



FFPE からの DNA 抽出最適化の有用ツール

Agilent 2200 TapeStation: DNA Integrity Number (DIN)

アプリケーションノート

核酸の分析

著者

Christoph Kirsch
MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren,
Germany

Eva Schmidt
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

はじめに

ホルマリン固定/パラフィン包埋 (FFPE) 組織の作製は臨床サンプルの保存、保管に最も広く使用されている手法の 1 つです。通常、FFPE ブロックの切片は病理組織学的解析に用いられ、残りのサンプルは保管されます。これらの保管された FFPE 組織は、遺伝子発現および変異解析の後ろ向き研究にとって価値のある試料です。しかし、FFPE サンプルからの DNA 抽出は困難であることが知られています¹。最も一般的な問題は、組織の処理中や保存中に生じる DNA の架橋および断片化です。組織固定に使用されるホルマリンは核酸とタンパク質の架橋を引き起こすため、DNA は物理的ストレスを受けやすくなり、また、酵素のアクセシビリティが低下します。また、ホルマリンは酸化してギ酸になる場合があり、ギ酸は DNA を脱プリン化し、DNA 鎖切断の原因となります。したがって、固定条件は抽出 DNA の品質に大きな影響を及ぼす可能性があります²。また、DNA 抽出方法は DNA の品質と PCR などのその後のアプリケーションのパフォーマンスにとって極めて重要です³。標準的な DNA 抽出方法では、多くの場合、適切な DNA が少量しか得られません。そのため、FFPE 組織ブロックからの DNA 抽出に特化した抽出方法が開発されました。これらの手順には、FFPE 組織から DNA を遊離するステップに加えて、ホルマリン架橋を元に戻すステップも含まれているため、抽出量が増えるだけでなく、抽出 DNA を用いたアプリケーションのパフォーマンスが向上します。

本アプリケーションノートでは、FFPE 組織から抽出した gDNA の相対的な品質の決定における DNA Integrity Number (DIN) の有用性を紹介します。3 種類の市販 FFPE DNA 抽出キットを使用し、Proteinase K による標準の溶解条件とオーバーナイトでの溶解条件下 (表 1) で、gDNA を抽出しました。Agilent 2200 TapeStation システムと Genomic DNA ScreenTape アッセイを使用して、採取された DNA サンプルの濃度と品質を測定しました。DNA の分解度を数値で表す DIN は、TapeStation Analysis Software (リビジョン A01.05) を使用することで自動的に計算され、ゲルイメージ下とサンプルテーブル内に表示されます。数値評価の範囲は 1~10 であり、高い DIN はほとんど分解されていない gDNA を、低い DIN は分解された gDNA を示します⁴。



Agilent Technologies

表 1. DNA 抽出条件の概要

FFPE DNA 抽出キット	標準プロトコル	長時間溶解プロトコル
A	3時間 (RT)	オーバーナイト (RT)
B	1時間 (56 °C)	オーバーナイト (56 °C)
C	1時間 (56 °C)	オーバーナイト (56 °C)

実験手法

材料

FFPE サンプル、マウス肝臓 (~10- μ m 切片/0.4 × 0.9 cm)、マウス心臓 (~20- μ m 切片/0.4 × 0.1 cm)、およびマウス心臓 (~10- μ m 切片/0.5 × 0.7 cm) は、MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG (Düren, Germany) よりご提供頂きました。メーカーの異なる 3 種類の市販 FFPE DNA 抽出キットを使用しました (ここでは A、B、C とする)。2200 TapeStation システム (G2965AA) と TapeStation Analysis Software (リビジョン A.01.05)、Genomic DNA ScreenTape (5067-5365)、Genomic DNA 試薬キット (5067-5366) をアジレント・テクノロジー (Waldbronn, Germany) から入手しました。

FFPE サンプルからの DNA 抽出

3 種類の DNA 抽出キットを使用して、各メーカーが提供する標準プロトコルに従い、FFPE サンプルから DNA を抽出しました。キットごとに、4 片の FFPE を使用しました。標準プロトコルに加えて、溶解時間を延長したプロトコルで同じ FFPE ブロックから得た切片を処理しました (表 1)。

