

病理組織切片の解析

FFPE サンプルの
分子解析における
重要なファクター



Sample & Assay Technologies

1. イントロダクション	3
2. FFPE サンプルの調製と保存の際の重要事項	4
2.1 サンプルタイプ	5
2.2 サンプルの取り扱い	5
2.3 ホルマリン固定	5
2.4 パラフィン包埋	8
2.5 染色	8
2.6 サンプル保存	8
3. FFPE サンプルから分析可能な生体分子を回収するための重要なファクター	10
3.1 脱パラフィン	11
3.2 ゲノム DNA 精製	12
3.3 全ゲノム増幅	13
3.4 Bisulfite 変換	14
3.5 トータル RNA および miRNA の精製	15
3.6 タンパク質精製	16
3.7 複数の生体分子を同時精製	18
3.8 回収および精製の自動化	19
4. FFPE サンプルの分子解析の成否を決定する重要なファクター	20
4.1 RNA の品質チェック	21
4.2 PCR およびリアルタイム PCR による DNA 解析	23
4.3 リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析	23
4.4 パイロシーケンシング法によるメチル化および変異解析	26
5. オーダーインフォメーション	27

1. イントロダクション



イントロダクション

世界中で保存されているホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織標本アーカイブは、バイオメディカル研究において非常に貴重な検体です。ますます多くの研究者がFFPEサンプルを用いて分子解析を実施するに伴い、これらのサンプルのユニークな性質を考慮した特異的なプロトコルの開発が重要になってきます。この小冊子では、FFPEのワークフロー全体における問題点とそれらの解決法を解説しています。まず、固定と包埋のプロセスに起因するDNA、RNA、およびタンパク質の品質低下を最小限に抑えるために、FFPEサンプルの調製および保存の方法を記述しています。次に、分析対象の生体分子の回収と解析ステップにおいて、FFPEサンプルから生体分子を効率的に回収する方法、また逆転写反応やリアルタイムPCRなどのダウンストリーム・アプリケーションに必要な改良点に関して詳しく説明します。

調製および保存

回収と解析



2. FFPE サンプルの調製と保存の際の重要事項



FFPE サンプルの調製と保存の際の重要事項

FFPE サンプルから分離される核酸およびタンパク質の品質は、サンプルの固定あるいは包埋の操作前後、あるいは操作中にどのようにサンプルを取り扱ったかにより異なってきます。この章では、生体分子の品質に影響を与える主な要因を特定し、これらの要因の影響を最小限に抑えるための方法を提案しています。



2. FFPE サンプルの調製と保存の際の重要事項

2.1 サンプルタイプ

各組織は、特定の生理的機能を持ち、独自の構造と構成細胞を有しています。組織の種類に応じて、回収後に生体分子が分解、発現誘導、修飾される速度は異なります。従って組織の摘出と固定はできるだけ迅速に行ないます（2.2 章参照）。繊維質あるいは脂肪を多く含む FFPE 組織から生体分子を精製する場合は特殊な溶解条件は必要ありません。しかし、ホルマリンクロスリンクやパラフィンの存在が生体分子回収の要件を決定します（3 章参照）。

腫瘍組織を取り扱う場合、健全細胞および悪性細胞が均一には分布していないことに留意してください。このために、同じ組織サンプルでも切片が異なると解析結果が一致しないことがあります。

2.2 サンプル取り扱い

患者から組織標本を得るための外科手術では、麻酔投与、血管結紮、組織の摘出、そして組織固定が行なわれます。患者の麻酔から組織固定までの間に、組織の遺伝子発現変化や自己分解が起こりえます。従って RNA 転写物とタンパク質のプロファイルにおける顕著な変化を回避するために、組織固定までの操作時間をできるだけ短くしてください。少なくとも、操作の各ステップでかかった時間は記録する必要があります。

2.3 ホルマリン固定

組織の固定は、ホルマリン溶液中に標本を入れることにより実施しますが、ホルマリン溶液の組成がばらついていることがあります（通常 10%ホルマリン溶液には 3.7%のホルムアルデヒドと同様に 1 ~ 1.5%のメタノールを含む）。この化学反応の結果、生体分子間のクロスリンクを引き起こします。クロスリンクには、核酸間、タンパク質間、核酸・タンパク質間のクロスリンクが含まれます。最適な結果を得るためには、緩衝作用のないホルマリン溶液あるいは酸性ホルマリン溶液ではなく、中性緩衝ホルマリン溶液を使用します。中性緩衝液中では、ホルマリンの分解はゆっくり進行し、核酸の品質を損なうと考えられているホルマリン分解産物の産生が抑えられます。

