



Agilent 2200 TapeStation システムおよび Agilent Genomic DNA ScreenTape アッセイに よる DNA Integrity Number (DIN) の測定

技術概要

著者

Marcus Gassmann
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

Barry McHoull
Agilent Technologies, Inc.
Edinburgh, UK

はじめに

数多くある分子スクリーニングとアッセイメソッドの結果は、ゲノム DNA (gDNA) 投入物質の総合品質に依存することが少なくありません。例えば、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション (aCGH) と次世代シーケンシング (NGS) で高品質かつ明確な結果を得るには、高品質なインタクト gDNA が必要です。これらのワークフロー (特に NGS などの高コストな手法) に対しては、投入物質の品質管理 (QC) を実施することを強く推奨します。低品質のサンプルに費やす時間と手間を省けるためです。

Agilent 2200 TapeStation システムを Agilent Genomic DNA ScreenTape アッセイと組み合わせると、gDNA 出発物質の品質と整合性を評価するための卓越したソリューションが提供されます。また、gDNA の整合性をより直接的に測定し、整合性測定を標準化するため、Genomic DNA ScreenTape アッセイ向けのソフトウェアアルゴリズムが開発されています。およそ 7,000 種類の gDNA サンプル分析に基づき、このアルゴリズムは gDNA の整合性に対して、DNA Integrity Number (DIN) と呼ばれる数値的評価を提供します。この機能を TapeStation Analysis Software (リビジョン A.01.05 以上) と併用すると、gDNA の整合性指標としての DIN が自動的に決定され、表示されます。旧バージョンのソフトウェアで生成されたデータファイルは、ソフトウェアアップグレード後に再分析することで、DIN を決定することができます。

この技術概要では、ホルマリン固定/パラフィン包埋 (FFPE) を含む gDNA サンプルに対して、2200 TapeStation システムおよび Genomic DNA ScreenTape アッセイで生成された DIN の堅牢性を、信頼性と再現性の観点から評価します。



Agilent Technologies

実験手法

材料

市販のインタクトヒト gDNA を Promega (ウィスコンシン州マディソン、米国) から購入しました。Branson Ultrasonics (コネチカット州ダンベリー、米国) の Digital Sonifier を使用しました。インスリンシリンジの Omnican® 50 (30G × 8 mm) を B. Braun Melsungen AG (メルズンゲン、ドイツ) から入手しました。2200 TapeStation システム (p/n G2965AA) と Agilent TapeStation Analysis Software (リビジョン A.01.05)、Genomic DNA ScreenTape 消耗品 (p/n 5067-5365)、Genomic DNA 試薬 (p/n 5067-5366) を Agilent Technologies (ヴァルトブロン、ドイツ) から入手しました。

サンプル

血液、乾燥血液スポット、唾液、無脊椎動物、さまざまな人体組織を含む、およそ 7,000 種類の真核生物起源の gDNA サンプルと FFPE サンプルが、お客様の好意により提供されました。堅牢性を検証するため、超音波処理 (振幅 10 %、2 秒の処理、5 秒の一時停止、最大 120 秒の処理) を使用するか、微細なゲージニードルで切断するか、またはその両方を組み合わせて市販の gDNA を分解し、gDNA 分解範囲の広い 15 種類の gDNA サンプル (整合性が最も高い gDNA サンプル 1、分解度が最も高い gDNA サンプル 15) を生成しました。

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

Genomic DNA ScreenTape System Quick Guide¹ に従って DNA 分析を実行しました。手短かに説明すると、1 μ L の gDNA を 10 μ L のゲノム DNA サンプルバッファと混合しました。Genomic DNA ScreenTape 消耗品、ろ過済みロード用チップ、前処理済みサンプルを、2200 TapeStation 機器に配置しました。2200 TapeStation システムのロード、電気泳動、イメージングを実行し、サンプルあたり 2 分未満でデジタル分析した結果が示されました。

