

DS3000 Compact CE SequencerにおけるMLPA®解析の実例

概要

MLPA®法(試薬製造元:MRC Holland、試薬国内販売代理店:(株)ファルコバイオシステムズ)は、コピー数変化(欠失/重複:CNV)、既知SNP、メチル化度を解析する方法として知られています。標的遺伝子に特異的にハイブリダイズする塩基配列が、MLPAプローブ内に設計されており、ハイブリダイゼーション、ライゲーション、PCRを経てキャピラリー電気泳動により変異を解析します。ここでは、DS3000 Compact CE Sequencer(以下、DS3000と表記します)を用いたMLPA®解析の実例を紹介します。JAK2 V617F変異を50%含むリファレンスサンプルである、JAK2 p.V617F 50% reference standard(Horizon Discovery)を用いて、造血器腫瘍関連遺伝子を解析しました。造血器腫瘍の一つである骨髄増殖性腫瘍には、慢性骨髄性白血病、慢性好中球性白血病、真性赤血球増加症または真性多血症(PV)、原発性骨髄線維症(PMF)、本態性血小板血症(ET)、慢性好酸球性白血病、分類不能骨髄増殖性腫瘍が含まれ、そのうちPVの95%以上、ETおよびPMFの約半分にJAK2変異が生じているとされています(参考文献1)。DS3000を用いた解析の結果、想定されたIKZF1、CDK6、RELN、MET、DPP6、DCC遺伝子の重複と、JAK2変異の検出を確認しました。なお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

JAK2 p.V617F 50% reference standard(Horizon Discovery)を、MLPA® General Protocol(参考文献2)に従い調製し、DS3000を用いてPolymer4で電気泳動しました。得られたfsaファイルをCoffalyser.Net™(MRC Holland)で解析した結果、電気泳動の品質を示す「Fragment Run Separation Score(FRSS)」およびMLPA®反応の品質を示す「Fragment MLPA Reaction Score(FMRS)」において、全て100%の最高スコアであり、データ品質として問題ないことを確認しました。その上で、点変異(JAK2 p.V617F)を含む場合にのみシグナルが検出されるJAK2のプローブに対し、JAK2 p.V617F 50% reference standard(Horizon Discovery)ではシグナルが検出され、変異が認められました(図1、図2)。同時に、リファレンスサンプルと比較してIKZF1、CDK6、RELN、MET、DPP6、DCCのシグナル強度がおおよそ1.5倍となり、重複が認められました(図2)。これらの変異および重複は、JAK2 p.V617F 50% reference standard(Horizon Discovery)において全て想定されたとおりの結果でした(参考文献3)。

結論

造血管腫瘍で見られるJAK2変異を検出するMLPA[®]解析において、DS3000を用いて、想定された遺伝子変異および重複を全て正しく検出することができました。また併せて実施したOligodendroglioma、EGFR、dMMRの変異もしくはメチル化を検出するMLPA[®]解析、MS-MLPA[®]解析においても、想定された変異およびメチル化を検出することができました。詳細は「参考」をご確認ください。これにより、DS3000はMLPA[®]解析に使用できることを確認いたしました。

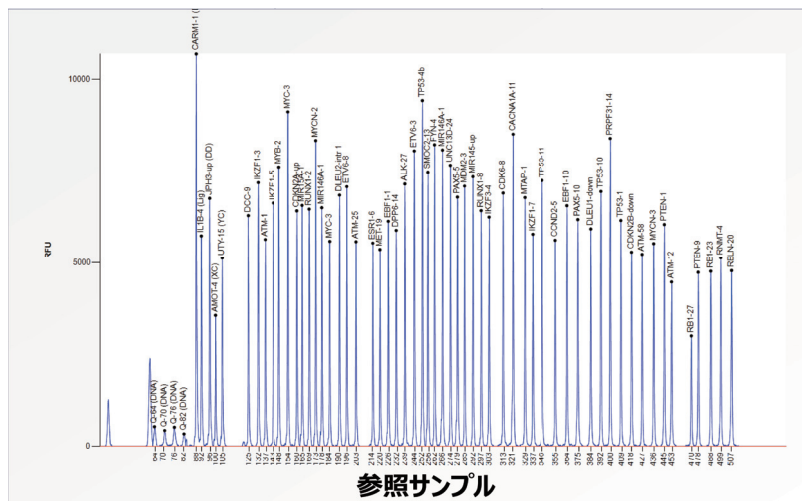


図1:P377-A3, JAK2 p.V617F 50% reference standardのCoffalyser.Net[™]での解析結果「Electropherograms」
(X軸:塩基長、Y軸:シグナル強度)

上の図はリファレンスサンプル
2800M Control DNA (Promega[®])、
下の図はJAK2 p.V617F 50%
reference standardの結果を示しています。
下図ではJAK2にシグナルが検出され、
変異を示すために黄色でマークされています。

