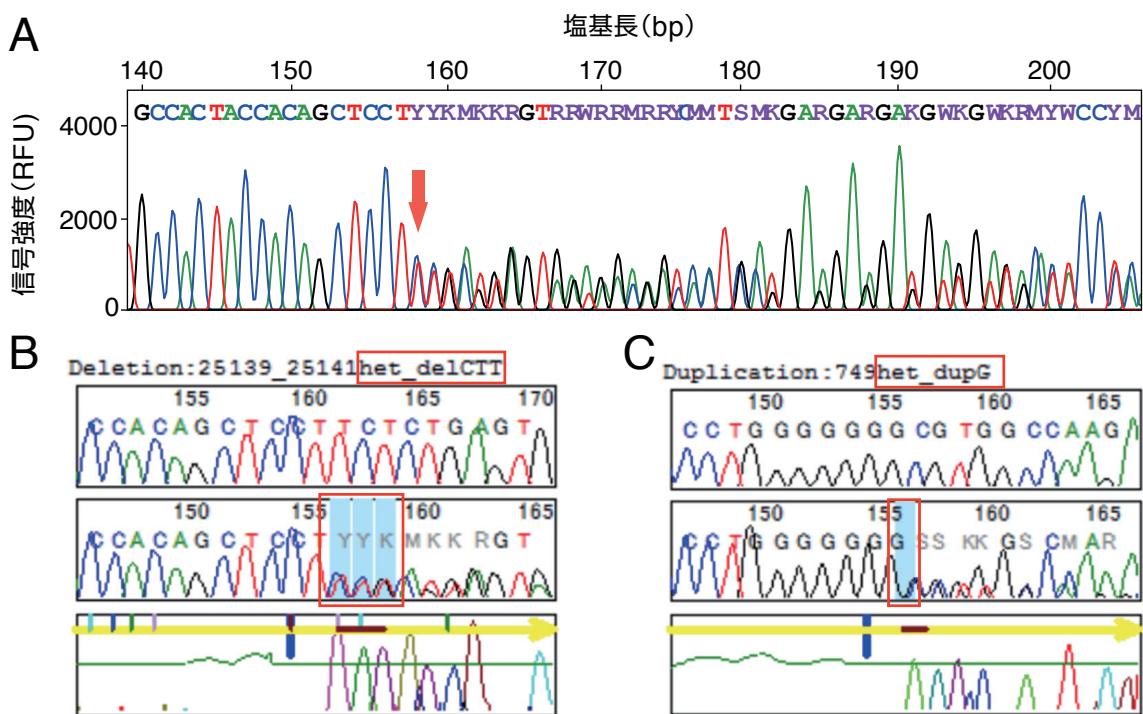


図3. 塩基挿入と欠失を示す変異アレルの解析結果

A. ヘテロ接合でシトシン-チミン-チミン(CTT)の欠失が発生しているアレル(表2、ID:13)の波形データ。

矢印を起点に2つのピークが重なり合い、混合塩基が連続的にコールされています。

B. Aと同じ泳動データをMutation Surveyorで解析した結果。

Mutation Surveyorによる変異解析の一部を示します。

シトシン-チミン-チミン(CTT)の欠失が検出されているのがわかります(図中の赤枠部分)。

C. ヘテロ接合でグアニンの挿入が発生しているアレル(表2、ID:14)の解析結果。

Mutation Surveyorでグアニンの挿入が示されています。波形データは上から順に、野生型、変異型、野生型と変異型の差分を示します。

結論

DS3000は今回の検証で取り上げたNGSバリアントを漏れなく検出しました。さらにMutation Surveyorと組み合わせることで、変異率の定量や、挿入及び欠失した塩基の同定が可能になりました。なおNGSバリアントを確認する際は、コール結果だけでなく波形データを確認することをお勧めします。