また、組織標本の厚さ、ホルマリン溶液の容量、固定時間の 3 つの要因も、組織固定の程度に重要な影響を与えます。固定が十分でないと、ホルマリンが浸透していない組織標本の深部で、核酸やタンパク質の分解あるいは遺伝子発現の変化が起こります。過剰な固定は広範なクロスリンクを引き起こし、分析対象である核酸やタンパク質の抽出が困難になる可能性があります。



2. FFPE サンプルの調製と保存の際の重要事項

ホルマリンは時速約 1 mm の速度で組織に浸透します。また組織が厚くなるに伴い、ホルマリンの浸透速度は低下します。従って、組織標本を固定する際は、表面での過剰な固定と組織深部での固定不足を回避するために、組織切片を薄くすることが重要です。QIAGEN R&Dが行なった、サイズの異なるサンプルで固定を比較した実験では、薄切りの組織（4 mm 以下の厚さ）ではなく全組織（約厚さ 1 cm）を固定した際に顕著な RNA 分解が観察されました（図 1）。最適な結果を得るためには、組織標本を 5 mm 以下の厚さにして固定することを推奨します。

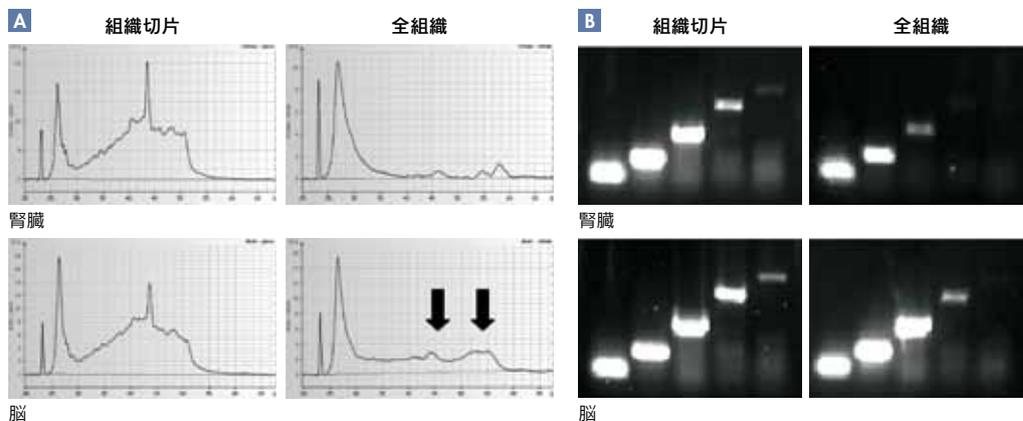


図 1. RNA 分解に影響を及ぼすサンプルの厚さ

ラット組織を全組織あるいは ≤ 4 mm の切片にしてホルマリン固定し、その後パラフィン包埋した。A パラフィン包埋 3 日後に RNeasy® FFPE Kit を用いて RNA を精製し、Agilent® 2100 Bioanalyzer を用いて解析した。脳の全組織のエレクトログラム上にある二つの矢印は、18S rRNA と 28S の rRNA を示し、RNA の断片化が増加していることを示す。B 精製した RNA でラット Rpl4 遺伝子に特異的な様々なプライマーペア、QIAGEN OneStep RT-PCR Kit を用いて 1 ステップ RT-PCR を行なった。左から右に向かって、増幅産物のサイズは 96、206、400、613、785 nt である。全組織で大きいサイズの増幅産物が観察されないことは、RNA 分解が生じたことを示唆している (Data excerpted from von Ahlfen et al. [2007] Determinants of RNA quality from FFPE samples. PLoS ONE 12, e1261.)。

ホルマリンと組織の比率を少なくとも 10:1 にすると、最適な固定を確実に行なえます。これは、針生検などの小さな組織標本を取り扱う際には容易に実施可能です。しかし、大きな組織サンプルを扱う場合は、固定用ホルマリンが不十分になる可能性があります。この場合、組織標本をホルマリン固定用にカットするべきです。