結果と考察

図 1 に重ね表示したエレクトロフェログラムとゲルイメージは、右から左へと増加する分解度に伴う DNA サイズおよび分散の変化を示しています。高度にインタクトな gDNA サンプルは、ゲルイメージ内の単一フラグメントとして、エレクトロフェログラム内では最大のラダーピークの上の明確なピーク (48,500 bp) として移動しています。分解度が増加すると、小さい gDNA フラグメントのショルダーが形成され、メインピークは小さいサイズへと移行します。高度に分解された gDNA はゲルイメージ内のスミアとして表示され、エレクトロフェログラムではサイズが 2,000 bp 未満の広いピークと

して移動しています。ゲルイメージとエレクトロフェログラムの両方のトレースから、gDNA サンプルの整合性を視覚的に特定できますが、これは非常に主観的な手法です。信頼性の高い整合性評価を実現するための、客観的な標準化ツールを提供するために、DNA Integrity Number (DIN) アルゴリズムが開発されました。DIN は、サイズ範囲全体でシグナル分布を評価することで、ゲノム DNA サンプルのフラグメンテーションを決定し、自動計算された数値を当てはめます。DIN は、幅広いゲノム DNA ソースからおよそ 7,000 種類のサンプルを使用して、すべてのサンプルに対してシグナルを比較することで生成されました。

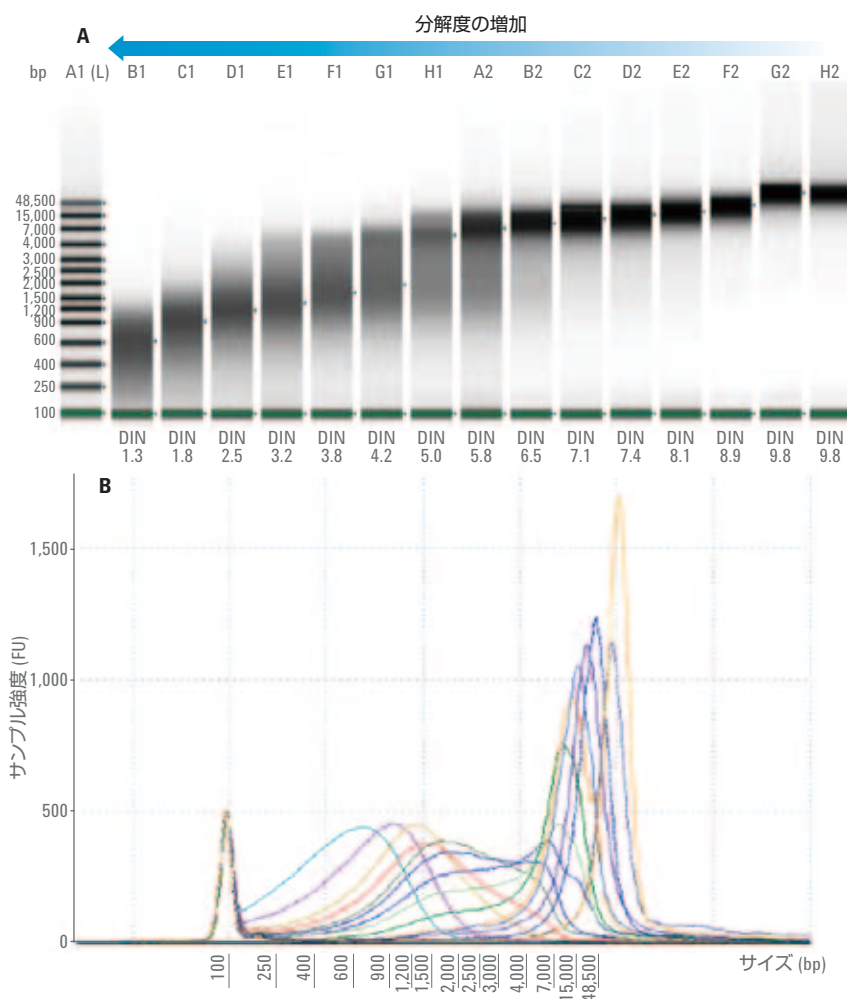


図 1. Agilent 2200 TapeStation システムと Agilent Genomic DNA ScreenTape アッセイを使用して、15 種類の分解 gDNA サンプル (60 ng/ μ L) を分析し、DIN を決定しました。A) 左から右に、gDNA サンプル 15 から 1 に対するゲルイメージと DIN (各レーンの下に表示)。B) 15 種類の gDNA サンプルすべてに対するエレクトロフェログラムの重ね表示。