変異アレルの検出はシーケンスデータの品質に大きく影響されます。より信頼性の高いデータを得るために、以下の点をご検討ください。

1. DS3000では混合塩基をコールするための閾値を設定することができます。閾値が高すぎるとヘテロ接合型の一塩基置換を検出しない場合があります。閾値の設定はDS3000の取扱説明書をご覧ください。なお、Mutation SurveyorのベースコーラーはDS3000の設定値に影響されません。
2. ピークの信号強度が低すぎると変異アレルを検出できない場合があります。おおむね1,000 RFU以上のピークが得られるようにサンプル濃度やインジェクション条件、精製方法をご検討ください。
3. 電気泳動の特性として、長塩基側ではピークの分離性能が低下します。60～120 bp付近ではダイプロブにより波形が乱れることがあります。そこで、解析したい部位がシーケンスプライマの3'末端から200～300 bp付近に位置する様にプライマを設計することをお勧めします。
4. 高い信頼性が必要な場合は、順鎖と逆鎖の両方を測定することをご検討ください。

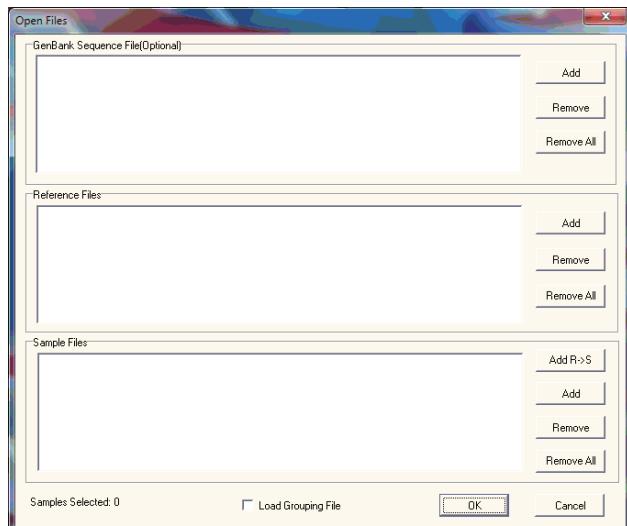
実験手法

サンプル調製

参考文献(2)から下記の点突然変異14個を無作為に抽出しました(表2)。シーケンスプラットフォームはHiSeq2000(Illumina社)です。変異は、一塩基置換が12個(ホモ接合型×7個、ヘテロ接合型×5個)、ヘテロ接合型の塩基挿入が1個、欠失が1個になります。それぞれのアレルを含む領域を表3～5に従ってPCRで増幅しました。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10 µLのElution Bufferで溶出した後、QuBit®(Thermo Fisher Scientific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6、7)。反応産物はキットに添付のプロトコルに従い、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8)。得られた泳動データ(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

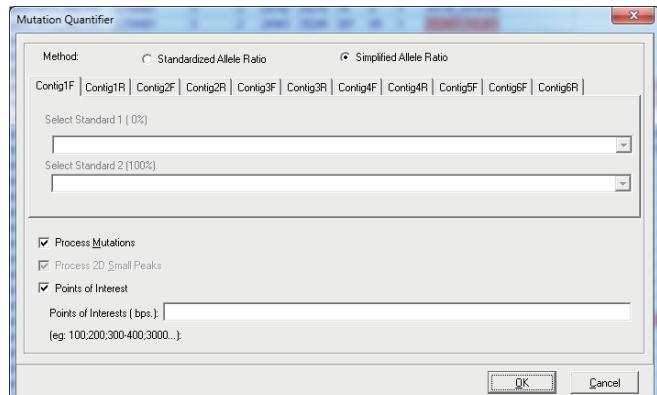
始めに"Files"の"Open Files"で、電気泳動データを読み込みました(図4)。GeneBank Sequence File(.gbk)はGeneBankからダウンロードしました(表9)。Reference Filesは野生型の泳動データ、Sample Filesは解析対象の泳動データになります。次に、Mutation Quantifierを図5に従って設定しました。図3の波形データと解析結果は、解析したい変異を選択した上で、"Display"から"Clinical report"をクリックすると描画できます。

