

Promega Info

高品質、高濃度、かつTATの短縮を可能とするMaxwell® RSC FFPE Plus DNA Kit (カタログ番号 AS1720)

1) 高品質、高濃度

キャプチャー法はアンプリコン法と比べ、ライブラリー作製に必要な核酸量を多く必要とします。以前に使用していたMaxwellのキット(AS1450)やカラム方式の用手精製キットに比べ、Maxwell® RSC FFPE Plus DNA Kit (AS1720) を使用することで、品質と回収量ともに大幅にUPし、キャプチャー法でも安定した解析データが得られます。

	AS1450	カラム	AS1720
切片の厚さ	抽出したDNAの濃度 (ng/μℓ)		
5μm厚×1枚	22.8	5.00	46.4
10μm厚×1枚	46.0	18.5	53.8
15μm厚×1枚	56.8	13.0	75.8

※ 10mm×15mm角の組織検体を使用

磁気ビーズ法はスピンカラム法でみられる“目詰まり”がなく、高い洗浄力を示すため、**純度や濃度の高いDNA**を得ることが可能です。



パラフィンの残留物も、カラムのフィルター目詰まりの原因となる



磁気（シリカ）ビーズ法
Maxwell RSC DNA FFPE Kit

2) TATの短縮

AS1720の作業工程

1	Proteinase K SolutionとIncubation Bufferを加える	
2	インキュベーション	70℃、60分間
3	Lysis Bufferを加えて攪拌する	
4	カートリッジに全量移す	
5	抽出プログラム実行	約30分間
total:		約90分間

約 90分間

AS1450の作業工程

1	ミネラルオイルを加えて攪拌する	
2	インキュベーション	80℃、2分間→室温
3	master mixを調製する	
4	サンプル(室温)にmaster mixを加え、攪拌する	
5	10000xgで20秒間遠心し層を分離する	
6	インキュベーション	56℃、30分間
7	インキュベーション	80℃、240分間→室温5分間
8	RNaseを加えて、ピペッティングする	
9	インキュベーション	室温、5分間
10	最高スピードで5分間遠心する	
11	カートリッジに水層を移す	
12	抽出プログラム実行	約40分間
total:		最短でも330分間

約 330分間

カラム(用手)法の作業工程

1	脱パラ用溶液を加えて攪拌する	
2	インキュベーション	56℃、3分間→室温→遠心2分間
3	上層を取り除く	
4	インキュベーション	37℃、10分間
5	Bufferを加えて混濁し、Proteinase Kを添加して攪拌する	
6	インキュベーション	56℃、15分間→水上3分間
7	20000xgで15分間遠心する	
8	上層を取り除く	
9	Bufferを加えて混濁し、Proteinase Kを添加して攪拌する	
10	インキュベーション	56℃、60分間
11	インキュベーション	90℃、120分間
12	Bufferを加えて混濁し、エタノールを添加して攪拌する	
13	カラムに移して1分間遠心する	
14	Bufferをカラムに添加して15秒間遠心する	
15	Bufferをカラムに添加して15秒間遠心する	
16	エタノールをカラムに添加して15秒間遠心する	
17	蓋を開放したまま5分間遠心する	
18	Bufferをカラムに添加して1分間遠心する	
total:		最短でも220分間

約 220分間

AS1720では、作業工程が少なく、インキュベーションも1回だけ。作業の手間・時間が減ったことで、検査の**TATが大幅に短縮**！

製品情報

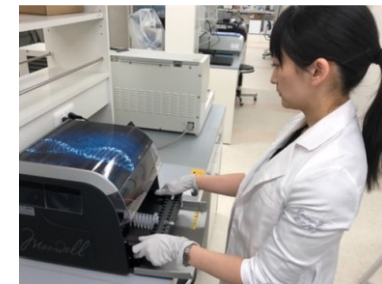
型番	製品名	入数	定価(¥)
機器			
AS4500	Maxwell RSC Instrument (最大16検体同時処理)	1台	2,800,000
AS8500	Maxwell RSC 48 Instrument (最大48検体同時処理)	1台	7,000,000
試薬			
AS1720	Maxwell® RSC FFPE Plus DNA Kit (AS4500およびAS8500共用)	48回	41,000