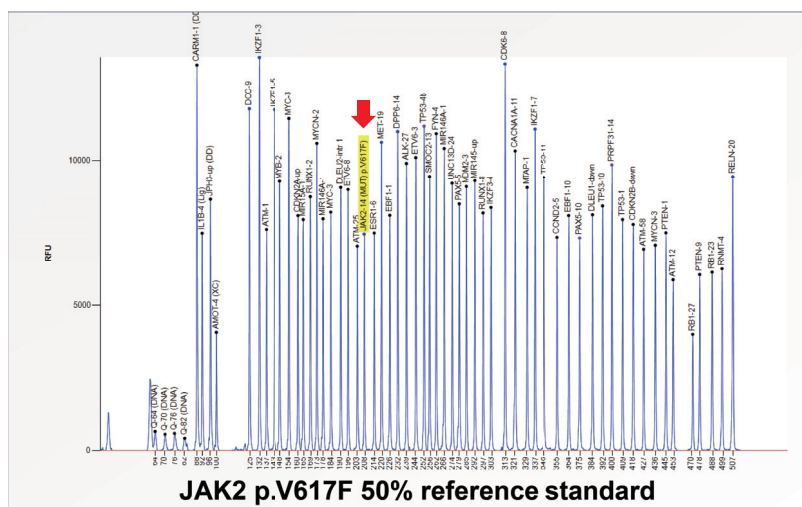
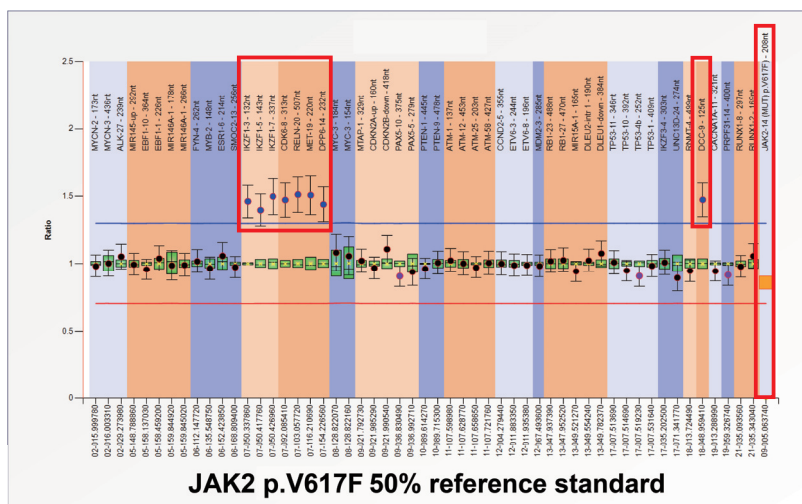


図2:P377-A3, JAK2 p.V617F 50% reference standardのCoffalyser.Net[™]での解析結果「ratio chart」
(X軸:各遺伝子、Y軸:リファレンスサンプルと比較したシグナル強度比(Ratio))

JAK2という変異特異的なプローブにおいて、
変異が確認された場合に表示されるオレンジ色の
ボックスが示されました。

JAK2 p.V617F 50% reference standard
にて想定されたIKZF1、CDK6、RELN、MET、
DPP6、DCCのシグナル強度比(Ratio)が
全て1.5程度となり、
重複を検出しました(参考文献3)。



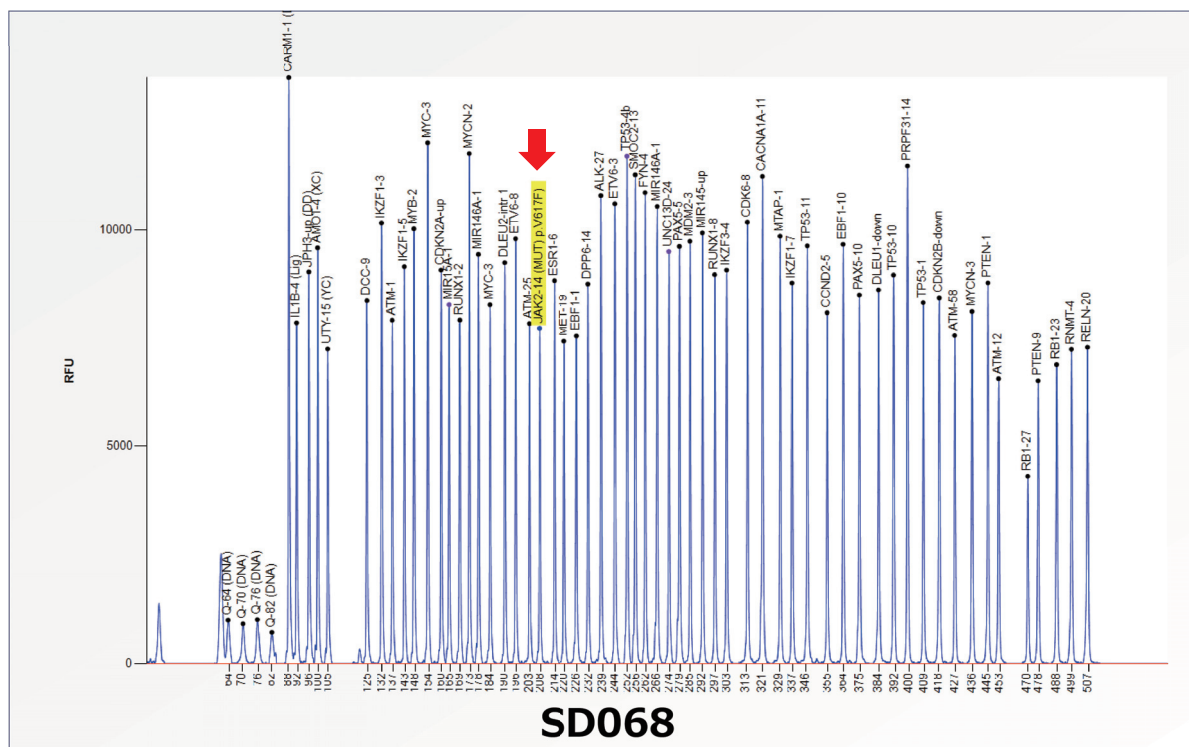


図3:P377-A3, SD068-S01のCoffalyser.Net™での解析結果「Electropherograms」(X軸:塩基長、Y軸:シグナル強度)
JAK2にシグナルが検出され、変異を示すために黄色でマークされています。