**図4. Mutation Surveyorの設定1**

Open Filesダイアログを示します。

GenBank Sequence Fileは表9に従いました。

Reference Filesには野生型の泳動データ、Sample Filesには変異解析を行う泳動データを入力しました。

**図5. Mutation Surveyorの設定2**

Mutation Quantifierの設定例を示します。

表2. 解析対象

ID	遺伝子名	変異の位置	野生型	変異	変異の種類
1	KLHL34	chrX:21675124	C	T	木モ接合型
2	LHFPL1	chrX:111914255	C	T	木モ接合型
3	LMBRD2	chr5:36136519	G	C	木モ接合型
4	USP9Y	chrY:14821418	A	G	木モ接合型
5	USP9Y	chrY:14885820	G	A	木モ接合型
6	KRAS	chr12:25398281	C	T	ヘテロ接合型
7	MYCBP2	chr13:77713342	C	T	ヘテロ接合型
8	MYCBP2	chr13:77751942	A	G	ヘテロ接合型
9	MYCBP2	chr13:77764421	C	T	ヘテロ接合型
10	PARK2	chr6:162394383	T	A	ヘテロ接合型
11	PIK3CA	chr3:178952085	A	G	ヘテロ接合型
12	PINK1	chr1:20977047	G	A	ヘテロ接合型
13	CTNNB1	chr3:41266133	CCTT	C	ヘテロ接合型
14	PLA2G15	chr16:68289854	T	TG	ヘテロ接合型

表3. プライマ配列

ID	フォワード	リバース
1	ACAGAGTTGCTGGAGCGTGT	CCTCCTCCTCTTCCTCCAAC
2	TGGACAAAGTGAAGGGGGTG	GTGGAAGAATGTGGCGCTA
3	ACTTGCTTACCTCCATGGCA	AGAACACAGTGTCTCCTGTGTT
4	GGTCTCTGCAAGATGTTTGTC	CCACACTTAGCCCACAGTCA
5	CTCTGTGCTCCTCAGGCAA	ACCTCAGGTACAATGTTGGCA
6	AGAATGGCCTGCACCAGTAA	TGATTGAATTTGTAAGGTATTTGAA
7	TGTGGGTTACCTCAGAACTGA	TGCAGACTTCAGACCTTGCT
8	TGGTAAATCCTGATACACAACCCA	ACCTTGGATGGTTTGTAAAGGT
9	GCTGAATGCTCAAATAATTCTCCC	AAAAGAGTGAATCATTTCATTGACAT
10	CTTACCTCACGTCCGTGGAG	CTGGGAAAGGTTTGATGCTGA
11	ATGATGCTTGGCTCTGGAAT	ATGCTGTTCATGGATTGTGC
12	GCTTCCCTTCCTGTTGCAGA	CTCCCACCCCTCACCAATTAC
13	TGGGTCAATCACAGATTCTTTT	TCAAAACTGCATTCTGACTTTCA
14	TGAAAACGGGCCCTACTTCC	GCCCAGGAGGACACTTAGGA

表4. PCR条件

温度(°C)	時間(秒)	サイクル
98	30	×36
98	10	
65	30	
72	30	
70	300	×1
4	hold	

表5. PCRミックス

試薬	液量(μL)
Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific, 2U/μL)	0.2
5×Phusion HF Buffer	4
dNTP Mixture (2.5 mM each)	1.6
10 μM Forward Primer	1
10 μM Reverse Primer	1
DNA (10 ng/μL)	1
PCR grade water	11.2

表6. 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	
54	5	×25
60	240	
4	hold	

表7. 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8. サンプル注入条件と電気泳動の設定

アッセイ	サンプル注入条件		電気泳動	
	印加電圧	印加時間	印加電圧	印加時間
AB_Seq_36_Fast	1.2 kV	4 秒	14 kV	900 秒
AB_Seq_36_Std	1.2 kV	4 秒	7.5 kV	2,360 秒

表9. 解析に使用したGenebank Sequence Fileの一覧

ID	遺伝子名	GenBank file
1	KLHL34	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_153270.3
2	LHFPL1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_178175.4
3	LMBRD2	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001007527.2
4	USP9Y	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_004654.4
5	USP9Y	
6	KRAS	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_007524.2
7	MYCBP2	
8	MYCBP2	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_015057.5
9	MYCBP2	
10	PARK2	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_004562.3
11	PIK3CA	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_012113.2
12	PINK1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_032409.3
13	CTNNB1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_013302.2
14	PLA2G15	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_012320.4

参考文献

- (1) Mu W., Lu H-M., Chen J., Li S. & Elliott A. Sanger confirmation is required to achieve optimal sensitivity and specificity in next-generation sequencing panel testing. *J. Mol. Diagn.* 18, 923-932 (2016)
- (2) Mouradov, D. et al. Colorectal cancer cell lines are representative models of the main molecular subtypes of primary cancer *Cancer Res.* 74, 3238-3247 (2014)

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 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 2023 All rights reserved.