

# MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kit

## はじめに

がんの検出および治療管理に関わる研究では、迅速かつ正確ながんゲノム解析が強く求められます。しかしながら、がん臨床研究用サンプルには、病理組織学的検査と組織保存のためのホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 処理が常態化しています。FFPE 法は組織の保護と長期保管を可能にしますが、化学反応による過剰な架橋が核酸に生じることにより、次世代シーケンシング (NGS) などのダウンストリームのアプリケーションに向けた処理が複雑になることがあります。

Applied Biosystems™ MagMAX™ FFPE DNA/RNA Ultra Kit は、FFPE サンプルからの迅速かつ信頼性の高い核酸分離を可能にします。本製品は単一のワークフローで同一サンプルから DNA と RNA を連続的に別々に抽出し、多様なサンプル解析に対応できます。さらに、手作業で処理することも、最大 96 サンプルを同時処理できるオープンソースロボティクスを用いた自動化システムで処理することも可能です。磁気ビーズを用いたプロトコルやビーズ上でのヌクレアーゼ処理によってサンプルロスを軽減でき、小さな組織標本や限られた組織標本の解析に理想的なキットともいえます。また、毒性が低くドラフトチャンバーなしで使用できる、キシレンに代わる脱パラフィン剤である CitriSolv™ とも適合性があります。

MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kit は、固形がん切除片、コア針生検、細針穿刺といった複数の臨床研究サンプルタイプに対してバリデート済みです。本キットを用いると、わずか 5 μm の FFPE 切片 1 枚から核酸を分離でき、その抽出量や品質は磁気ビーズやスピンカラムを用いる他の市販キットと同等なうえに、主要他社キットの使用時と比べてハンズオン時間を約 40% 節約できます。たとえ 25 年以上保存された FFPE 組織からであろうと、MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kit を用いて分離し



た DNA、RNA および microRNA (miRNA) は、qPCR や、Agilent Bioanalyzer™ システムを用いた解析、NGS などのダウンストリームの分子アプリケーションに適した形で利用できます。

本アプリケーションノートでは、MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kit を用いて、5~40 μm のヒト FFPE 組織切片から手動操作または自動処理プロトコル (Thermo Scientific™ KingFisher™ シリーズ核酸・タンパク質・細胞自動抽出・精製装置) で DNA と RNA を抽出するプロセスをご紹介します。固形がん切除片、コア針生検、細針穿刺など複数タイプの FFPE サンプルからの核酸抽出を検証し、核酸抽出量、品質、実用性が Ion Torrent™ NGS シーケンシングなどのダウンストリームアプリケーションに適しているかどうかを評価しました。

## 方法

FFPEサンプルからの核酸分離ワークフローの各ステップを図1に示します。最初にFFPEサンプルを脱パラフィン化した後、プロテイナーゼK溶液でタンパク質を分解させました。MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitを用いた抽出プロセスは、マイクロ遠心管を用いて手動で行うか、Thermo Scientific™ KingFisher™ Duo PrimeまたはThermo Scientific™ KingFisher™ Flexシステム上で自動的に行いました。核酸の定量には、Invitrogen™ Quant-iT™ dsDNAアッセイキットとInvitrogen™ Quant-iT™ RNAアッセイキット、96ウェル対応マイクロプレートリーダーを用いました。

qPCR解析のために、サンプルをInvitrogen™ SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kitを用いて逆転写した後、Applied Biosystems™ TaqMan™ Gene Expression Assayを用いて行いました。miRNA解析では、Applied Biosystems™ TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kitを用いてRNAサンプルを逆転写した後、Applied Biosystems™ TaqMan™ MicroRNAアッセイを行いました。また、サンプルをApplied Biosystems™ 7900HT FastリアルタイムPCRシステムにかけてC<sub>t</sub>値を自動測定しました。

NGSへの適性を確認するため、MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitまたは市販のカラムベースの抽出キットを用いてFFPE組織サンプルから核酸を抽出しました。両キットともに、FFPE連続組織切片からDNAとRNAを2回ずつ分離しました。他社キットを用いるサンプルはキットのプロトコルに従ってカラム上で手動処理し、MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitを用いるサンプルはKingFisher Flexシステム(96ディープウェルヘッド)で処理しました。