Agilent 2200 TapeStation システムを使用したゲノム DNA 分析

プロトコルに従って、DNA 分析を実施しました⁵。概要は以下のとおりです。1 μ L の gDNA を 10 μ L の Genomic DNA サンプルバッファと混合しました。Genomic DNA ScreenTape、フィルタ付き Loading Tips、調整済みサンプルを、2200 TapeStation 装置にセットしました。2200 TapeStation システムは、サンプルのロード、電気泳動、イメージングを実行し、デジタル分析した結果を自動的に示しました。

結果と考察

抽出 DNA の量および品質に対する、DNA 抽出方法と組織による影響を比較するため、3 種類の市販 DNA 抽出キットで抽出した 3 種類のマウス組織 (心臓、肝臓、心臓) を用いて実験を行いました。同一条件下で FFPE ブロックを作製することにより、ホルマリン固定とパラフィン包埋の条件の違いによる影響を除外できるようにしました。3 種類すべての抽出キットで、DNA 抽出量を増やす方法として、Proteinase K での長時間のインキュベーションが示されていました。標準条件に加え、オーバーナイトでの Proteinase K インキュベーションによる長時間溶解プロトコルを使用し、同じ FFPE ブロックから取得した切片を処理しました (表 1)。

図 1 は、3 種類の DNA 抽出キットを使用して、マウス心臓 FFPE 組織から DNA を抽出した結果をまとめたものです。DNA 抽出キット A で抽出された gDNA の分析で得られたエレクトロフェログラムが、標準プロトコルとオーバーナイトでの溶解プロトコルの間で最大の違いを示しました。DNA 抽出キット B では、標準プロトコルとオーバーナイトでの溶解プロトコルの間の違いはほとんどありませんでした。

3 種類の DNA 抽出キットから得られたエレクトロフェログラムを比較すると、全体的なプロファイルに明確な違いが示されます (図 1)。キット A で抽出された DNA サンプルの分析では、多少の分解物と明確な gDNA のピークがエレクトロフェログラムで示され、高い DIN に反映されています。対して、キット C で抽出された DNA は、gDNA 分解度の高い、広く分散したスミアなエレクトロフェログラムが得られました。幅広く分散したスミアピークという特徴は、抽出過程での DNA 架橋の除去が不十分であることと関連があり、FFPE 組織から DNA を調製する際の問題点として知られています²。

図 2 では、心臓、肝臓、心臓の FFPE 組織に対して 3 種類のキットで抽出した DNA の濃度を比較しています。新鮮な組織や細胞と比べた場合、FFPE 組織からの DNA 抽出量は相

対的に少ないことが予想されます。特に、心臓組織から抽出された DNA は非常に少量でした。心臓などの線維性組織からの DNA 抽出は、その他の組織よりも難易度が高くなります。心臓など、核酸および核酸分解酵素の多い組織も核酸抽出が難しいことが知られていますが、このケースでは良好な結果が得られました。

図 2 に示すように、DNA 抽出量は、組織、DNA 抽出方法、溶解条件によって異なりました。マウス心臓組織から抽出された DNA 濃度は、3 つの DNA 抽出キットのすべてで、Genomic DNA ScreenTape アッセイの定量範囲を下回りました。マウス肝臓組織の場合、最大の抽出量を達成したのは DNA 抽出キット A および B です。マウス心臓組織では、DNA 抽出キット A および B でオーバーナイト溶解をした場合に最大量が得られました。これは、DNA 量を多く得るには、DNA 抽出時にそれぞれの組織の種類ごとにインキュベーション時間と必要な出発材料の量を最適化する必要があることを示します。

DNA が高度に分解されている場合、定量値のみで DNA 抽出を評価することは判断を誤る可能性があります。このため、TapeStation で自動的に決定される DIN を使用して、サンプルの DNA 分解度を測定しました (図 3)。