※表示価格はすべて税別です。



Promega Info

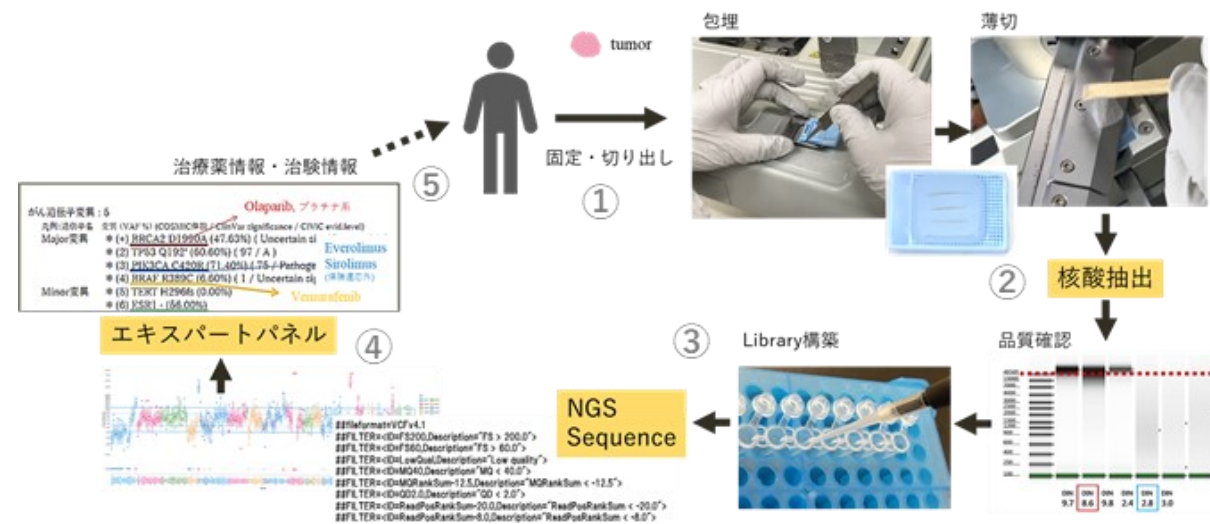
慶應義塾大学 医学部 腫瘍センター ゲノム医療ユニット様



がんゲノム医療におけるFFPEからの核酸抽出の重要性

がんゲノム医療中核拠点病院に実施が求められている保険診療でのがん遺伝子パネル検査は、原発不明がんや希少がんなど、治療方針や治療薬剤の選択が困難な患者や、治療薬剤に耐性となった後に治療選択が困難となった患者のがん細胞の遺伝子を調べ、治療薬剤や治療法を見つける目的で行います。

対象となる患者には「原発不明がん」や「希少がん」、「標準治療がすべて終了した患者」などの多くの条件が定められています。この条件から外れた患者は、検査を受ける場合は自費診療としてがん遺伝子検査を受けることとなります。



- ① 抽出した腫瘍組織からホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを作製
- ② 未染色切片から核酸を抽出し、核酸の品質を確認
- ③ ライブラリーを構築し、NGSでの塩基配列読み取り
- ④ ゲノムプロファイルをもとにエキスパートパネルで推奨治療方針を検討
- ⑤ 薬剤や治験の情報を提供

がんゲノム医療の流れは検査内容の説明、検体準備、シーケンス実施（上図 ①～④）、レポート作成、エキスパートパネル（専門家会議）、結果説明となり、その結果によって治療や治験へのエントリー（上図 ⑤）に進んでいきます。