過剰な固定を回避するために、組織の固定は 24 時間を超えないようにします。QIAGEN R&Dで行なった、一晚固定と 72 時間固定を比較する実験では、固定時間は RNA の完全性にはほとんど影響を与えないことが観察されました（図 2）。しかし、図 1 の実験が示すように 72 時間の固定は、精製した RNA の 1 ステップ RT-PCR におけるパフォーマンスに悪影響を及ぼすことが判明しました。RNA 分子の広範にわたるクロスリンクと、不可逆的なクロスリンクの割合が高いために、大きいサイズの増幅産物を増幅することができなかつたと考えられます（図 1）。別の実験でも 72 時間の固定により、FFPE サンプルからのタンパク質の回収が低下することも明らかになりました（図 3）。この負の効果もおそらくクロスリンクの増加が原因です。

2. FFPE サンプルの調製と保存の際の重要事項

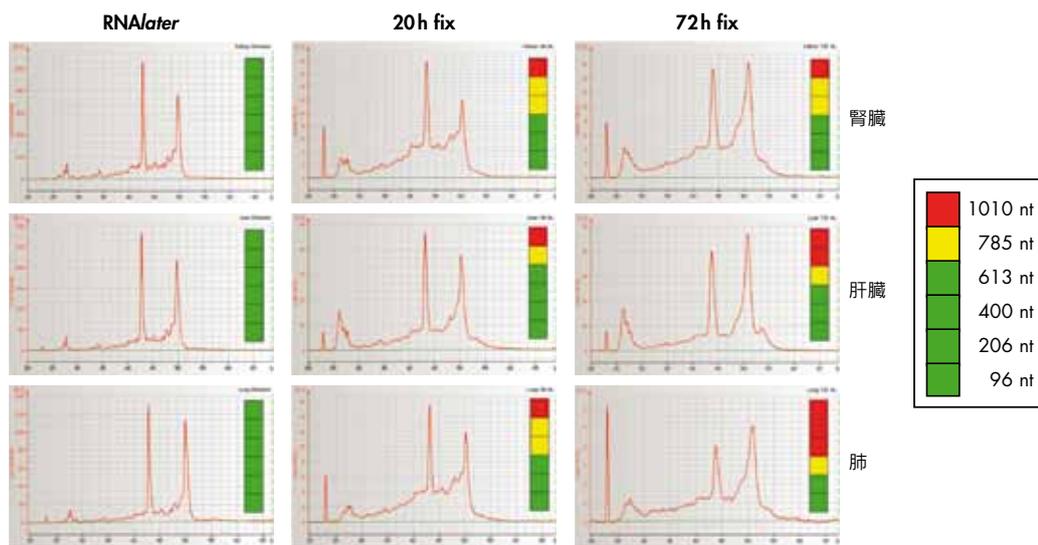


図 2. 固定時間が RNA 完全性と 1 ステップ RT-PCR に及ぼす影響

様々なラット組織を一晩あるいは3日間ホルマリン固定した後、パラフィン包埋した。比較のためにラット組織を RNA later[®] RNA Stabilization Reagent で安定化した。包埋3日後に RNeasy FFPE Kit を用いて RNA を精製し、Agilent 2100 Bioanalyzer で解析した。さらに、QIAGEN OneStep RT-PCR Kit とラット遺伝子 Rpl4 に特異的なプライマーペア各種を用いて 1 ステップ RT-PCR を行なった。増幅産物のサイズが図に表示され、RT-PCR の増幅結果が次のように色で示されている：赤は増幅なし、黄色は弱い増幅、緑は良好な増幅。長い固定時間は RNA の断片化とリボソームのバンドにはわずかな影響しか与えなかったが、サイズの大きい増幅産物の増幅効率を低下させた (Data excerpted from von Ahlfen et al. [2007] Determinants of RNA quality from FFPE samples. PloS ONE 12, e1261.)。

