

Promega Info

山口大学 医学部附属病院 検査部

藤井智大 先生、西岡光昭 先生、
國宗勇希 先生、山崎隆弘 先生、末廣寛 先生

山口大学大学院 医学系研究科 病態検査学講座
湯尻俊昭 先生



ProNex® DNA QC Assayを用いた アンプリコンサイズ比によるDNAの品質管理の実例

~~ DINとの比較による有用性の検証 ~~

FFPEから抽出したDNAの品質を表すために最も使われている指標は、“DIN (DNA Integrity Number)”であり、TapeStationシステム (アジレント・テクノロジー社製)を用いて、DINの測定が行われる。

しかし、この装置は用途が限定されることから、多くの病院病理部において、配備されている事例は少なく、各病院でDINを確認するのは難しいのが現状である。

それに対して、 ΔCt 値 (異なる長さのアンプリコンサイズ「例: 50~100bp程度の短鎖アンプリコンと、100~300bp程度の長鎖アンプリコンなど」から得られるCt値の差)のようなアンプリコンサイズの差異を利用する手法は、有用性は認識されているにも関わらず、各施設での諸条件(プライマー設計・リアルタイムPCR装置・PCR条件など)の多様性からDINと関連した、明確な数値的な指標を得ることが困難である。

今回、山口大学では、ProNex® DNA QC Assayを用いて、DINと相関する比率の明確な数値的な指標を明らかにすることを試み、有用な数値を設定することができた。

お困りごと：

FFPEから抽出したDNAの品質管理(分解度の検定)をしたいが、
DINを測定するためのTapeStationは所持していない



改善成功：

- ✓ 所有のリアルタイムPCRシステムシステム QuantStudio® 5 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)とProNex® QC Assayを使うことで、 ΔCt 値を測定することができた
- ✓ 今回の検討条件では、DINを基準として、解析不可となる ΔCt 値を10.38と設定することができた



ProNex® DNA QC Assay
(プロメガ社製)



QuantStudio® 5
(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)

検討の背景

FFPE検体を用いた分子診断のプレアナリシス段階では、多数の影響因子が知られています(下図参照)。このうち固定プロセスで用いられるホルマリンは、核酸やタンパクに化学的および物理的修飾を引き起こし、検体品質にきわめて大きな影響を与えることが広く知られており、一般社団法人 日本病理学会 監修のゲノム診療用病理組織検体取扱い規程に詳しくガイドラインが著されている。



プレアナリシス段階における核酸品質に影響を与える因子

核酸の品質は、このような多くの因子に影響を受けるにも関わらず、すべての施設で品質管理を行っているとは言えない状況である。その要因のひとつとして、品質管理の指標としてDINが広く使われている現状において、DINを測定するための機器が病院に普及していない、また、DINに代わる指標の基準があいまいであると考えられた。そこで、DINに代わる指標として、汎用性のあるリアルタイム装置で測定できるアンプリコンサイズのCt値の差異に注目し、DINとの比較検討を行いました。