FFPEから安定したDNAを抽出することは、シーケンス実施のファーストステップであるため、がんゲノム医療の根本となる、大変重要なステップです。

私たち、慶應義塾大学 医学部 腫瘍センター ゲノム医療ユニットでは、この核酸抽出のステップにおいて、プロメガ社のMaxwell RSC Instrumentとその専用抽出試薬であるMaxwell RSC FFPE Plus DNA Kit (カタログ番号 AS1720)を使用しており、これらの製品で得られるDNAを用いて、精度の高いNGSの結果を得ることに成功しています。

本稿では、プロメガ社のMaxwell RSC Instrumentとその専用抽出試薬であるMaxwell RSC FFPE Plus DNA Kit (カタログ番号 AS1720)を中心に、本ユニットにおけるがんゲノム医療における実際のワークフローについて、コツを交えて紹介いたします。



Maxwell® RSC
Instrument
(カタログ番号 AS4500)

お問合せ先

プロメガ株式会社

www.promega.co.jp

TEL. 03-3669-7981 E-mail: PKKIS@promega.com

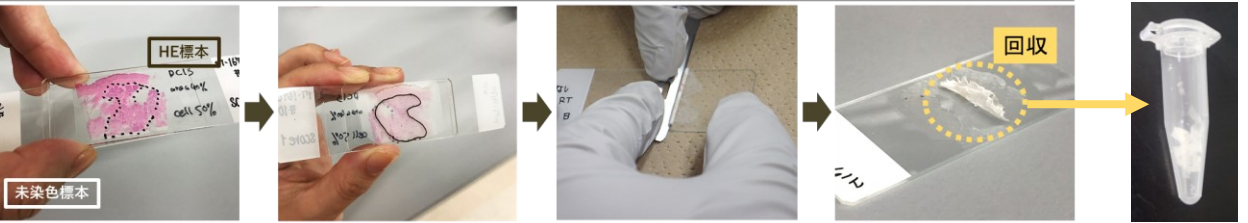
プロメガ株式会社

慶應義塾大学 腫瘍センター ゲノム医療ユニット 様におけるがんパネル検査の実際

手順1. FFPEの回収

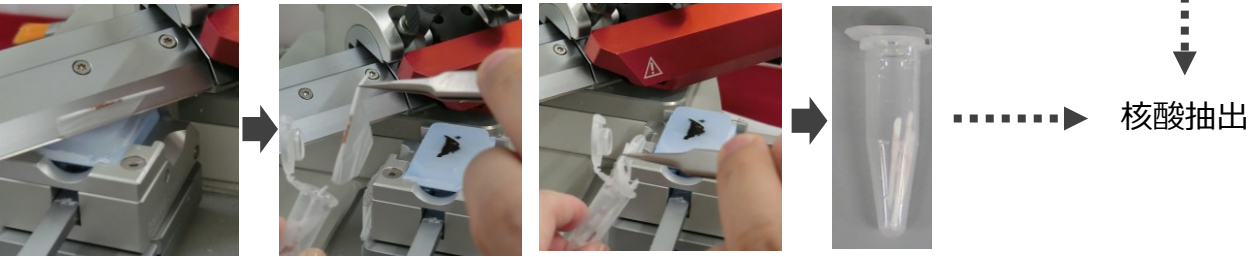
未染色標本から目的部位を剃り刃で削り取る方法、ロール状になった切片を回収する方法、レーザーマイクロダイセクションがあります。いずれの場合も切片を1.5mlまたは2mlの遠心チューブに回収します。

未染色標本からの腫瘍細胞採取例



① HE標本と未染色標本を重ねる ② HE標本のマーキング通りに未染色標本の背面にマーキングする。 ③ マーキング通りに剃り刃で切片を削る。 ④ マイクロチューブに回収する。