最も高い品質の DNA を得たのは、対象組織に関係なく、DNA 抽出キット A でオーバーナイト溶解処理した場合でした。また、DNA 抽出キット B も優れた品質の DNA が得られ、肝臓組織と心臓組織間においては、標準プロトコルと長時間溶解プロトコル間での違いはありませんでした。心臓の FFPE 組織から抽出した DNA では、DNA 濃度が Genomic DNA ScreenTape アッセイの定量範囲 (10 ng/ μ L) に達しておらず、大半のサンプルは DIN の推奨濃度範囲 (5 ng/ μ L) にも達していませんでした。DNA 濃度が 3 ng/ μ L 未満である場合、ソフトウェアは DIN を測定できません⁴。

長時間の Proteinase K 溶解により、DNA 抽出キット A で抽出した DNA の品質はわずかに向上しましたが、DNA 抽出キット B を使用した場合には効果が見られず、DNA 抽出キット C を使用した場合は、肝臓組織とひ臓組織に対して DNA の品質が低下しました。

要約すると、DNA 抽出を最適化するためには、DNA 抽出量のみではなく、DNA の分解度も考慮して、総合的な DNA 品質を評価することが重要です。

結論

ここで提示したデータから、組織の種類は、FFPE 組織からの抽出効率に大きな影響を与える可能性があることが分かります。また、DNA 抽出方法と溶解条件は DNA 抽出量とサンプルの分解度に影響を及ぼすため、総合的な DNA 品質に影響します。したがって、アプリケーションの必要条件によっては、最大の抽出量と最高の DNA 品質を得るために、DNA 抽出方法を最適化する必要があります。本アプリケーションノートは、Agilent 2200 TapeStation システムを用いた Genomic DNA ScreenTape アッセイと DIN が、定量とサンプル分解度の自動評価を通じて、DNA 抽出の品質管理において有益で信頼性の高いツールとなることを示しています。DIN は自動的に表示されるため、ユーザーの経験に基づく主観的な分解度の判断や、見積もりは必要ありません。さらに、DIN が決まることでラボ間での DNA 品質の比較も容易になります。