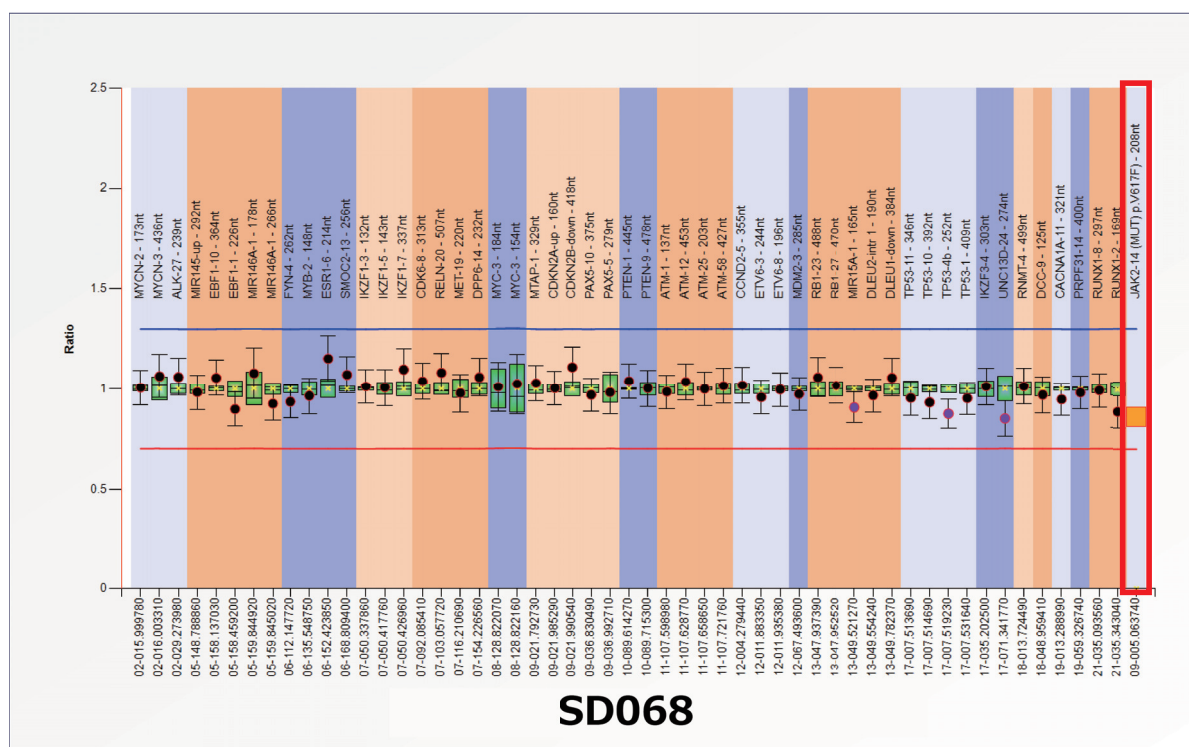


図4:P377-A3, SD068-S01のCoffalyser.Net™での解析結果「ratio chart」
(X軸:各遺伝子、Y軸:リファレンスサンプルと比較したシグナル強度比(Ratio))

SD068はJAK2に変異が検出されるように人工的に作られたサンプルです。想定されたとおり、JAK2の変異を検出しました(参考文献6)。

実験

1. サンプルの調製

MLPA® General Protocol(参考文献2)に従い、調製しました。MLPA® probemixは造血器腫瘍の変異JAK2を検出する、SALSA® MLPA® Probemix P377-A3 Hematologic Malignanciesを用いました。

1.1. サンプルの準備

準備したサンプルを表1に示します。JAK2 p.V617F 50% reference standard(Horizon Discovery)、点変異を含まないリファレンスサンプルとして、2800M Control DNA(Promega®)、ポジティブコントロールとして、人工的に突然変異のピークが検出されるように作られたSALSA® Binning DNA SD068-S01(MRC Holland)、DNAを含まないネガティブコントロールとしてTEバッファ、の4種を準備しました。

1.2. ハイブリダイゼーション

5 µLあたり50 ngになるよう調製したDNAを98 °Cで5分変性させ、室温まで冷やしました。次に、表2に示すハイブリダイゼーション混合液を調製し、室温に冷やしたDNA 5 µLに対し3 µLずつ加え、優しくピペティングしました。その後、95 °Cで1分再変性し、60 °Cで20時間ハイブリダイゼーションしました。

1.3. ライゲーション

表3に示すライゲーション混合液を優しくピペティングしながら調製しました。ハイブリダイズしたDNA溶液8 µLを54 °Cにした後、ライゲーション混合液32 µLをサーマルサイクラー上で優しくピペティングしながら加えました。その後54 °Cで15分ライゲーションし、98 °Cで5分ライゲースを失活させました。

1.4. PCR

表4に示すポリメラーゼ混合液を優しくピペティングしながら調製しました。ライゲーションしたDNA溶液40 µLを室温まで冷やした後、ポリメラーゼ混合液10 µLを優しくピペティングしながら加えました。表5に示す条件でPCRを実施しました。

2. キャピラリー電気泳動

MLPA® General Protocol(参考文献2)に従い、調製しました。

PCR反応物0.7 µLに対し、Hi-Di™ Formamide(Thermo Fisher Scientific)を9.0 µL、サイズスタンダードGeneScan™ 500 LIZ® dye Size Standard(Thermo Fisher Scientific)を0.2 µLを混ぜ、86 °Cで3分熱変性し、4 °Cで2分冷却しました。変性後のサンプルを、DS3000を用いて表6に示す条件で電気泳動しました。

3. Coffalyser.Net™での解析

DS3000により得られたfsaファイルを用いて、CRM Coffalyser.Net™ Reference Manual(参考文献4)に従い、Coffalyser.Net™(MRC Holland)にて解析しました。

3.1. データ品質の確認

サンプルと一緒に電気泳動したサイズスタンダードにより電気泳動の品質を示す「Fragment Run Separation Score(FRSS)」およびMLPA®反応の品質を示す「Fragment MLPA Reaction Score(FMRS)」のスコアを確認しました。

3.2. 結果の確認

表示される結果から、変異や重複が認められるかを確認しました。Coffalyser.Net™における画面の一例を図1以降に示します。図1は「Electropherograms」で、変異があると黄色でマークされます。リファレンスサンプルでは黄色でマークされたシグナルがないのに対し、JAK2 p.V617F 50% reference standard(Horizon Discovery)ではJAK2の箇所が黄色くマークされました。また図2はリファレンスサンプルに対する比を示す「ratio chart」で、JAK2 p.V617F 50% reference standard(Horizon Discovery)の結果です。一番右側のJAK2の箇所に、変異特異的なプローブにおいてシグナルが検出される場合、つまり変異がある場合に表示されるオレンジ色のボックスが示されました。併せて、IKZF1、CDK6、RELN、MET、DPP6、DCCのシグナル強度がおおよそ1.5倍でプロットされました。