## ライブラリーの調製とシーケンシング

Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0と、Ion Torrent™ Oncomine™ Focus AssayパネルまたはIon AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2とRNA Cancer Panelを用いて、10 ngのDNA/RNAインプットからNGSライブラリーを調製しました。Ion Chef™ システムでテンプレートを作成した後、Ion PGM™ システムでシーケンスしました。データ解析とパネル評価遺伝子の検出には、Torrent Suite™ ソフトウェアやIon Reporter™ ソフトウェアに搭載されたカバレッジ解析プラグインTorrent Variant Callerを用いました。

## 結果と結論

### 回収率と再現性

核酸回収の再現性を検証するため、FFPE保存組織をMagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitと市販のカラムを用いて処理し、全てのサンプルを等量(50 μL)溶液に溶出したうえで、Quant-iT dsDNAアッセイキットとRNAアッセイキットを用いて定量したところ、MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitは、他社キットと同等またはそれ以上のDNA量およびRNA量を一貫して精製できました(図2)。さらに、MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitを用いたサンプル処理をKingFisher Flexシステムで自動化すると、市販のカラムを用いた手作業での分離操作と比べてハンズオン時間を約40%節約できました。

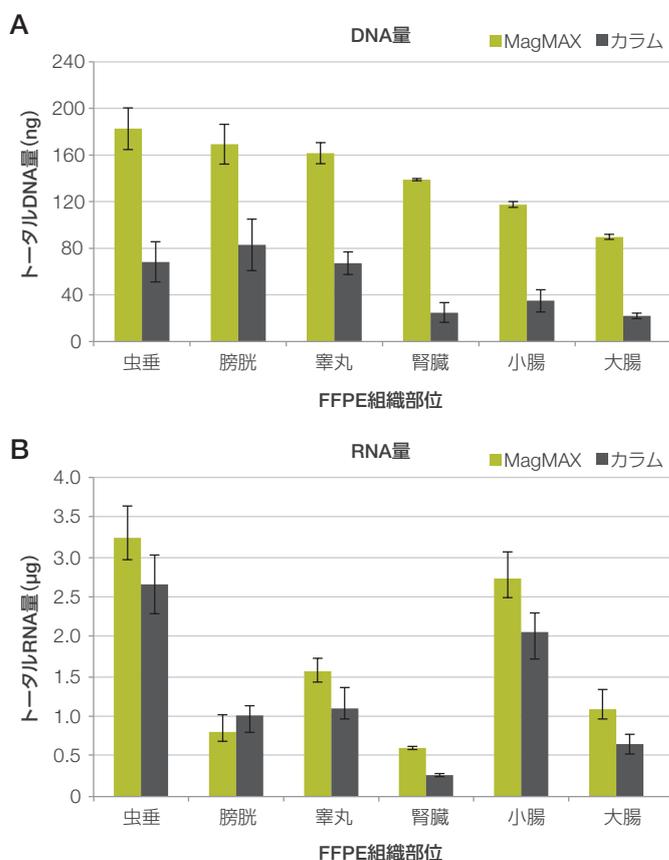


図2. 核酸回収の再現性 MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitまたは市販のカラムベースキット(カラム)を用いてFFPE組織(1981~2004年に包埋処理)から抽出した。(A) DNA量および(B) RNA量



図1. MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitを用いたサンプル抽出およびシーケンシングのワークフロー

抽出した核酸がダウンストリームのアプリケーションに適しているか否かを確認するため、リアルタイムPCR解析を実施しました。SuperScript VILO cDNA Synthesis Kitを用いてRNAサンプルを逆転写し、7900HT FastリアルタイムPCRシステム上で*GAPDH*遺伝子(アンプリコン長93 bp)用のTaqMan Gene Expression Assayを用いて、全サンプル同一インプット量に対するqPCR解析を行いました。MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitを用いて抽出したRNAサンプルは、市販のカラムを用いた抽出サンプルより一貫して低い $C_t$ 値を示しました(図3)。