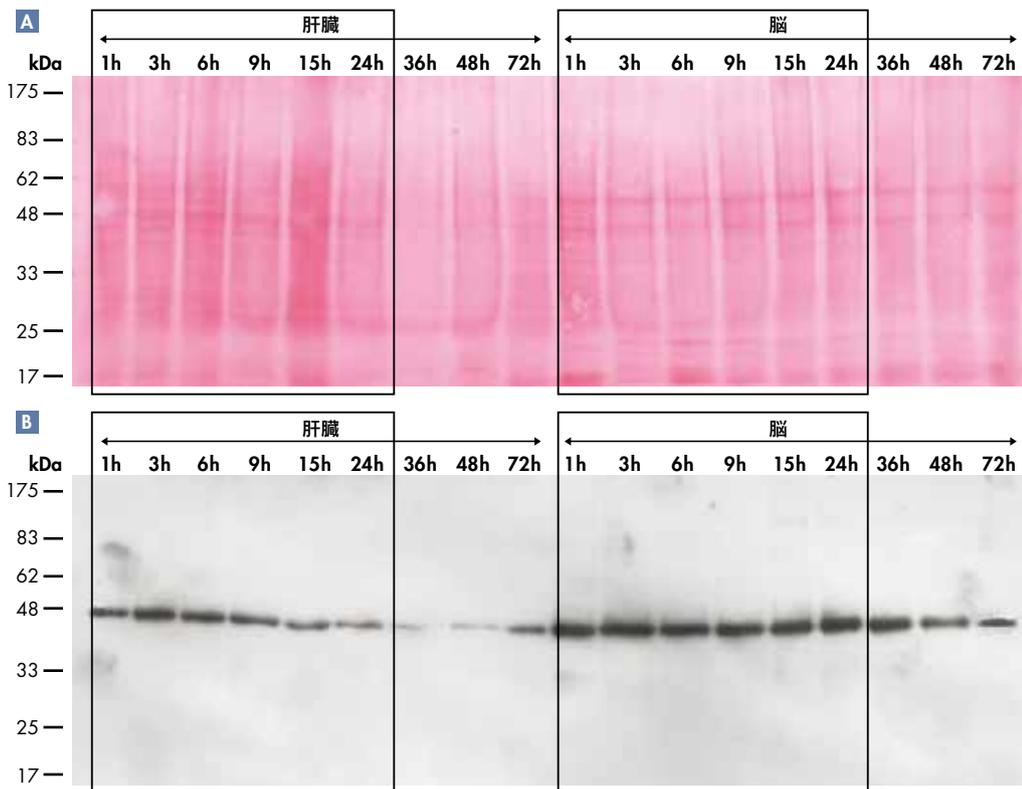


図 3. 固定時間がタンパク質抽出に及ぼす影響

ラット組織を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液を用いて表記時間固定し、パラフィン包埋した。Qproteome[®] FFPE Tissue Kit を用いて全タンパク質を抽出した。A) SDS-PAGE 解析および B) 抗 β -actin 抗体を用いたウエスタンブロット解析。両解析ともに 24 時間を越す固定時間では抽出タンパク質量が低下した。

2. FFPE サンプルの調製と保存の際の重要事項



2.4 パラフィン包埋

ホルマリン固定後、組織標本をパラフィン包埋します。このプロセスはいくつかのステップで構成されています。最初は水分をアルコール（通常はエタノール）に置換する脱水ステップです。その後、アルコールをキシレンあるいはキシレン代替物と置換する透徹ステップ、そしてキシレンをパラフィンで置換する含浸ステップと続きます。最後が全標本にパラフィンが浸透する包埋ステップです。水分が残っているとサンプルの分解につながる可能性があるため、組織標本を完全に脱水した後に含浸を行なうことが重要です。また残留水分がタンパク質分解を引き起こすので、パラフィン包埋は、タンパク質の完全性を維持するために重要なステップです。従って、水で希釈していない高品質の試薬を使用する必要があります。また、脱水を完全に行なうために全包埋操作にかかる時間と温度を最適化しなければなりません。一度使用した試薬からの水のキャリーオーバーを回避するために、常に新鮮なアルコールとキシレンを使用することを推奨します。

ホルマリン固定組織の含浸および包埋に使用するパラフィンは、融解温度あるいは成分にばらつきがあります。融解温度の高いパラフィンを使用すると包埋プロセスの温度を高くする必要があるので、サンプル分解度が高くなる可能性があります。分析に使用可能な核酸とタンパク質を FFPE サンプルから最適に回収するためには、融解温度の低いパラフィンをご使用ください。さらにミツロウなどの添加物を含有するパラフィンは、生体分子の回収を妨害するので使用を避けてください。

2.5 染色

FFPE サンプルの分子解析で生じる問題を回避するために、サンプルの染色はできるだけ避けてください。ある種の染色および試薬、特に免疫組織化学染色に使用されている試薬は核酸に影響を与える可能性があります。高 pH と重金属イオンを含む染色操作も回避するべきです。サンプル染色が必要な場合は、核酸分析で問題にならないクレシルバイオレットを使用してください。