同時に電気泳動したSALSA® Binning DNA SD068-S01(MRC Holland)の結果を、図3および図4に示します。

MLPA® General Protocol(参考文献2)、Coffalyser.Net™、CRM Coffalyser.Net™ Reference Manual(参考文献4)については、MRC Hollandのホームページ(<https://www.mrcholland.com/>)をご確認ください。

表1. P377-A3解析におけるサンプル

試薬	サンプル数	種類
2800M Control DNA (Promega®)	3	リファレンスサンプル
JAK2 V617F Reference Standard, 50% (Horizon Discovery)	1	テストサンプル
SALSA® Binning DNA SD068-S01 (MRC Holland)	1	ポジティブコントロール
TEバッファ	1	ネガティブコントロール

表2. ハイブリダイゼーション混合液

試薬	液量(μL)
MLPA buffer	1.5
SALSA® Probemix	1.5
Total	3.0

表3. ライゲーション混合液

試薬	液量(μL)
Ligase buffer A	3
Ligase buffer B	3
Ligase-65	1
PCR grade water	25
Total	32

表4. ポリメラーゼ混合液

試薬	液量(μL)
SALSA® PCR primer mix	2.0
SALSA® polymerase	0.5
PCR grade water	7.5
Total	10

表5. PCR条件

温度	時間	サイクル
95 °C	30秒	×35
60 °C	30秒	
72 °C	60秒	
72 °C	20分	×1
15 °C	hold	

表6. P377-A3解析における電気泳動条件

Polymer	Polymer4
Size Standard	GeneScan™ 500 LIZ® dye Size Standard (Thermo Fisher Scientific)
Dye Set	AB 5-dye
Matrix Standard	DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5) (Thermo Fisher Scientific)
Assay	AB_5Dye_LIZ500(75-500)_36_P4
Injection Voltage/Time	1.6 kV/9秒
Run Voltage	13 kV
Run Time	1930秒

参考

P377-A3以外のprobemix(以下3種)についてもDS3000で解析できることを確認しました。

- ・脳腫瘍の一種である乏突起膠腫Oligodendrogliomaを解析するSALSA[®] MLPA[®] Probemix P088-D1 Oligodendroglioma 1p-19q
- ・肺がんや大腸がん、乳がんにおいて多く変異が見られるEGFRを解析するSALSA[®] MLPA[®] Probemix P315-C1 EGFR
- ・ミスマッチ修復機能欠損dMMRを解析するSALSA[®] MLPA[®] Probemix ME011-D1 Mismatch Repair Genes

それぞれのprobemixに対応したSALSA[®] Binning DNA(MRC Holland)を変異サンプルとして、解析を行いました。その結果全てのprobemixにおいて、想定されたBinning DNAの変異を正しく検出しました。準備したサンプルを表7から表9に示します。また、表6もしくは表10の条件に従い電気泳動しました。電気泳動した結果を図5から図10に示します。

ME011-D1はコピー数変化、メチル化度合、点変異を同時に検出するMS-MLPA[®] 解析です(参考文献5)。ハイブリダイゼーション後、メチル化感受性制限酵素HhaIをライゲースと共に加え反応させます。メチル化されたDNAはこの制限酵素では切断されないため、電気泳動にてシグナルが検出されます。図9-DのSD086ではBRAF exon 15、MLH1 exon 1のシグナルが検出される一方、図9-Bのリファレンスサンプルでは検出されていません。なお、P088-D1、P315-C1はP377-A3と同じ一般的なMLPA[®] 解析アプリケーションです。

表7.P088-D1解析におけるサンプル

試薬	サンプル数	種類
2800M Control DNA (Promega [®])	3	リファレンスサンプル
SALSA [®] Binning DNA SD079-S01 (MRC Holland)	1	テストサンプル
TEバッファ	1	ネガティブコントロール

表8.P315-C1解析におけるサンプル

試薬	サンプル数	種類
2800M Control DNA (Promega [®])	3	リファレンスサンプル
SALSA [®] Binning DNA SD006-S01 (MRC Holland)	1	テストサンプル
TEバッファ	1	ネガティブコントロール

表9.ME011-D1解析におけるサンプル

試薬	サンプル数	種類
2800M Control DNA (Promega [®])	3	リファレンスサンプル
SALSA [®] Binning DNA SD086-S01 (MRC Holland)	1	テストサンプル
TEバッファ	1	ネガティブコントロール

注意

- ・ ME011-D1の解析では、表6の電気泳動条件で実施した際に、「Percentage noise peaks」におけるWarningが表示されました。このWarningはノイズが多いと発生します。この時、全体的に高いシグナル強度が得られました。それに伴い、ノイズも高い結果となりました。そこでサンプル注入条件を、既存の1.6 kV/9秒から1.2 kV/4秒に変更しました(表10)。これにより全体のシグナル強度およびノイズのシグナル強度が低くなり、Warningが消え、正しく解析することが可能になりました。プローブ由来のシグナル強度はprobemixの種類や解析するサンプルによって高くなり、その結果、ノイズも検出閾値より高くなる場合があります。この場合は、サンプル注入条件の変更を検討してください。
- ・ DS3000を用いてMLPA®解析を始める前に、既知のDNAを用いて評価を行ってください。必要に応じて、サンプル注入条件などを変更してください。
なお、サンプル注入条件の変更方法はDS3000の取扱説明書をご確認ください。
- ・ P377-A3の解析では、SALSA® Binning DNAをポジティブコントロールとしました。
しかし本来SALSA® Binning DNAは、Coffalyser.Net™でのBinを調整するための指標として使われるものです(参考文献2)。

表10. ME011-D1解析における電気泳動条件

(インジェクション電圧を既存のAssayから1.2 kV/4秒に変更)

Polymer	Polymer4
Size Standard	GeneScan™ 500 LIZ® dye Size Standard (Thermo Fisher Scientific)
Dye Set	AB-5dye
Matrix Standard	DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5) (Thermo Fisher Scientific)
Assay (Original)	AB_5Dye_LIZ500(75-500)_36_P4
Injection Voltage/Time	1.2 kV/4秒
Run Voltage	13 kV
Run Time	1930秒