### 脱パラフィン剤

核酸抽出前に行うFFPEサンプルの脱パラフィン処理には、従来、キシレンが使用されてきました。キシレンは組織片からパラフィンワックスを効率的に除去しますが、安全な取り扱いにはドラフトチャンバーが必要です。そこで、キシレンより毒性の低い脱パラフィン剤であるCitriSolvクリアリング剤とMagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitの適合性を確認しました。3つの異なるFFPEサンプルから10  $\mu\text{m}$ の連続片を切り出し、キシレンまたはCitriSolv液で脱パラフィン化しました。サンプルを脱パラフィン後、タンパク質を分解させ、KingFisher Flexシステム(96ディープウェルヘッド)で核酸を自動抽出し、抽出したDNA量およびRNA量をQuant-iT dsDNAアッセイキットとQuant-iT RNAアッセイキットを用いて定量しました(図4)。

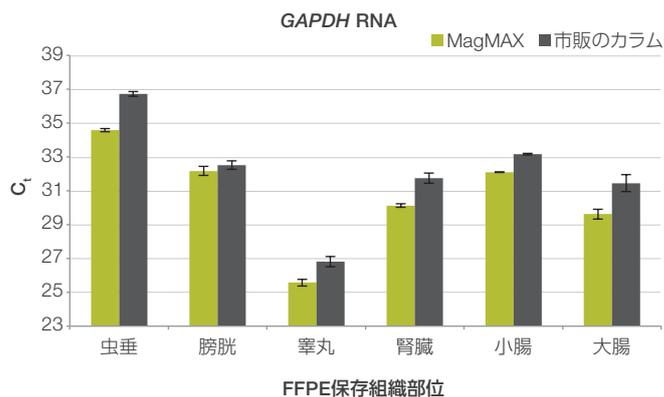


図3. RNAサンプルのリアルタイムPCR解析 FFPE組織片から抽出したRNAの*GAPDH*遺伝子を解析したところ、MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitで抽出したRNAの方が市販のカラムで分離したRNAよりも一貫して低い $C_t$ 値を示した。

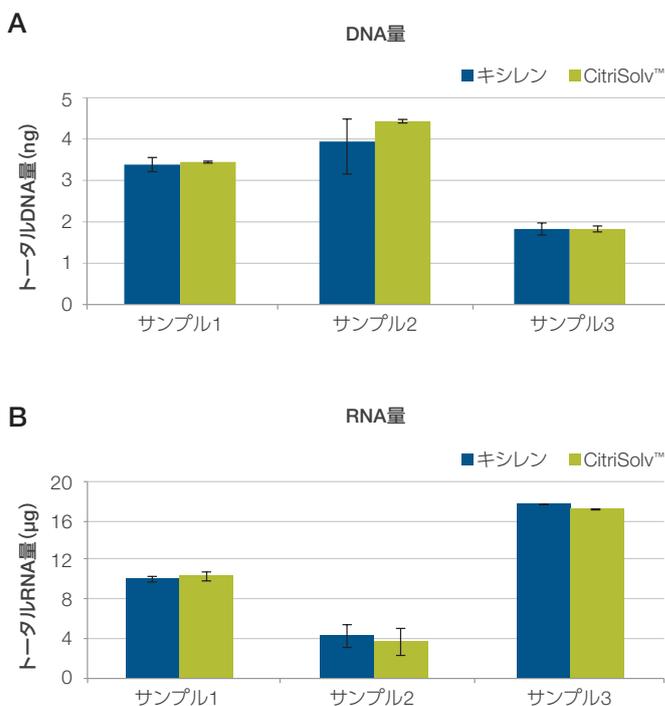


図4. 脱パラフィン剤CitriSolvとMagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitの適合性 10  $\mu\text{m}$ のFFPE組織片から抽出した(A) DNA量と(B) RNA量は、脱パラフィンにキシレンを使用した場合とCitriSolvを使用した場合で同程度だった。

## 自動化と拡張性

MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitは柔軟性と拡張性を兼ね備えており、Thermo Scientific™ KingFisher™ Duo Primeシステムで最大12サンプル、KingFisher Flexシステムで最大96サンプルを一度に処理できます。そこで、手動抽出と自動抽出で同程度の核酸量と品質を確保できるか否かを確認するために、本キットを用いたFFPE連続切片からの核酸抽出処理を、