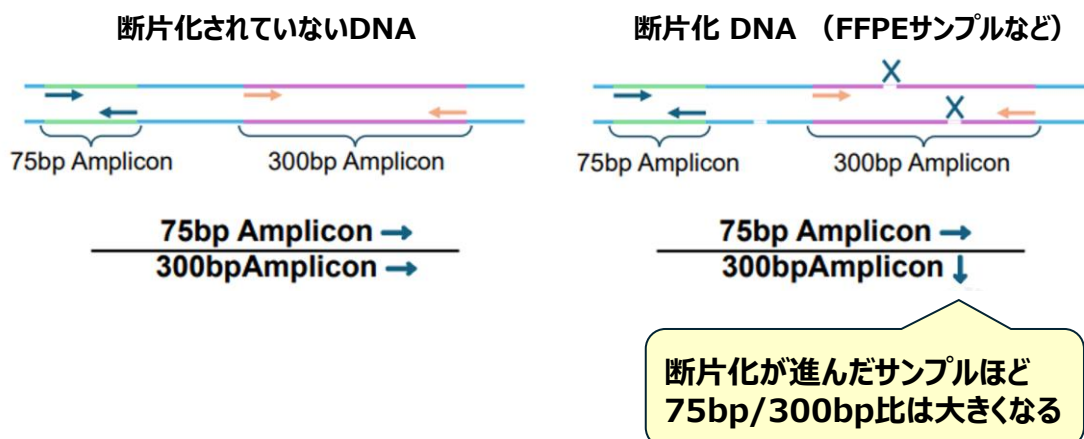
ProNex® DNA QC Assayの特長と仕組み

ProNex® DNA QC Assayは、FFPEサンプルなどから抽出したDNAの量と質を評価するためのアッセイキットである。このアッセイは、マルチプレックスの仕様であり、75bp、150bp、300bpのヒトゲノムDNA配列を増幅することができるプローブベースの定量PCRである。PCR阻害剤の存在下で発生する可能性のある偽陰性を検出するためのInternal Positive Control (IPC)を含む。DNAの分解が進んでいるFFPEの場合、DNAの量を知ることだけでは、NGSやddPCRが成功するかどうかを信頼性をもって予測することはできない。ProNex® DNA QCアッセイを使用することで、サンプル内の増幅可能なDNAの量を特定することができます。

製品名	カタログ番号	対応機種
ProNex DNA QC Assay, ABI 7500/7500FAST	NG1002/NG1003	7500/7500 Fast, QuantStudio 5/6
ProNex DNA QC Assay, BioRad CFX96	NG1004/NG1005	BioRad CFX96

ProNex® DNA QC Assay の測定原理および解釈

- ① TaqMan Probe を用いたリアルタイムPCRにより75bpと300bpを増幅
- ② キット付属の Standard を同時に測定し、検量線からそれぞれの定量値を算出
- ③ 75bp の定量値から、DNA濃度を算出

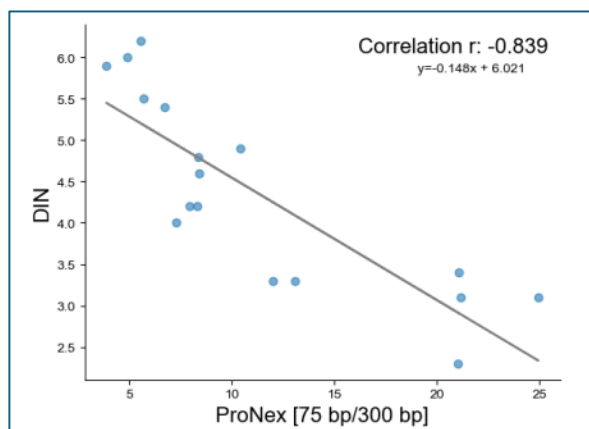


検討項目および結果

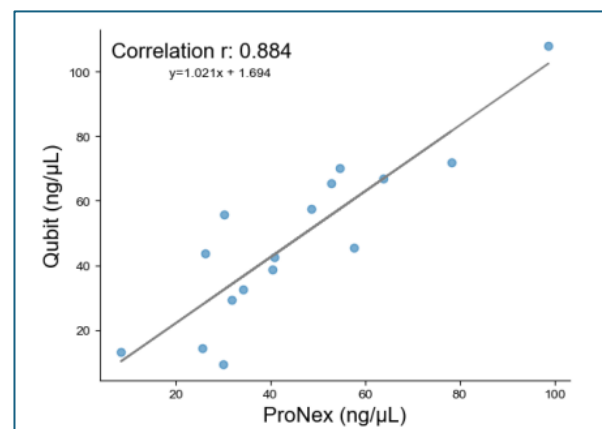
検体	びまん性大細胞型B細胞リンパ腫のFFPE	
検体数	19症例	
DNA精製キット	Maxwell® RSC FFPE Plus DNA Kit (カタログ番号 AS1720)	