組織染色（例えばヘマトキシリンまたは Fast Red）で染色した標本からのタンパク質精製では、タンパク質収量が劇的に減少する可能性があります。しかし精製したタンパク質は、ウエスタンブロットティングや逆相タンパク質マイクロアレイ解析のようなダウンストリーム解析に使用することができます。

2.6 サンプル保存

固定と包埋を行なった後の FFPE サンプルは、核酸とタンパク質の分解速度を抑えるために最適な温度で保存することが理想です。異なる保存温度を比較した QIAGEN R&D の実験では、FFPE サンプルを室温またはそれ以上の温度で保存した場合に比べて、4°C で保存した場合には 1 年後に RNA の大部分がインタクトのまま残っていることが観察されました（図 4）。

2. FFPE サンプルの調製と保存の際の重要事項

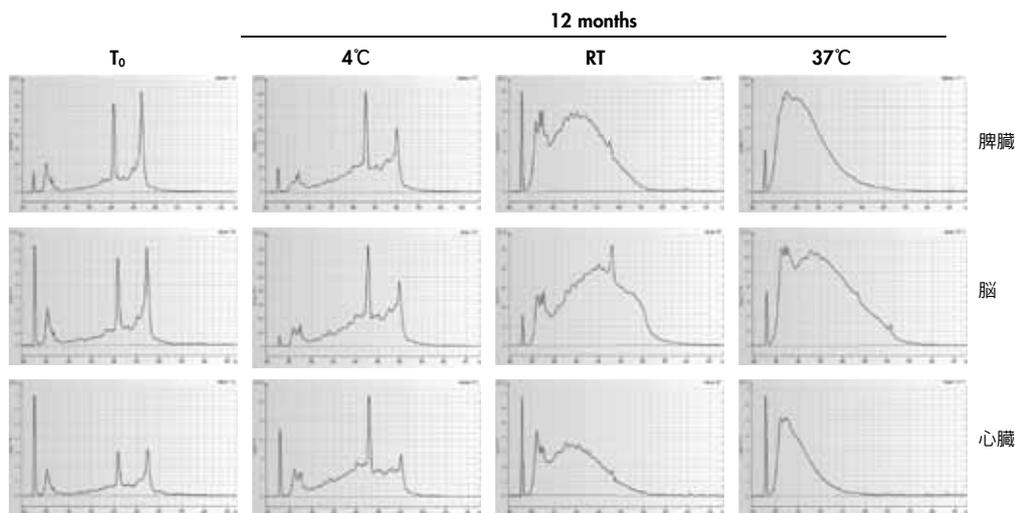


図 4. RNA 完全性に及ぼす保存温度の影響

様々なラット組織をホルマリン固定パラフィン包埋した。包埋 3 日 (T₀) 後、4°C、20 ~ 25°C (RT)、37°C で 1 年間保存後に、RNeasy FFPE Kit を用いて RNA を精製した。Agilent 2100 Bioanalyzer により RNA の分解度を解析した。4°C で保存したサンプルでは、18S rRNA および 28S rRNA に対応するピークが明確に観察され、インタクトな RNA であることを示したが、保存温度を上げるにつれて明確なピークが減少した (Data excerpted from von Ahlfen et al. [2007] Determinants of RNA quality from FFPE samples. PLoS ONE 12, e1261.)。

FFPE サンプル中の RNA は著しく断片化していることが多いため、mRNA などの長い RNA よりもマイクロ RNA (miRNA) のような小さい RNA でインタクトな RNA を回収できる確率が高くなります。すなわち、長い増幅産物を検出するためのアッセイ (例えば特定の miRNA 転写解析のためのアッセイ) よりも、短い増幅産物を検出するためのアッセイ (例えば特定の miRNA のアッセイ) の方がホルマリン固定による影響を受けにくいことを意味します (図 5)。