チューブ使用の手動操作とKingFisher FlexおよびKingFisher Duo Primeシステムの自動化プロトコルと比較してみました。その結果、3種いずれの方法からも同等のトータル核酸抽出量が得られ、Agilent Bioanalyzerシステムを用いたRNA解析などのダウンストリームアプリケーションに適した核酸品質を確保できていました (図5、図6)。

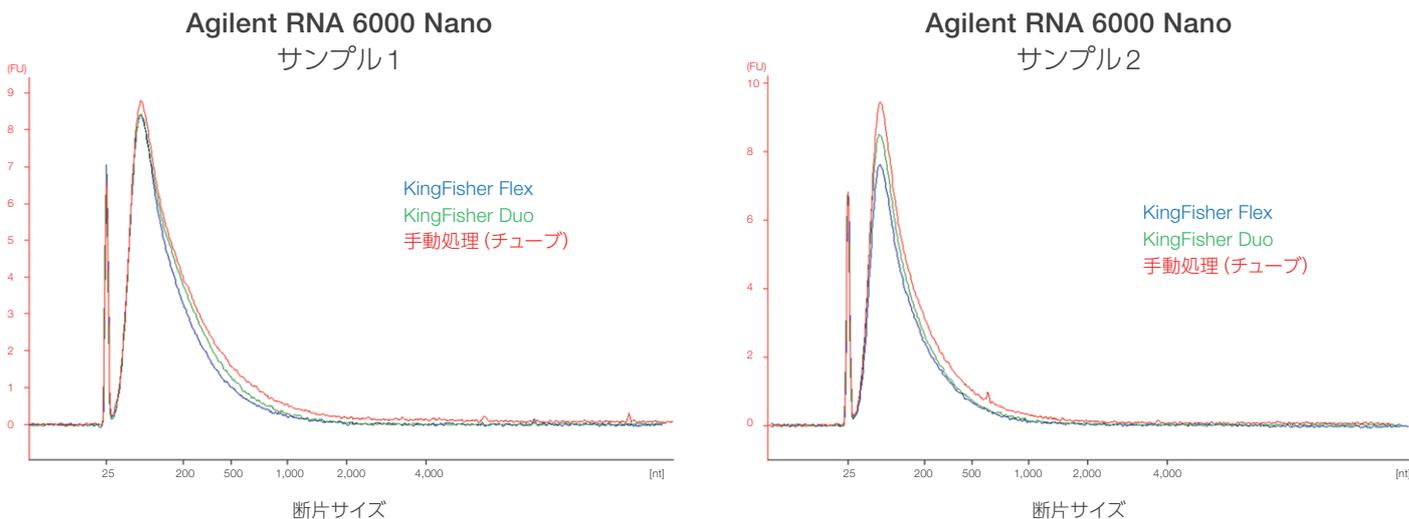


図5. Agilent RNA 6000 Nanoキットを用いたFFPEサンプルのRNA解析 手動抽出したサンプルも自動プロトコル (KingFisher FlexまたはKingFisher Duo Primeシステム) で抽出したサンプルも、RNA量およびRNA断片サイズは同等だった。