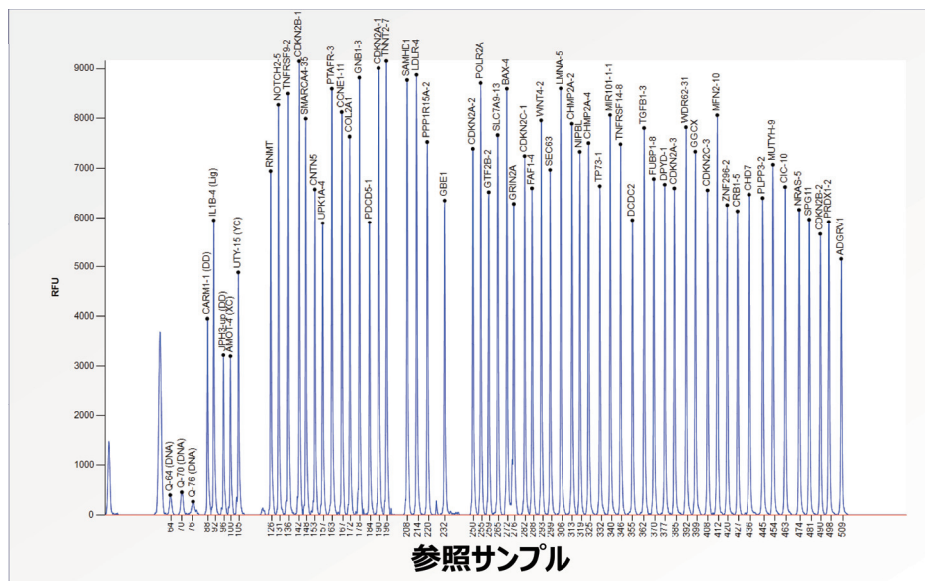


図5:P088-D1, SD079-S01の
Coffalyser.Net™での
解析結果

「Electropherograms」
(X軸:塩基長、Y軸:シグナル強度)

上の図はリファレンスサンプル2800M Control DNA (Promega®)、
下の図はSD079の結果を
示しています。下図ではIDH1 exon 6
(p.R132H, p.R132C)、
IDH2 exon 5 (p.R172K、
p.R172M)にシグナルが検出され、
変異を示すために黄色で
マークされています。

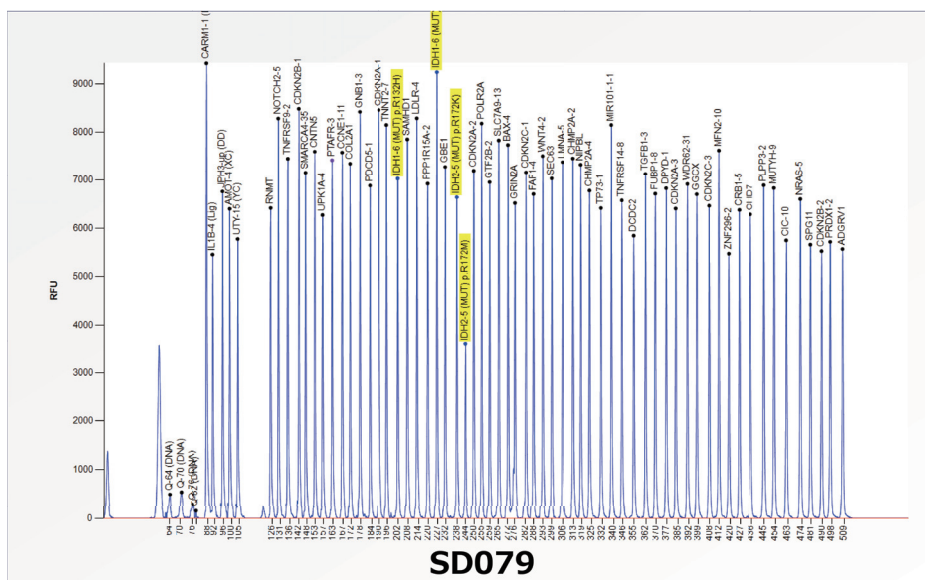
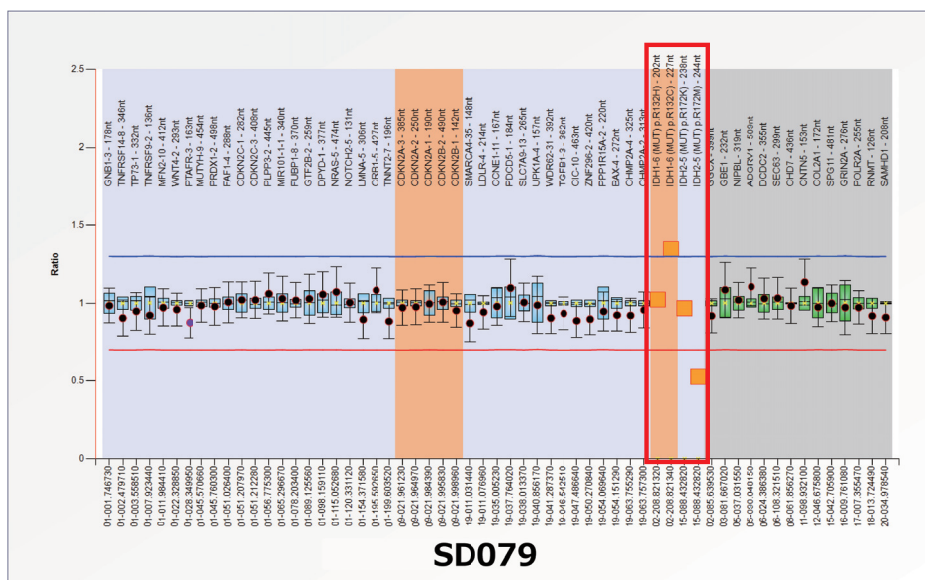


図6:P088-D1, SD079-S01の
Coffalyser.Net™での
解析結果「ratio chart」

(X軸:各遺伝子、Y軸:
リファレンスサンプルと比較した
シグナル強度比(Ratio))