数値的な評価を提供するため、サンプルはシグナル分布に従って DIN 1 から 10 までのスケールに分類されました。高い DIN 値は高度にインタクトな gDNA を示しており、低い DIN 値は強く分解された gDNA サンプルを示します。

堅牢性と再現性

7,000 サンプルの分解範囲全体を代表する 15 種類の gDNA サンプルが生成されました。15 種類の gDNA サンプルに対して決定されたスコアは、DIN 9.8 から 1.3 までにわたります。図 1 は 15 種類のサンプルに対するゲルイメージとエレクトロフェログラムの重ね表示であり、DIN は個々のゲルイメージレーンの真下に表示されています。この標準化サンプルセットを使用して、サンプル濃度、ゲノム DNA 試薬バッチ、Genomic DNA ScreenTape 機器バッチ、TapeStation システムタイプ、96 ウェルプレート上のサンプル位置それぞれに対する非依存性という観点から、アルゴリズムの堅牢性と再現性を分析しました。

DIN がサンプル濃度に左右されないことを示すため、高、中、低の整合性サンプルを代表する 3 種類のゲノム DNA サンプルを、DIN の規定有効範囲全体をカバーする 5~300 ng/μL の 6 種類の濃度で分析しました。図 2 から、3 つの gDNA サンプルすべてに対して決定された DIN が、DIN 有効範囲内の DNA ロード濃度に依存していないことが明確に分かります。

ScreenTape 機器バッチ (n = 4) または ゲノム DNA ローディングバッファバッチ (n = 3) が、15 種類の gDNA サンプルすべてに対して決定された DIN に影響を与えないことを証明するため、続いて一連の実験を実施しました。

2200 TapeStation システムには 2 種類の機器が提供されており、標準機器は RNA、DNA、タンパク質の分析に適しています。核酸機器は、核酸の分析のみに適しています。決定された DIN に対し、機器タイプによる影響がないことを示すため、両方の機器タイプを使用して 15 種類の gDNA サンプルを分析しました (データの記載なし)。

2200 TapeStation システムでは、96 ウェルプレートを使用してサンプルを分析できます。DIN の安定性と再現性をテストするため、整合性範囲全体から選ばれた 3 種類の gDNA サンプルを、96 ウェルプレートを使用し、n = 32 で分析しました。図 3 から、3 種類のテスト済みサンプルすべての平均 DIN に対する標準偏差は小さいことが明確に分かります。また、より重要な点として、96 ウェルプレートの測定サイクル全体を通じて安定しています。

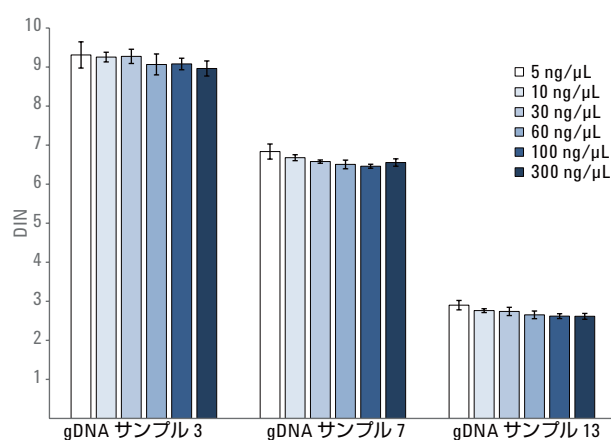


図 2.3 種類の gDNA サンプルを 6 種類の濃度に希釈し、Agilent 2200 TapeStation システムと Agilent Genomic DNA ScreenTape アッセイを使用して分析しました。平均 DIN と標準偏差をグラフ内にプロットしています (n = 10 ~ 15)。