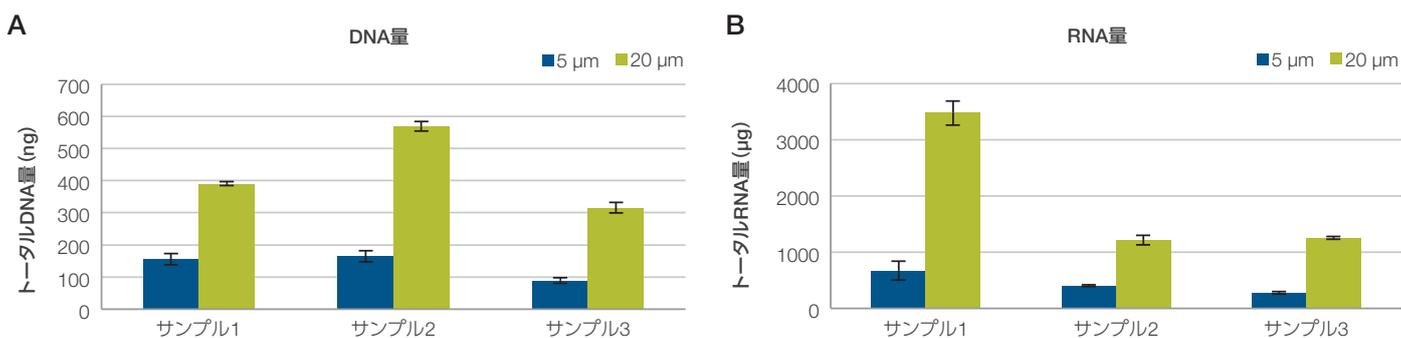


図6. サンプルインプットの拡張性 5 µmと20 µmのFFPE切片をKingFisher Flexシステムで処理した。(A)トータルDNA量と(B)トータルRNA量は、いずれのサンプルも厚みに応じて増大しており、さまざまな厚さのFFPE切片サンプルに対する拡張性が示された。

### コア針生検サンプルと細針穿刺サンプル

がん研究で使用される一般的なサンプルに対するMagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitの汎用性を検証するため、複数のコア針生検サンプルと細針穿刺サンプルからの核酸抽出を行いました。マッチングサンプルからKingFisher Duo Primeシステムの自動抽出プロトコルを用いて核酸を抽出した後、10 ngのサンプルインプットからOncomine Focus Assayパネルでライブラリーを調製し、Ion Chefシステムでテンプレートを作成し、Ion PGMシステムでシーケンスしました。

シーケンシングで得られた各種メトリクスは、ドナーおよび組織タイプを通して一貫していました。DNAの平均読み取り長は109 bp以上で均一性97%、DNA鎖間のストランドバイアスは認められませんでした。RNAの平均読み取り長は87 bp以上で、5種類の内在性コントロール遺伝子が全て検出されました(図7)。

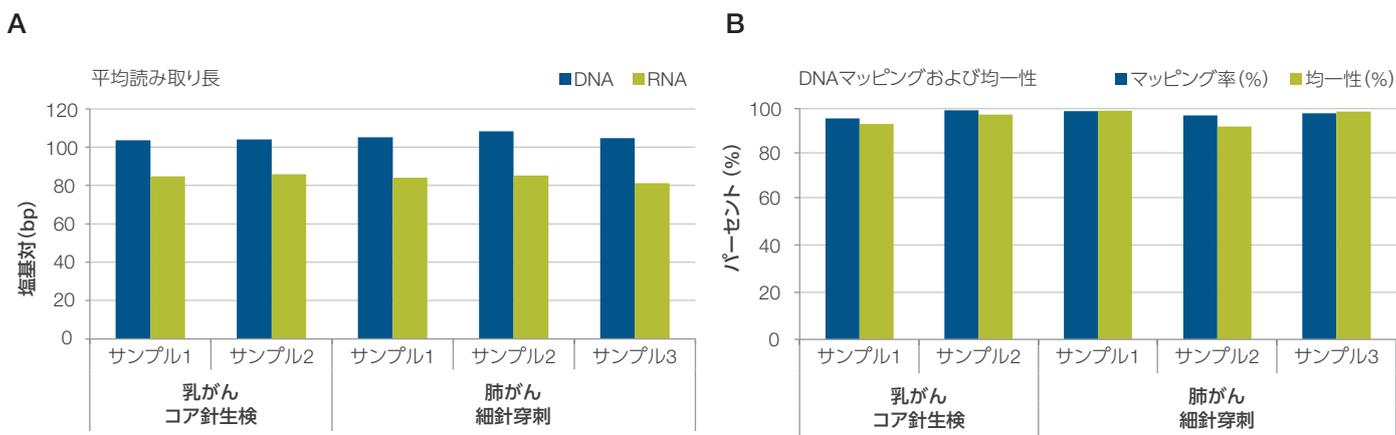


図7. がん研究サンプルのシーケンシング コア針生検サンプルと細針穿刺サンプルから得られた各種シーケンスメトリクス [(A) 平均読み取り長、(B) DNA マッピング率および均一性] は一貫しており、検体タイプが異なっても実用的な核酸回収が可能であることが示された。10 ngのサンプルインプットからOncomine Focus Assayパネルで60 pMのライブラリーを調製し、テンプレート作成にはIon Chefシステムを、シーケンシングにはIon PGMシステムを用いた。