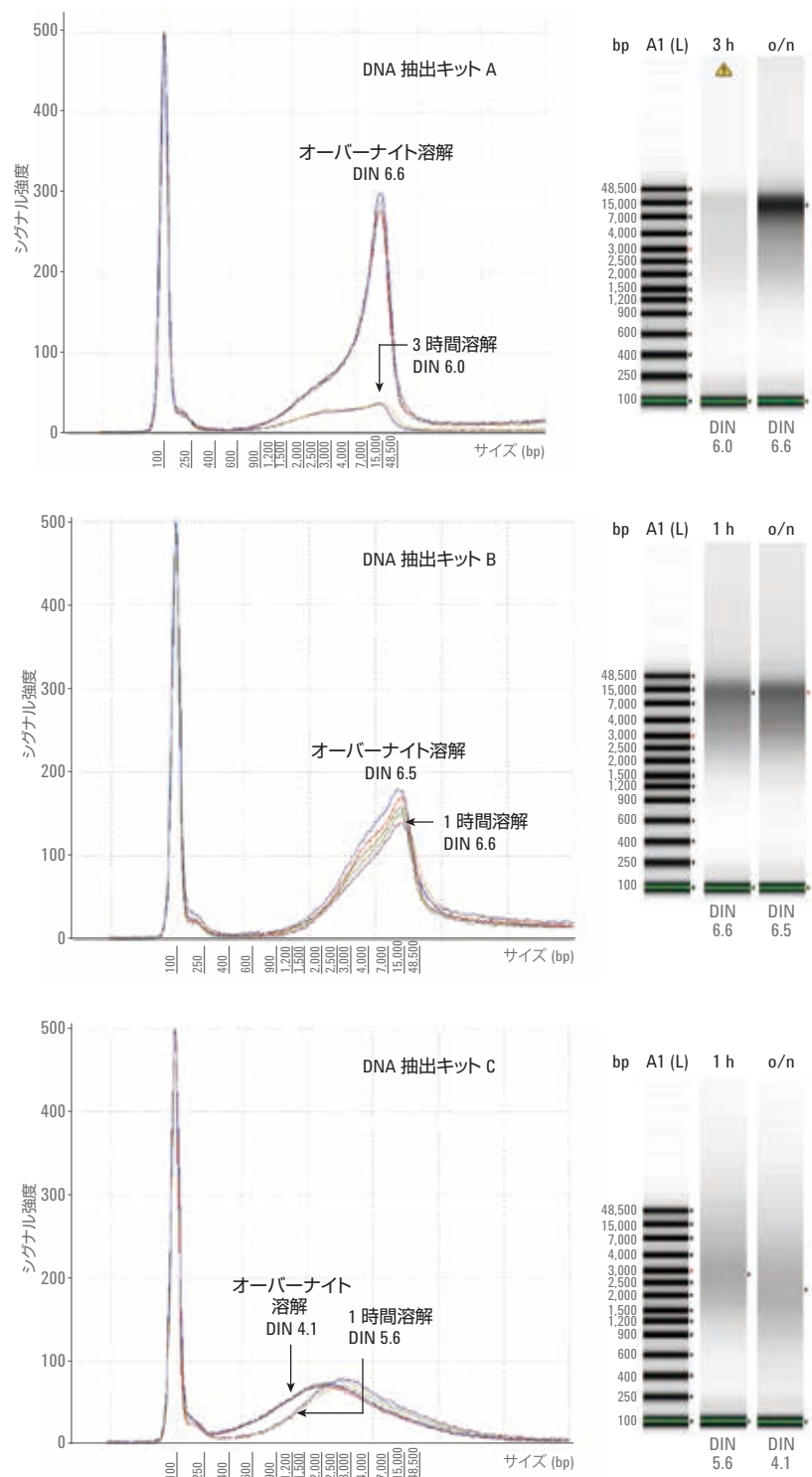


図 1.3 種類の DNA 抽出キットを使用して、マウスひ臓 FFPE 組織から抽出した DNA。Agilent 2200 TapeStation システムと Genomic DNA ScreenTape アッセイを使用した分析後に得られた 6 つのエレクトロフェログラムを重ねて表示し、平均の DIN (n = 3) を示しています。ゲルイメージは、標準プロトコルと長時間溶解プロトコルに対する代表的なサンプルを示しています。Genomic DNA ScreenTape アッセイの定量範囲 (10 ~ 100 ng/μL) 外のサンプルに対しては、ゲルイメージに黄色のアラートアイコンが表示されています。