検討項目	DNA分解度	
比較対象	機器	4150 TapeStation System
	試薬	Genomic DNA ScreenTape

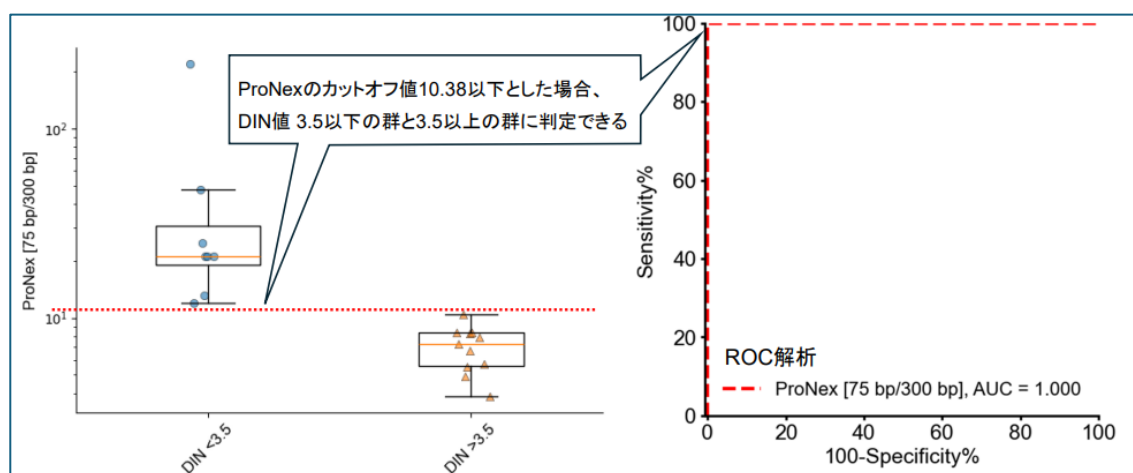
検討項目	DNA濃度測定	
比較対象	機器	Qubit Fluorometer
	試薬	Qubit dsDNA HS Assay Kit



TapeStationとProNexでのDNA分解度の比較



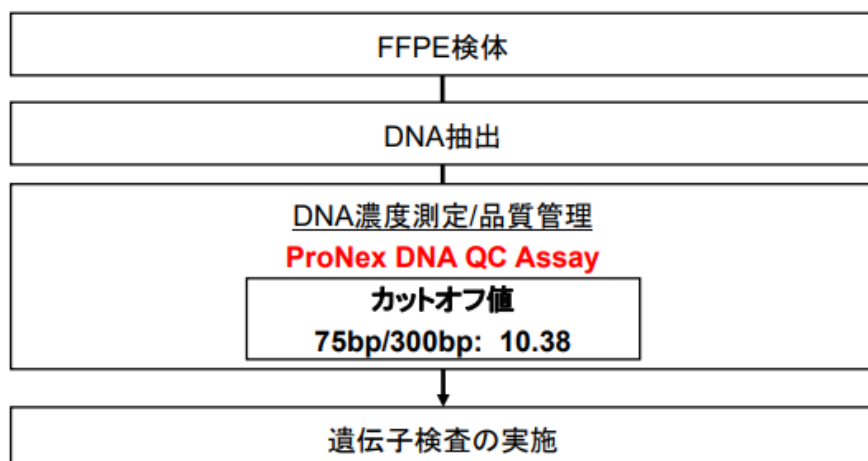
Qubit(蛍光定量)とProNex(定量PCR)でのDNA濃度の比較



※ Morlote D, Janowski KM, Siniard RC, Am. J Clin Pathol. 2019 Jun 5より、今回DIN値 3.5以下を解析不可として定めた

DIN値 3.5を基準として、ProNex®で得られる値 “10.38”を解析不可となるカットオフ値と設定できた

ProNex® DNA QC Assayは、汎用性のあるリアルタイムPCR装置で測定可能であり、最も標準的な手法と同等に、濃度測定と品質評価を同時実施可能なことから以下の検査の流れが実現できる。



各手法の比較および結果のまとめ

試薬	ProNex® QC DNA Assay	Qubit dsDNA HS	Genomic DNA ScreenTape
機器	QuantiStudio® 5	Qubit Fluorometer	4150 TapeStation System
DNA濃度測定	Qubitと同等	○	○
分解度評価	DINと同等	×	○
操作の簡便性	△	○	○
測定時間 ※分注操作を除く	1時間 同時に88検体測定可能	1検体あたり約5分	1検体あたり約2分
機器の汎用性	○	×	×
DNA濃度の測定範囲	3.2pg～50ng/μl	0.1～120ng/μl	10～100ng/μl

ProNex® DNA QC Assay

製品名	カタログ番号	サイズ
ProNex® DNA QC Assay, ABI 7500/7500 FAST	NG1002	200回分
	NG1003	800回分
ProNex® DNA QC Assay, BioRad CFX96	NG1004	200回分
	NG1005	800回分
ProNex® DNA QC Assay, Calibration Kit	NG1001	1キット

Maxwell® RSC 自動核酸精製

製品名	カタログ番号	サイズ
Maxwell® RSC Instrument	AS4500	1台
Maxwell® RSC 48 Instrument	AS8500	1台
Maxwell® RSC FFPE Plus DNA Kit	AS1720	48回分