SD079はIDH1 exon 6 (p.R132H、
p.R132C)、IDH2 exon 5
(p.R172K、p.R172M)に変異が
検出されるように人工的に作られた
サンプルです。想定されたとおり、
4箇所の変異全てを検出しました
(参考文献7)。



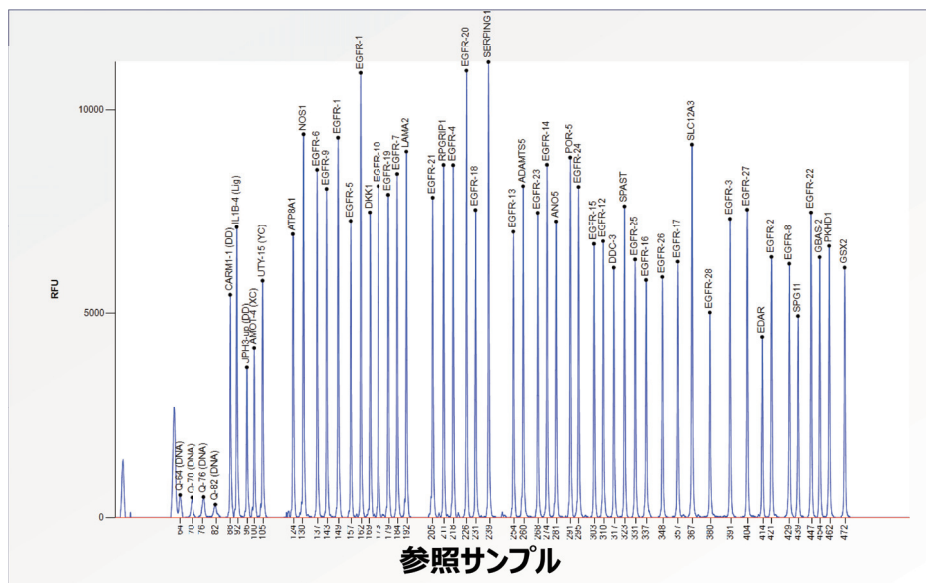


図7:P315-C1, SD006-S01の
Coffalyser.Net™での
解析結果

「Electropherograms」
(X軸:塩基長、Y軸:シグナル強度)

上の図はリファレンスサンプル2800M

Control DNA (Promega®)、

下の図はSD006の結果を

示しています。下図ではEGFR

exon 20、EGFR exon 21に

シグナルが検出され、変異を示す

ために黄色でマークされています。

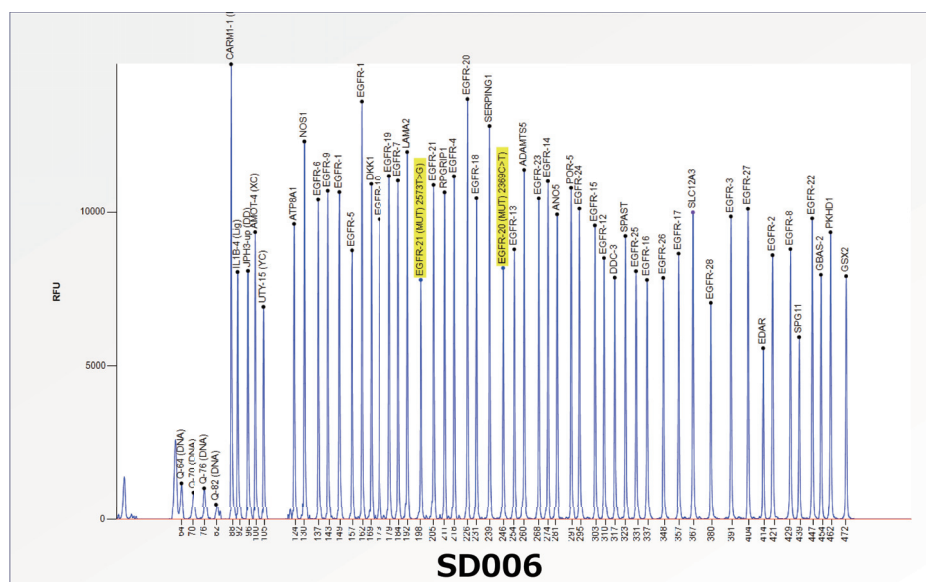


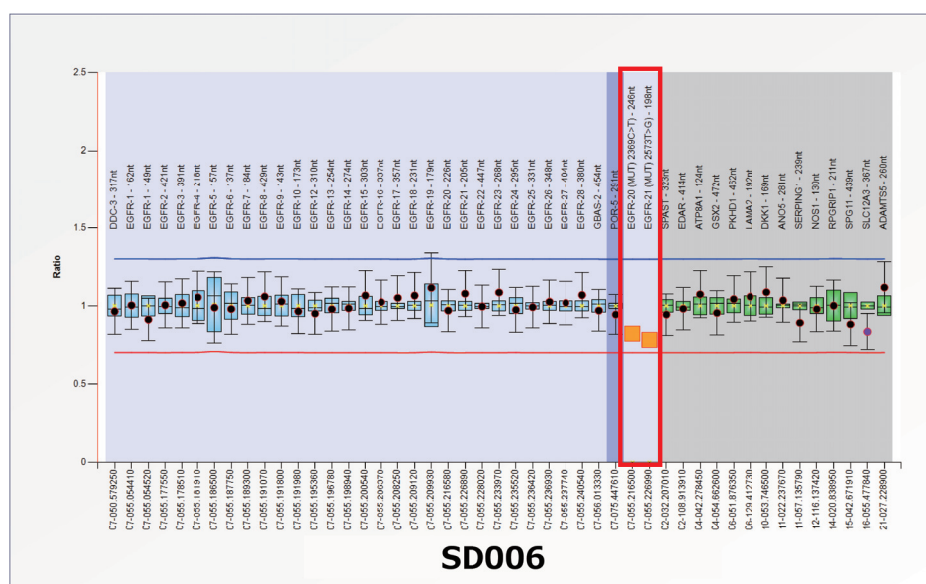
図8:P315-C1, SD006-S01の
Coffalyser.Net™での
解析結果「ratio chart」

(X軸:各遺伝子、Y軸:
リファレンスサンプルと比較した
シグナル強度比(Ratio))