### Ion Torrentシーケンシングの精度と感度

FFPEサンプルの多くは量に限りがあるため、核酸分離の際には再現性のみならず最小限のサンプルインプットから正確な結果を生み出すことも求められます。そこで、アッセイ感度を検証するために、タンパク質を分解させたFFPEサンプルを、残りの分離プロトコル用にサンプルインプットが10%になるまで連続希釈したところ、全希釈範囲でインプット量と核酸抽出量に明確な線形性が認められ、本アッセイの高いDNAおよびRNA回収率が示されました(図8)。

Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2を用いてNGSライブラリーを調製し、抽出サンプルが実用的な高品質を保っているか否かを確認してみました。ライブラリーはいずれも10 ngのインプットから調製し、Ion PGMシステムでシーケンスし、Torrent Variant Callerプラグインを用いてDNA変異体を解析しました。その結果、抽出サンプルのインプット量を漸減させても平均読み取り長や均一性には影響せず、さらに、DNAサンプル全体を通して全てのインプット%で同一の一塩基多型(SNP)変異が検出されました(表1)。

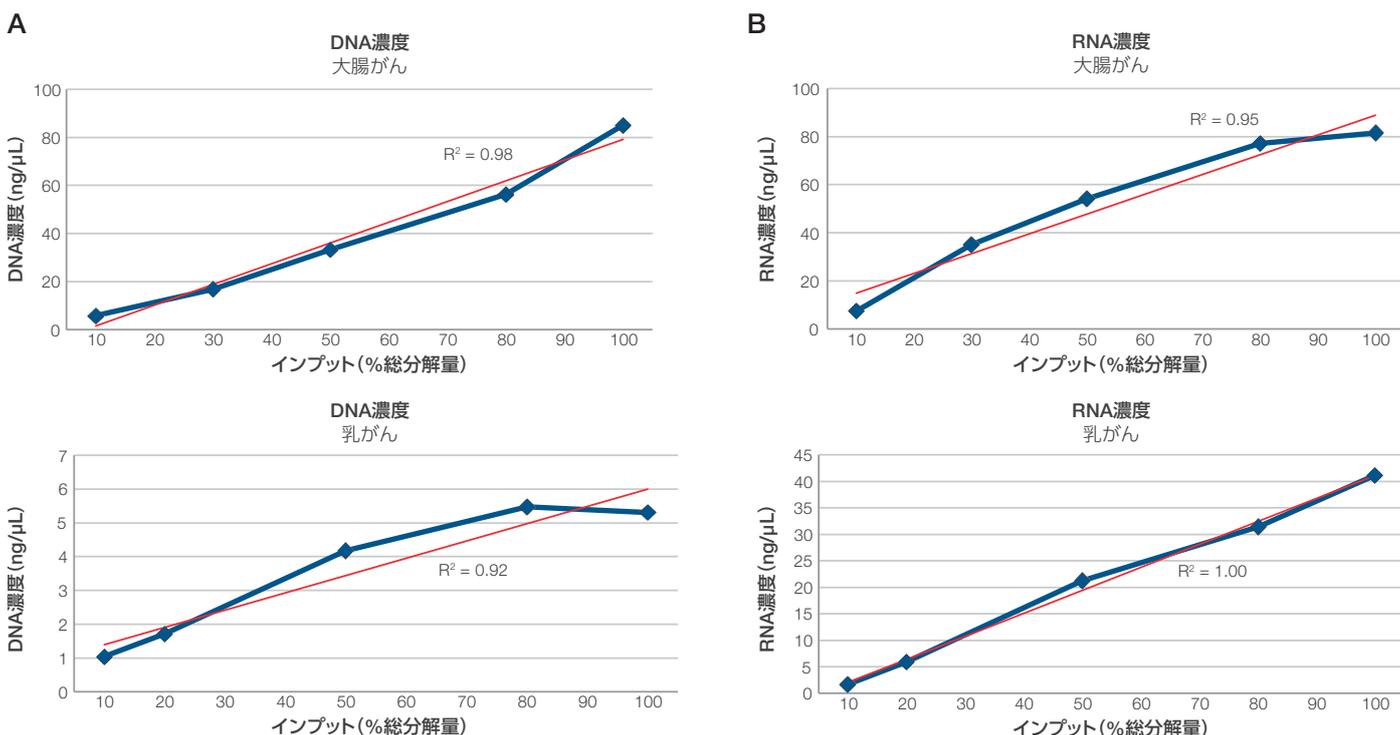


図8. がんFFPEサンプルからのDNAおよびRNA回収 10 μmの大腸がんおよび乳がんFFPE切片サンプルから抽出した(A) DNA量と(B) RNA量。プロテイナーゼK溶液でタンパク質を分解させた後、残りの分離プロトコル用のサンプルインプットが10%になるまで連続希釈した。DNA、RNAともにサンプルインプット量(%)と抽出量の間線形性が認められ、高い核酸回収率が示された。

表1. がんサンプルにおける変異体の検出 プロテイナーゼK液でタンパク質を分解させた後、新鮮な分解緩衝液で各種インプット%に希釈した。プロトコルに従って核酸抽出を実行し、ライブラリーの調製にはIon AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2を、シーケンシングにはIon PGMシステムを用いた。大腸がんも乳がんもそれぞれ全く同一のホットスポット変異が検出され、全範囲の希釈インプット量(%)でアッセイの感度と実用性が実証された。

FFPE組織タイプ	サンプルインプット (% 総分解量)	平均読み取り長 (bp)	検出された変異体	ホットスポット遺伝子名
大腸がん	100%	119	9	<i>PDGFRA, APC, PTEN, HRAS, KRAS, TP53, SMARCB1</i>
	80%	111	9	<i>PDGFRA, APC, PTEN, HRAS, KRAS, TP53, SMARCB1</i>
	50%	113	9	<i>PDGFRA, APC, PTEN, HRAS, KRAS, TP53, SMARCB1</i>
	30%	112	9	<i>PDGFRA, APC, PTEN, HRAS, KRAS, TP53, SMARCB1</i>
	10%	113	9	<i>PDGFRA, APC, PTEN, HRAS, KRAS, TP53, SMARCB1</i>
乳がん	100%	109	3	<i>KIT, MET, HRAS</i>