ロール状の切片回収例



① 切片を丸めた状態で薄切する ② ロール状態のまま、マイクロチューブに回収する

核酸抽出

手順2. FFPEからの核酸抽出

FFPEをProteinase Kと熱処理で溶解させ、磁性体ビーズを用いて核酸を抽出する工程です。この工程では、Proteinase Kにより組織・細胞を溶解します。しかし、ホルミン固定により生成されたメチレン架橋はProteinase Kで解離しないため、核酸-アミノ酸の架橋が維持されます。このため、熱処理によりメチレン架橋を解離させることで、PCR反応を阻害しない核酸を抽出することが必要です。

ゲノム医療ユニットでの
コツ

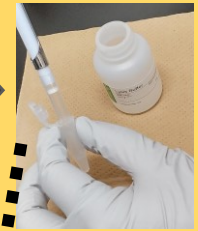
1. パラフィンが効率よく溶解するように、余分なパラフィンは出来る限り排除しておきます。
2. 組織が溶け残らないように、大きなサイズの組織は使用する切片枚数を減らします。
3. 試薬が切片に行き渡るように、切片を回収したマイクロチューブは高速遠心機で遠心して、チューブの底に切片を集めておきます。



FFPEサンプルが入ったマイクロチューブにProteinase K Solution 20μl Incubation Buffer 180μlを加える。



70℃で1時間～overnightでインキュベーション。

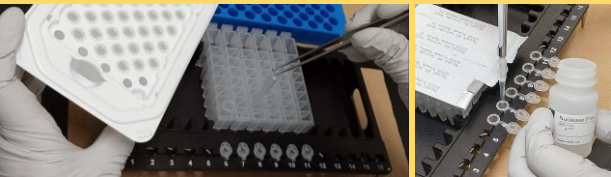


Lysis Buffer 400μlを加えボルテックスにより攪拌する。



全量(約600μl)をカートリッジのウェルに添加する。

【カートリッジの準備】



検体数分のカートリッジを専用トレイに立てアルミシールを剥がす。Elution Tubeをセットし、Nuclease-Free Water 50μlを加える。



約30分で精製完了！

手順3. 精製したDNAの品質チェック

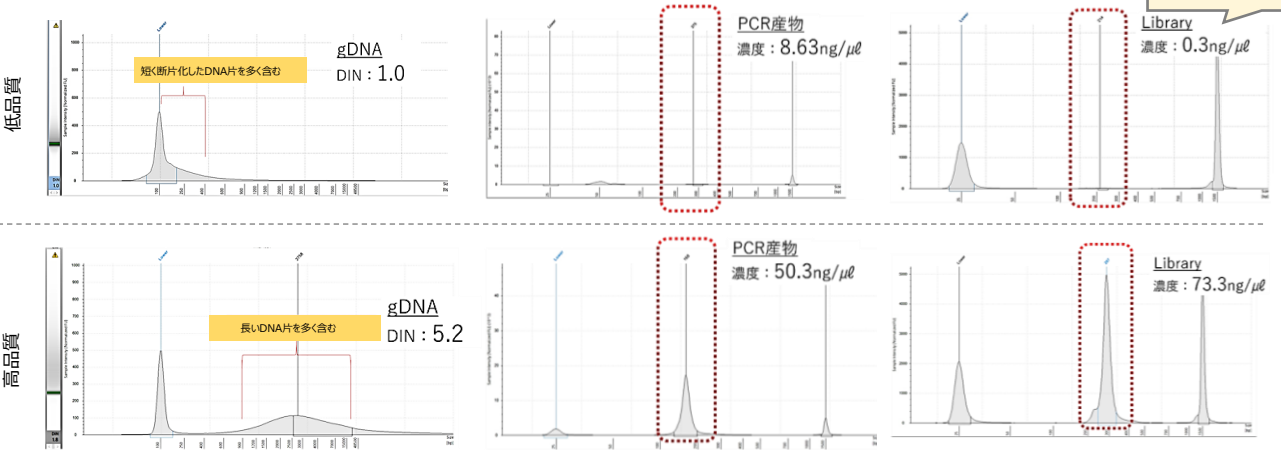
TapeStation (アジレント・テクノロジー株式会社)により、精製したDNAを電気泳動し、収量・分解度を確認します。