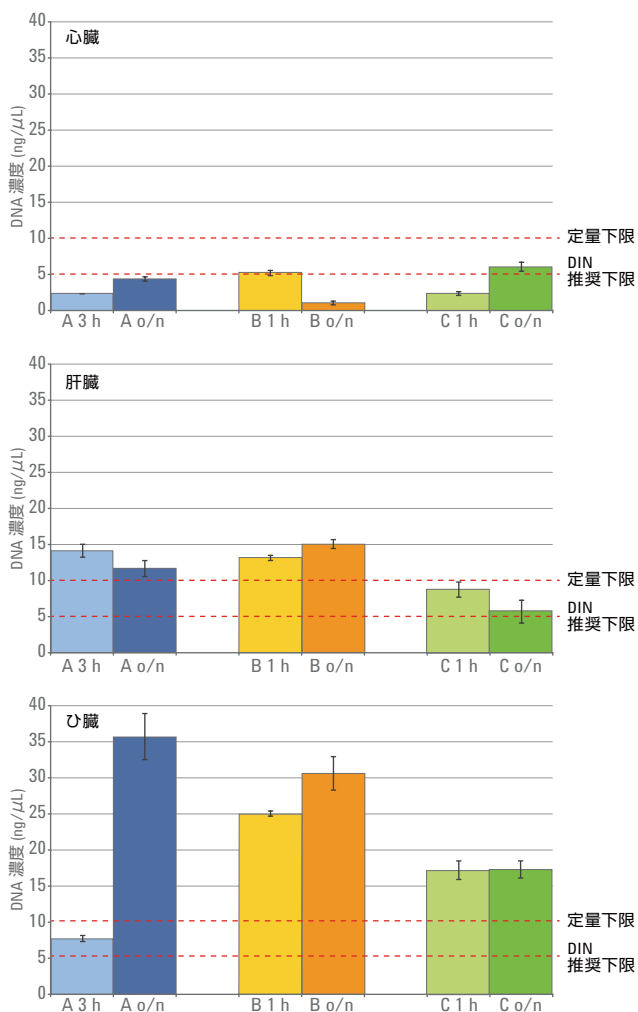


図 2.3 種類の DNA 抽出キット、A、B、C で標準プロトコルと長時間溶解プロトコルを用い、マウスの心臓、肝臓、ひ臓の FFPE 組織から抽出された DNA サンプルに対して、Agilent 2200 TapeStation システムと Genomic DNA ScreenTape アッセイを使用して、DNA 濃度を決定しました (データポイントごとに、n = 3)。Genomic DNA アッセイの定量下限 (10 ng/μL) と DIN 推奨濃度下限 (5 ng/μL) を赤線で示しています。

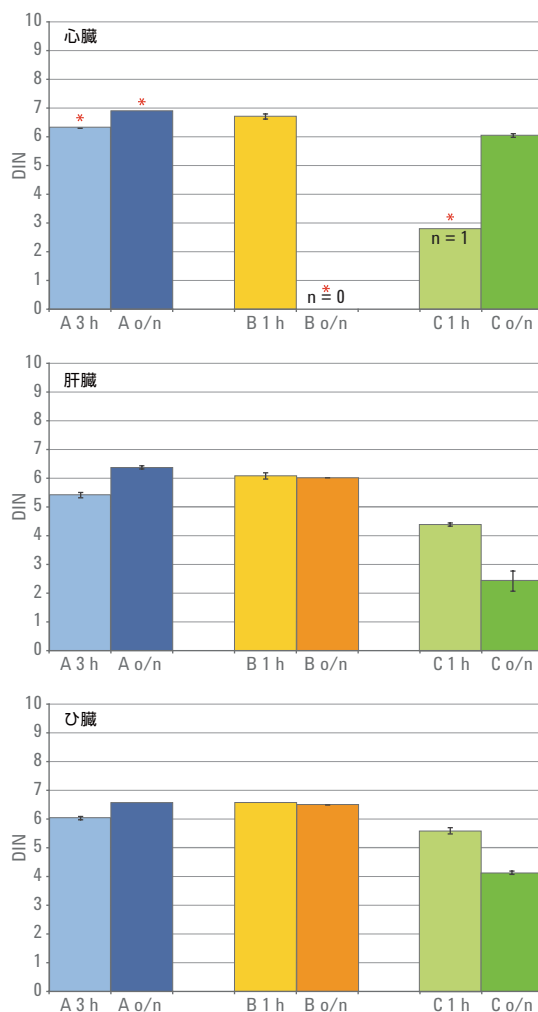


図 3.3 種類の DNA 抽出キット、A、B、C で標準プロトコルと長時間溶解プロトコルを用いて、マウスの心臓、肝臓、ひ臓の FFPE 組織から抽出された DNA サンプルに対して、Agilent 2200 TapeStation システムを使用して、DIN を決定しました (特に指定のない限り、データポイントごとに、n = 3)。赤色のアスタリスクは、サンプルの DNA 濃度が、DIN を決定するために必要な推奨濃度範囲を下回っていることを示しています。

参考文献

1. Tang, W; et al. DNA Extraction from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue. Cold Spring Harbor Protocols. doi:10.1101/pdb.prot5138, **2009**.
2. Srinivasan, M; Sedmak, D; Jewell, S. Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. Am. J. Pathol. **2002**, 161(6), pp 1961-1971.
3. Okello, J. B. A; et al. Comparison of methods in the recovery of nucleic acids from archival formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues. Analytical Biochemistry **2010**, 400(1) pp 110-117.
4. DNA Integrity Number (DIN) with the Agilent 2200 TapeStation System & Genomic DNA ScreenTape, Agilent Technologies, publication number G5991-5258, **2014**.
5. Agilent Genomic DNA ScreenTape System Quick Guide, Agilent Technologies, publication number G2964-90040 rev.C, **2014**.

www.agilent.com/chem/jp

本資料に記載の情報は、予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2014
Published in Japan, November 1, 2014
5991-5246JAJP



Agilent Technologies