

Nucleic acid isolation

MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitを用いた
大容量RNA連続抽出ワークフローにおける
潜在的コンタミネーションの評価

目的

Thermo Scientific™ KingFisher™ Flex 96DW (ディープウェル) プレートヘッドは、Thermo Scientific™ KingFisher™ 核酸・タンパク質・細胞自動抽出・精製装置における最大1,000 µLの処理容量を保証しています。また、Applied Biosystems™ MagMAX™ FFPE DNA/RNA Ultra Kitは、KingFisherシステムでホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片から核酸を抽出する大容量連続抽出ワークフローに適した化学反応と最適化されたスクリプトを備えています。

1切片のFFPE切片から大容量のDNA/RNA連続抽出を行う目的で、RNA抽出ステップでの総処理容量が1,000 µLを上回るワークフローが開発されました。このFFPE DNA/RNA連続抽出ワークフローの第1段階にあたるDNA抽出工程におけるサンプルプレートの処理容量を表1に示します。DNAの抽出後は、新たな切片を作成したりサンプルを追加したりすることなく、そのまま同じサンプルプレートを使用してRNAの抽出に移ります。表2には、当該ワークフローのRNA抽出工程におけるサンプルプレートの処理容量を示します。このように総処理容量が1,000 µLを超える場合、大容量連続抽出プロトコルを実施中のKingFisherシステム内での試薬移動に由来するコンタミネーションについてリスク評価が必要となります。

表1. 40 µmを超える切片からの大容量連続抽出ワークフローのDNA抽出工程におけるサンプルプレート処理容量

内訳	容量
DNA結合液 (結合バッファーおよびビーズ)	270 µL
プロテアーゼ処理済みFFPEサンプル	200 µL
総容量	470 µL

表2. 40 µmを超える切片からの大容量連続抽出ワークフローのRNA抽出工程におけるサンプルプレート処理容量

内訳	容量
DNA結合液 (残りの結合バッファー)	250 µL
プロテアーゼ処理済みFFPEサンプル	200 µL
核酸結合ビーズ	20 µL
RNA結合バッファー	650 µL
総容量	1,120 µL

そこで、表2に示した処理容量と試薬を用いてThermo Scientific™ KingFisher™ Flexシステム上でFFPE切片からRNAを抽出する大容量連続抽出処理を実施し、クロスコンタミネーションのリスクを評価しました。細心の注意を払った実験アプローチを通してクロスコンタミネーションの評価を行った結果、KingFisher FlexシステムとMagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitを最新のバリデート済み最適化スクリプトおよびワークフローと組み合わせた連続抽出法は、クロスコンタミネーションのリスクが低いというデータが得られました。

方法

ポジティブサンプルの四方をネガティブ抽出コントロール (NEC) で囲んだチェッカーボードレイアウト (図 1A) を用いて、96DW プレート内でのサンプルや試薬の動向を特定しました。ウェルからウェルへの試薬移動を確実に特定できるように、高力価の混合インフルエンザウイルス (濃度約 8×10^{11} コピー/mL) をターゲットサンプルに選択し、大容量連続抽出プロトコルにかけました。抽出後の qPCR 解析には、Applied Biosystems™ VetMAX™-Plus Multiplex One Step RT-PCR Kit の各種試薬と Applied Biosystems™ QuantStudio™ 7 Flex リアルタイム PCR システムを用いました。PCR 用の 384 ウェルプレートへの抽出サンプルの配置には、ダブルチェッカーボードパターンを採用しました。このレイアウトでは、抽

出した核酸を含む反応液はすべて、ヌクレアーゼフリー水と VetMAX-Plus PCR 試薬のみからなるネガティブテンプレートコントロール (NTC) で四方を囲まれた配置となっています (図 1B)。このアプローチでは、NTC や NEC に増幅がみられるか否かを基にワークフロー内でのコンタミネーションの可能性を判定できます。増幅がみられた NEC はすべてトリPLICATE で再反応を行い、抽出段階でコンタミネーションがない状態を維持できていたかどうかを確認しました。KingFisher Flex システム 3 台で計 3 回の処理を実行し、KingFisher システム上での試薬移動によって生じ得る潜在的なコンタミネーション 252 件を評価しました。

A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					オレンジ						オレンジ	
B		オレンジ						オレンジ				
C												
D					オレンジ						オレンジ	
E		オレンジ						オレンジ				
F												
G					オレンジ						オレンジ	
H		オレンジ						オレンジ				

各ウェルの内容	
	ネガティブ抽出コントロール (NEC): PBS
オレンジ	人為的インフルエンザウイルスサンプル
青	ネガティブテンプレートコントロール (NTC): 水

B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A		青		青		青		青	オレンジ		青		青		青		青		青		オレンジ		青	
B	青		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青	
C		青	オレンジ		青		青		青		青		青		青	オレンジ		青		青		青		青
D	青		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青	
E		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青
F	青		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青	
G		青		青		青		青	オレンジ		青		青		青		青		青		青		青	
H	青		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青	
I		青	オレンジ		青		青		青		青		青		青	オレンジ		青		青		青		青
J	青		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青	
K		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青
L	青		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青	
M		青		青		青		青	オレンジ		青		青		青		青		青		青		青	
N	青		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青	
O		青	オレンジ		青		青		青		青		青		青	オレンジ		青		青		青		青
P	青		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青		青	

図1. MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kit、インフルエンザウイルスターゲット、VetMAX-Plus Multiplex One Step RT-PCR マスターミックスを用いた連続抽出 (A) 抽出プレートのレイアウト。低密度チェッカーボードレイアウトに基づいて 8×10^{11} コピー/mL の高力価 (C_t : 約 10) インフルエンザウイルス (オレンジ) を配置しました。(B) PCRプレートのレイアウト。ダブルチェッカーボードレイアウトを用いて、抽出処理によるコンタミネーションと qPCR 処理によるコンタミネーションを分けて評価できるようにしました。抽出サンプル (白、オレンジ) の四方を囲むウェルには NTC (青) を注入しました。NEC (白) の組成は PBS のみです。