必要量のPCR産物を得るには、鋳型となる品質の良いDNAが十分量必要となります。品質不良のDNAではPCR増幅が困難となり、最終的にライブラリーの濃度も低くなります。ライブラリーの濃度が低すぎる場合は、ゲノム解析が困難となります。

ゲノム医療ユニットでの
コツ

DIN 3.0以上、DNA濃度150ng/ulであれば、PleSSionでの解析成功率はほぼ100%

【DNAの品質によるDIN, PCR産物濃度, 最終ライブラリー濃度】



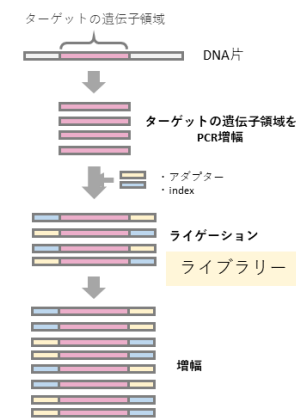
手順4. ライブラリーの構築、NGSでのシーケンス解析

ライブラリー作製は目的の遺伝子をPCR増幅させ精製する方法、目的の遺伝子を取り出し、PCR増幅させる方法などがあります。

アンプリコン法、キャプチャー法で構築したライブラリーの濃度と品質

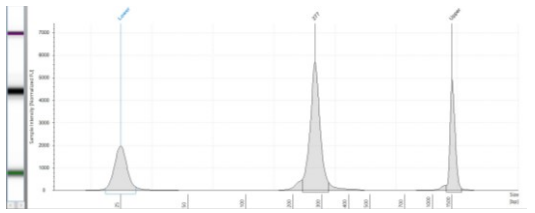
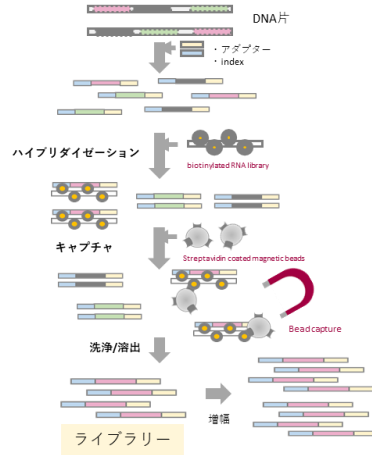
アンプリコン法

目的DNAのPCR増幅からStart



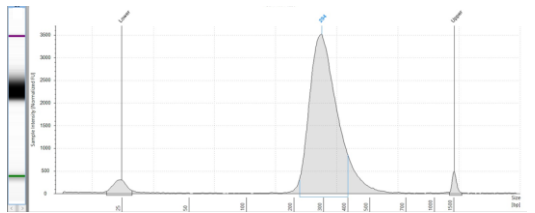
キャプチャー法

目的DNAを取り出すことからStart



アンプリコン法

Conc. (ng/ul)	Peak Molarity (nmol/l)	% Integrated Area
6.52	401	-
14.8	82.1	100.00
(6.50)	6.67	-



キャプチャー法

Conc. (pg/ul)	Peak Molarity (pmol/l)	% Integrated Area
484	29800	-
10500	55000	100.00
(250)	256	-

純度、濃度ともに高く、品質良いのライブラリーが構築できている。

手順5. エキスパートパネル～レポート作成

ゲノム医療ユニットでの
コツ

週2回、molecular tumor board (MTB)を開催し、その中で病理所見、検体の品質やNGSでのランデータ、ゲノム解析データから、1検体ずつの解析結果について話し合い、解析が正しく行われたかを確認しています。

MTBで確認された結果はエキスパートパネルで推奨薬剤や治験情報について話し合い、最終レポートを作成しています。