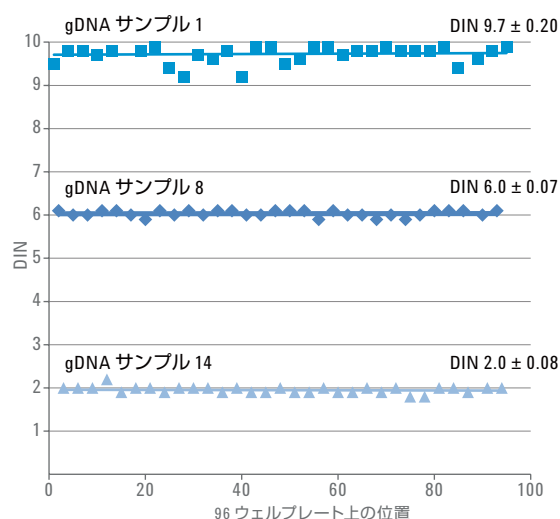


図 3. Agilent 2200 TapeStation システムと Agilent Genomic DNA ScreenTape アッセイを使用して、96 ウェルプレートから 3 種類の gDNA サンプル (25 ng/μL) を分析しました。対応する平均 DIN と標準偏差を示しています (n = 32)。

図 4 は、上述した実験のデータを要約したものであり、平均 DIN と標準偏差を計算してプロットしています。

DIN は、さまざまなサンプル濃度や機器タイプ、ScreenTape 装置およびローディングバッファ試薬のバッチ、96 ウェルプレート的位置に関係なく、高い再現性を示しています。すべての分析対象サンプルに対して、総合的な標準偏差は 0.30 未満でした (図 4)。

旧バージョンのソフトウェアで生成された Genomic DNA TapeStation ファイルに対する DIN の利用可能性

TapeStation Analysis Software は、2200 TapeStation システムで取得されたデジタルデータを活用して、自動的に DIN を決定し (リビジョン A.01.05 以上)、ゲルイメージの下とサンプルデータ表内に表示します。A.01.05 より前のソフトウェアバージョンで生成されたデータファイルは、ソフトウェアアップグレード後に再分析することで、DIN を決定できます。

結論

この技術概要は、次の事項を示しています。

- DIN は、高度にインタクトな gDNA (DIN 10) から分解度の高い gDNA (DIN 1 未満) まで、幅広いサンプルを測定できます。
- DIN は、FFPE 組織を含む各種のサンプルソースから抽出されたゲノム DNA の整合性評価に使用できます。
- DIN は、幅広い濃度範囲を通じて優れた堅牢性を備えています。
- DIN は、サンプル濃度や機器の ScreenTape 消耗品および試薬、96 ウェルプレート的位置に関係なく高い再現性を示します。

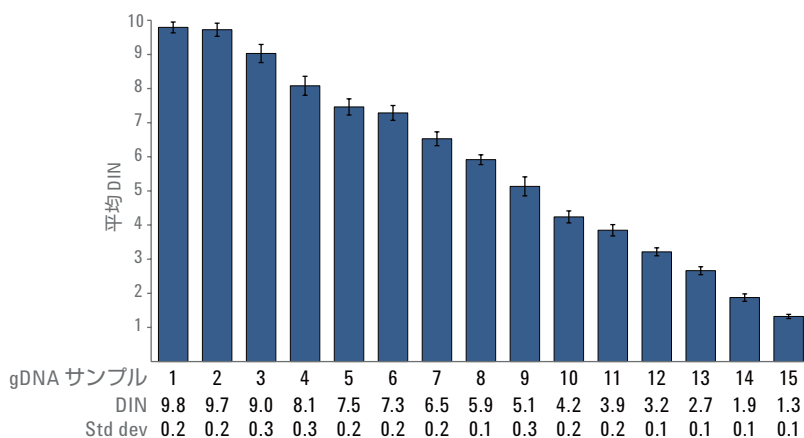


図 4. Agilent 2200 TapeStation システムと Agilent 2200 TapeStation Nucleic Acid システムを使用して、異なる ScreenTape および Agilent Genomic DNA ローディングバッファのバッチと異なるサンプル濃度で、15 種類の gDNA サンプルを分析しました。実施したすべての測定データを組み合わせて取得した平均 DIN および標準偏差を要約したものを、グラフと表に示しています。

参考文献

1. Agilent Genomic DNA ScreenTape System Quick Guide, Agilent Technologies, publication number G2964-90040 rev.C, 2014.

www.agilent.com/genomics/tapestation

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, December 1, 2014
5991-5258JAJP



Agilent Technologies