SD006はEGFR exon 20、EGFR
exon 21に変異が検出されるように
人工的に作られたサンプルです。

想定されたとおり、2箇所の変異を

ともに検出しました(参考文献8)。



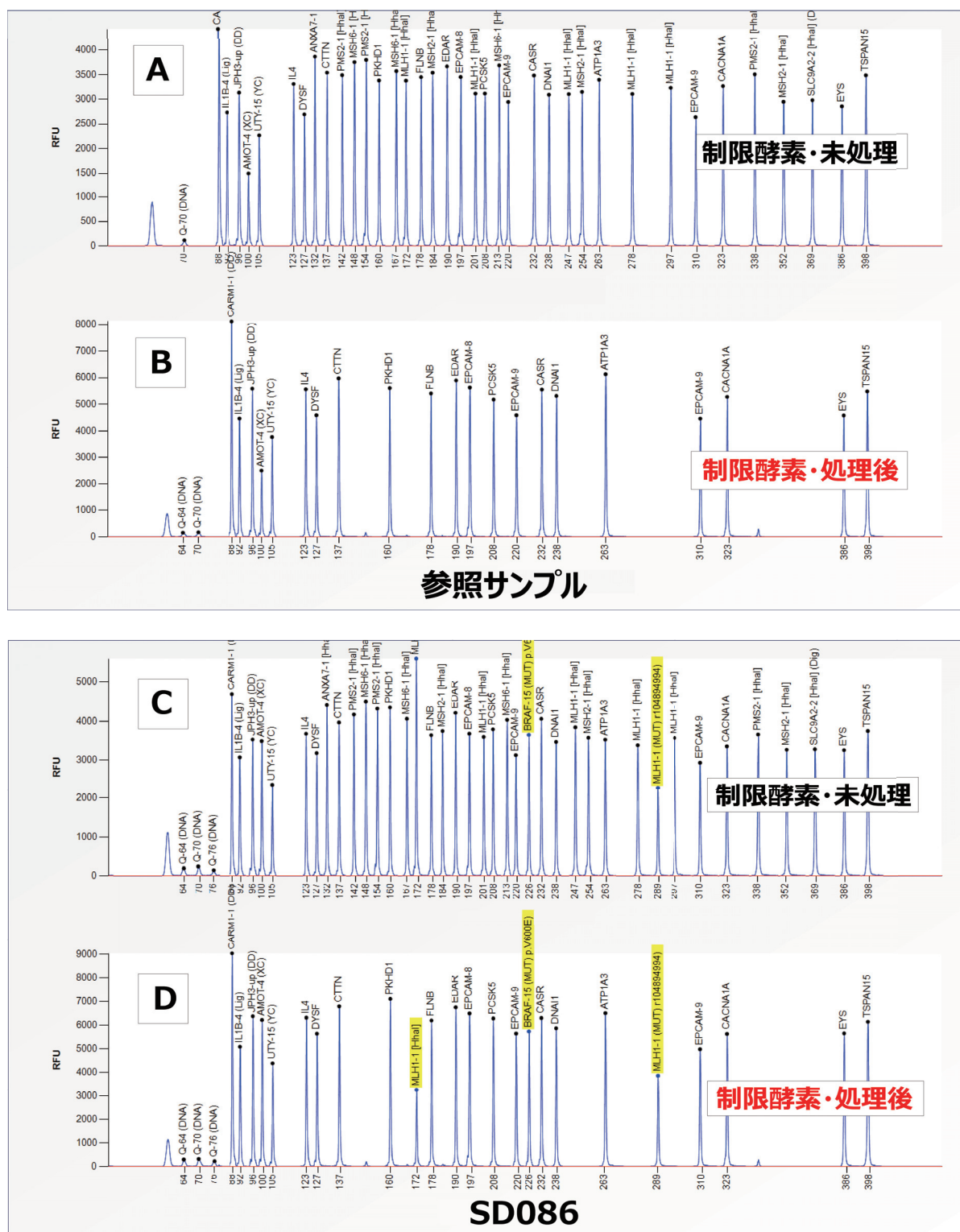


図9: ME011-D01, SD086-S01のCoffalyser.Net™での解析結果「Electropherograms」(X軸:塩基長、Y軸:シグナル強度)

図9のA、Bはリファレンスサンプル2800M Control DNA (Promega®)、C、DはSD086の結果を示しています。制限酵素HhaIはMLH1、MSH2、PMS2、MSH6遺伝子のGCGC部位を標的配列としています。CのSD086の制限酵素未処理のサンプルでは、点変異特異的なプローブであるBRAF exon 15と、SNP特異的なプローブであるMLH1 exon 1にシグナルが検出され、黄色でマークされています。更にDのSD086の制限酵素処理後のサンプルでは、BRAF exon 15は切断されず、シグナルが検出されています。MLH1 exon 1も切断されず、289 ntと併せて172 ntでシグナルが検出されています。172 ntのシグナルは、289 ntのSNP特異的なプローブの認識する塩基配列と、172 ntのメチレーション特異的なプローブの認識する塩基配列と重なり合うため発生します。(参考文献9)