	80%	108	3	<i>KIT, MET, HRAS</i>
	50%	109	3	<i>KIT, MET, HRAS</i>
	20%	109	3	<i>KIT, MET, HRAS</i>
	10%	108	3	<i>KIT, MET, HRAS</i>

## 結論

MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitは、多様な分子学的アッセイやアプリケーションの利用に適した、信頼性、汎用性および拡張性に優れた核酸分離手法を提供します。本キットは、25年以上経過した保存組織ブロックをはじめ、幅広いFFPE組織タイプに適用できます。さらに、固形がん切除片、細針穿刺、コア針生検など、さまざまな生検検体から容易に核酸を回収できます。

アッセイパラメーターには柔軟性があり、複数の処理オプションに対応可能です。例えば、厚みの異なるスライド切片やカール状切片から、同等の抽出量や品質で核酸を抽出できます。本アッセイは手動操作で処理することも、最大96サンプルを同時に自動処理することも可能です。また、CitriSolv液などキシレン以外の脱パラフィン剤とも利用でき、ドラフトチャンバーを必要としない毒性の低い処理手順を実現できます。

MagMAX FFPE Ultra Kitを用いて分離したDNAやRNAは、qPCR、Agilent Bioanalyzerシステムを用いた解析、Ion Torrent NGSといったダウンストリームアプリケーションに適しています。Ion AmpliSeqテクノロジーを用いると、わずか10 ngのサンプルインプットから高品質のNGSライブラリーを調製でき、他に代用のきかない貴重なFFPEサンプルから最大限のデータを収集できます。

■ 詳細はこちらをご覧ください [thermofisher.com/ffpeisolation](https://thermofisher.com/ffpeisolation)

研究用에만使用できます。診断用には使用いただけません。  
© 2022 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.  
All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.  
TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc., used under permission and license.  
Agilent Bioanalyzer is a trademark of Agilent Technologies.  
CitriSolv is a trademark of Decon Laboratories.  
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 SPA047-A22110B

販売店

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

[thermofisher.com](https://thermofisher.com)

applied biosystems