結果

潜在的コンタミネーション252件中2件が、RNA連続抽出ワークフローの抽出処理に由来するコンタミネーションと特定されました。図2に、ダブルチェッカーボード評価アプローチによる3つのシステムのEDSファイルから得られた増幅プロット(ΔRn とサイクル数)を示します。コンタミネーションが疑われた溶出液を対象として、再反応による確定qPCRをトリPLICATEで実施しました。この確定qPCRの結果、1件のコンタミネーションが疑われた(KingFisher Flexシステム#1)3回の再反応すべてが陰性であったことから、抽出ではなくqPCR由来であることが判明しました。もう1件のコンタミネーションが疑われた(KingFisher Flexシステム#3)3回の再反応中2回は増幅がみられなかったものの1回に若干の低レベル増幅が認められたことから、抽出処理によるコンタミネーションの可能性が示

唆されました。確定qPCRを3回行って1回のみが増幅がみられたことから、この増幅はqPCR用の384ウェルプレートのセットアップ時に生じたユーザーもしくはピペットによるコンタミネーションである可能性も否定できません。しかしながら(ユーザーエラーが疑われるとはいえ)、当該抽出サンプルは抽出に由来するコンタミネーションあり(真陽性)として扱うことにしました。以上から、最終的に252件の潜在的コンタミネーション中1件にコンタミネーションが認められ(コンタミネーション率0.4%未満)、最適化された抽出スクリプト(A31881_FLEX_large_vol_RNA_script)と最新の業者推奨容量を用いた大容量RNA連続抽出ワークフローは、KingFisher Flexシステム上でのウェル内容物の移動に由来する潜在的なコンタミネーションの発生リスクが低いという結論に至りました。

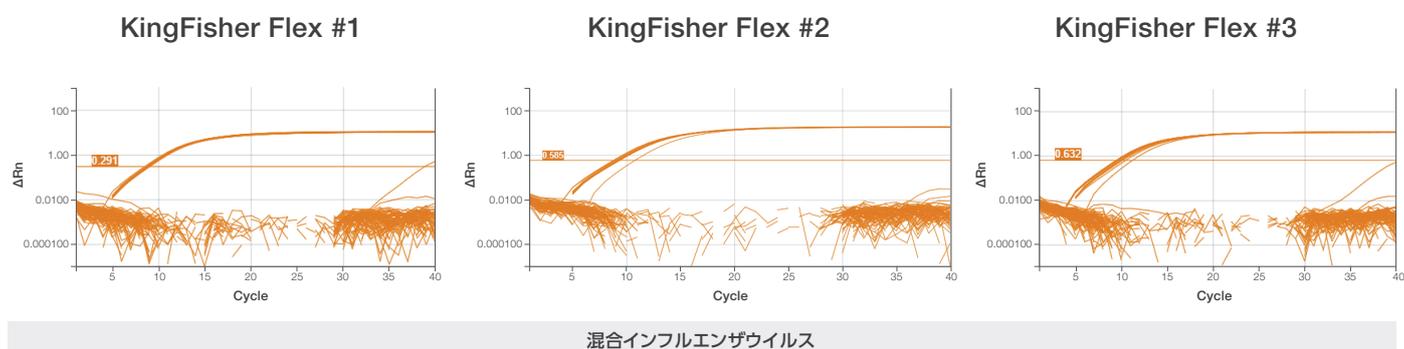


図2. KingFisher Flexシステムのプロートセットアップにおける潜在的クロスコンタミネーションの評価 3台のKingFisher Flexシステムで処理した252サンプルにおけるコンタミネーション率は0.4未満でした。MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitユーザーガイド(文書番号:MAN0017541)に掲載されているRNA抽出法(連続DNA/RNA抽出法)を使用しました。

結論

本評価データによって、MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitを用いた最新の大容量ワークフローはコンタミネーションリスクが低いことを確認できました。FFPEサンプルからのDNAおよびRNAの連続抽出に当該ワークフローと試薬を用いると、サンプルプレート内での総処理容量が1,000 μ Lを超える大容量処理であってもクロスコンタミネーションのリスクは低く抑えられます。今回評価したワークフロー、処理容量、ならびにスクリプトは、MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra KitとKingFisherシステムを用いて再現性の高い高品質DNA/RNA連続抽出を実現できるように開発・最適化されたものです。バリデートされていないワークフローや試薬を用いて推奨容量を超える処理を行うことは推奨できず、注意が必要です。

著者

Lillie Manley, Michelle Leija
サーモフィッシャーサイエンティフィック(テキサス州オースティン)所属

Ordering information

製品名	製品番号
MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kit	A31881
KingFisher Flex 96 DWプレートヘッド ヒートブロック含む	5400630

詳細はこちらをご覧ください thermofisher.com/magmaxffpe

研究用에만使用できます。診断用には使用いただけません。
© 2023 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.
実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。
価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。
標準販売条件はこちらをご覧ください。 thermofisher.com/jp-tc SPA051-A23120B

サーモフィッシャーサイエンティフィック
ライフテクノロジーズジャパン株式会社

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ jptech@thermofisher.com
オーダーサポート TEL: 03-6832-6980 FAX: 03-6832-9584
営業部 TEL: 03-6832-9300 FAX: 03-6832-9580

facebook.com/ThermoFisherJapan [@ThermoFisherJP](https://twitter.com/ThermoFisherJP)

thermofisher.com

applied biosystems