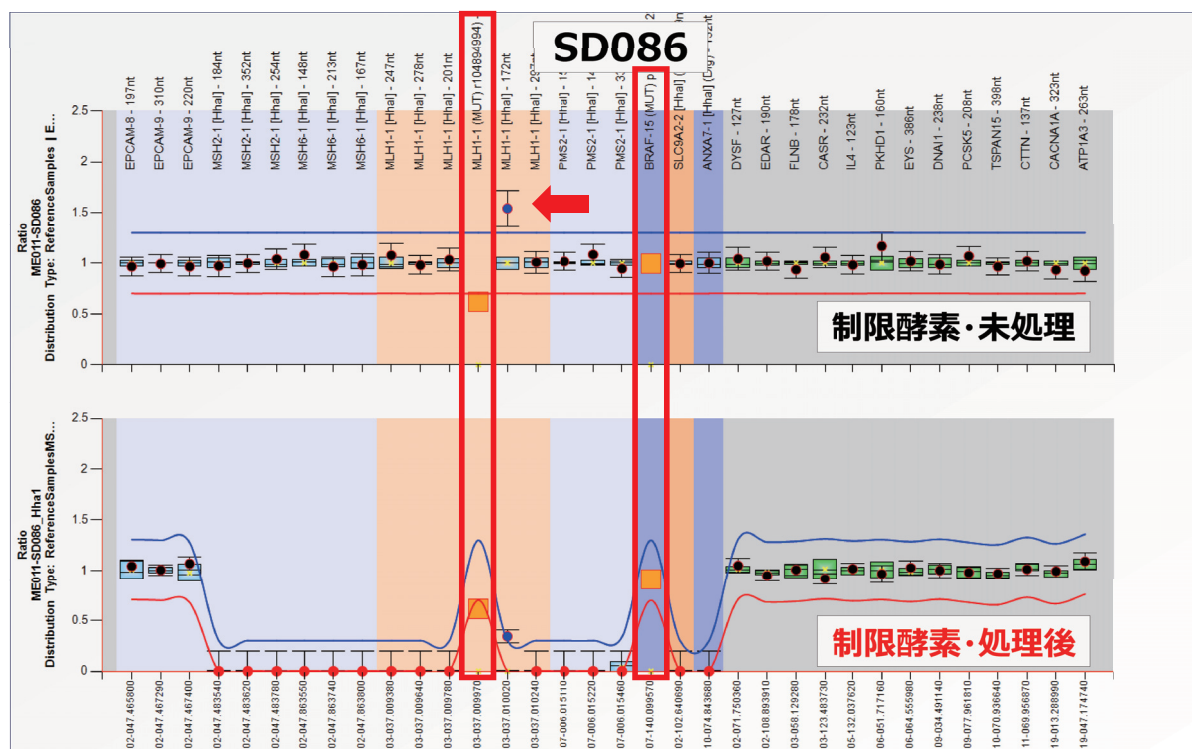


図10: ME011-D01, SD086-S01のCoffalyser.Net™での解析結果「ratio chart」
(X軸:各遺伝子、Y軸:リファレンスサンプルと比較したシグナル強度比(Ratio))

SD086はBRAF exon 15、MLH1 exon 1に変異が検出されるように人工的に作られたサンプルです。想定されたとおり、2箇所の変異を検出しました。また制限酵素未処理において、172 ntのMLH1のメチレーション特異的のプロープでのシグナルが高くなっています。これは289 ntのプロープの標的配列が、172 ntのプロープの標的配列と大きく重なっているためであり、SD086では比率1.3-1.65のシグナル増加が想定されています(参考文献9)。

参考文献

- (1) 一般社団法人日本血液学会 造血器腫瘍診療ガイドライン 2018年版補訂版
<http://www.jshem.or.jp/gui-hemali/table.html>
- (2) MRC Holland MLPA® General Protocol Version 008, 06 May 2022
- (3) MRC Holland "List of verified positive samples that can be used with (digital)MLPA probemixes"
(P377-A: Horizon Discovery JAK2 p.V617F 50% reference standard/ Heterozygous duplication affecting the probes for IKZF1, CDK6, RELN, MET, DPP6 and DCC. Positive for the JAK2 p.V617F mutation.)
<https://support.mrcholland.com/kb/articles/list-of-verified-positive-samples-that-can-be-used-with-digital-mlpa-probemixes>
- (4) MRC Holland CRM Coffalyser.Net™ Reference Manual For Coffalyser.Net™ version 220513.1739 Version 02, June 2022
- (5) MRC Holland MS- MLPA® General Protocol Version 012, 06 May 2022
- (6) MRC Holland Product Description SALSA® Binning DNA SD068-S01 Version S01-02, 03 January 2018
- (7) MRC Holland Product Description SALSA® Binning DNA SD079-S01 Version S01-02, 14 December 2020
- (8) MRC Holland Product Description SALSA® Binning DNA SD006-S01 Version S01-05, 21 August 2020
- (9) MRC Holland Product Description SALSA® Binning DNA SD086-S01 Version S01-02, 01 July 2022

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 ^{*2}	Polymer7	≥600	≤32
BDx_Standard_Sequence36_Polymer7	BDx シーケンシング解析 ^{*2}	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 ^{*3} (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Applied Biosystems™ BigDye™ Terminator v3.1 Sequencing Standard Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製:別売り)を用いて検証されています。

※2. BDxシーケンシング解析はサーモフィッシャーサイエンティフィック社のApplied Biosystems™ BigDye XTerminator™ Purification Kitを用いて精製したサンプルの解析モジュールです。

※3. サイジング精度(50 – 400 bp)はPowerPlex™ ES17 Fast Allelic Ladder Mix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	使用上限回数	備考
Capillary Cartridge 36 cm	613-0330	1個	300インジェクション/個	保管温度:15 – 30 °C
Buffer	613-0252	Anode Buffer Cartridge×2個 Cathode Buffer Cartridge×2個	80インジェクション/個	保管温度: 2 – 10 °C
Polymer7	613-0251	Cartridge×4個	16インジェクション/個	保管温度: 2 – 10 °C
	613-0291	Cartridge×4個	24インジェクション/個	保管温度: 2 – 10 °C
Polymer4	613-0250	Cartridge×4個	16インジェクション/個	保管温度: 2 – 10 °C
	613-0290	Cartridge×4個	24インジェクション/個	保管温度: 2 – 10 °C
Septa for Cathode Buffer Cartridge	613-7231	10個	都度交換	
Retainer for Cathode Buffer Cartridge	613-7233	4個	–	
Septa for 8 well tubes	613-7230	24個	都度交換	
Base and Retainer for 8 well tubes	613-7232	4個	–	
Anode Electrode Assembly	613-7263	1個	–	

・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。

・本カタログの画面は、はめ込みです。

・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。

・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。

・Applied Biosystems™、BigDye™、BigDye XTerminator™はサーモフィッシャーサイエンティフィックの商標です。

・Promega®はPromega Corporationの登録商標であり、PowerPlex™はPromega Corporationの商標です。

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 2023 All rights reserved.

HTB-DS-J013P 2023.6