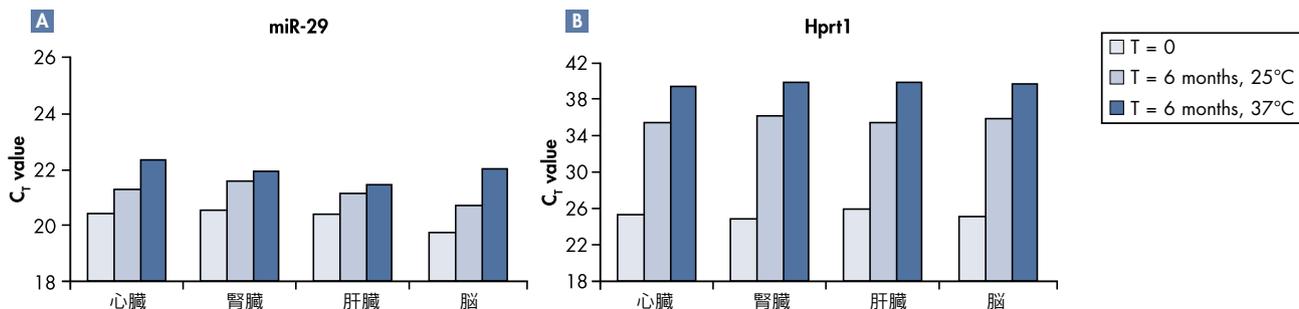


図 5. リアルタイム RT-PCR のパフォーマンスに影響する保存条件は RNA サイズに依存

様々なラット組織をホルマリン固定パラフィン包埋した。miRNeasy FFPE Kit を用いて、大小の RNA を含んだトータル RNA を精製した。包埋 3 日 (T=0) 後、室温で 6 ヶ月保存、37°C で 6 ヶ月保存後の RNA サンプルをテンプレートとして miScript PCR System を用いたリアルタイム RT-PCR を行なった。ABI™ 7900 cyclor で解析した。A microRNA miR-29 (テンプレートの長さ: 22 nt) および B Hprt1 転写物 (増幅産物の長さ: 94 bp) を検出した。6 ヶ月保存条件は miRNA アッセイよりも mRNA アッセイのパフォーマンスに大きな影響を与え、RNA 断片化が、非常に短いテンプレートの検出に比べて長いテンプレートの検出に大きな影響を与えることを示唆している。



FFPE サンプルから分析可能な生体分子を回収するための重要なファクター

FFPE サンプルから DNA、RNA、タンパク質を精製する際にいくつかの重要な問題があります。まず生体分子がお互いにクロスリンクしています。クロスリンクの範囲と不可逆性のクロスリンクの割合は、ある程度はホルマリン固定時間により変動します（図 2、6）。次に、FFPE サンプルがどのように調製・保存されたかによっても差はありますが、核酸は著しく断片化されます。第三に、FFPE サンプルは希少であるため、生体分子の精製とダウンストリーム解析に利用できるサンプルの量が限られています。従って効率の高い精製操作を行ない、できるだけ多くの生体分子を回収する必要があります。本章では、FFPE サンプルから DNA、RNA、タンパク質を精製する際に生じる特殊な問題点を列挙し、これらを克服する方法についてご紹介します。



3. FFPE サンプルから分析可能な生体分子を回収するための重要なファクター

3.1 脱パラフィン

FFPE サンプルから核酸およびタンパク質精製を開始する前に、脱パラフィンが必要になります。これはパラフィンを溶解し除去するプロセスで、次の溶解バッファーと、条件によっては Proteinase K によるサンプル処理のために必要です。脱パラフィンには様々な溶媒が適していますが、精製操作に応じた溶媒を選択する必要があります。

Proteinase K によるサンプル処理とシリカメンブレンへの核酸結合を利用した DNA あるいは RNA の精製では、様々な疎水性溶媒を脱パラフィンに使用可能です。例としては、キシレン、ヘプタン、リモネンがあります。FFPE サンプルからのタンパク質精製に関しては、タンパク質をウエスタンブロットなどのダウンストリームアプリケーションに使用する際には、キシレンによる脱パラフィンが最適です。しかし、2D-PAGE のようなアプリケーションでは、効率的な脱パラフィンを実現するためにヘプタンのみを使用してください。

QIAGEN がお届けする斬新な Deparaffinization Solution を使用することで、FFPE サンプルからの DNA や RNA の精製前に行なう脱パラフィン操作はより簡便になります。Deparaffinization Solution は FFPE サンプルに添加した後もサンプル上に留まり、Proteinase K による分解が同時に行なわれます。Deparaffinization Solution の添加後、FFPE サンプルをペレット化する必要はなく、パラフィンを含む上清を除去する必要もありません。従って脱パラフィン操作の際にサンプルを失うリスクは回避されます。

溶媒を使用しない方法としては、加熱により FFPE サンプルからパラフィンを分離する方法があります。パラフィンが融解され、その後冷却されると、パラフィンの量によりパラフィンはチューブの壁に付着するかサンプルの上一枚の固体状の層を形成します。

脱パラフィン用
ソリューション

生体分子の精製を制限するホルマリン・クロスリンク

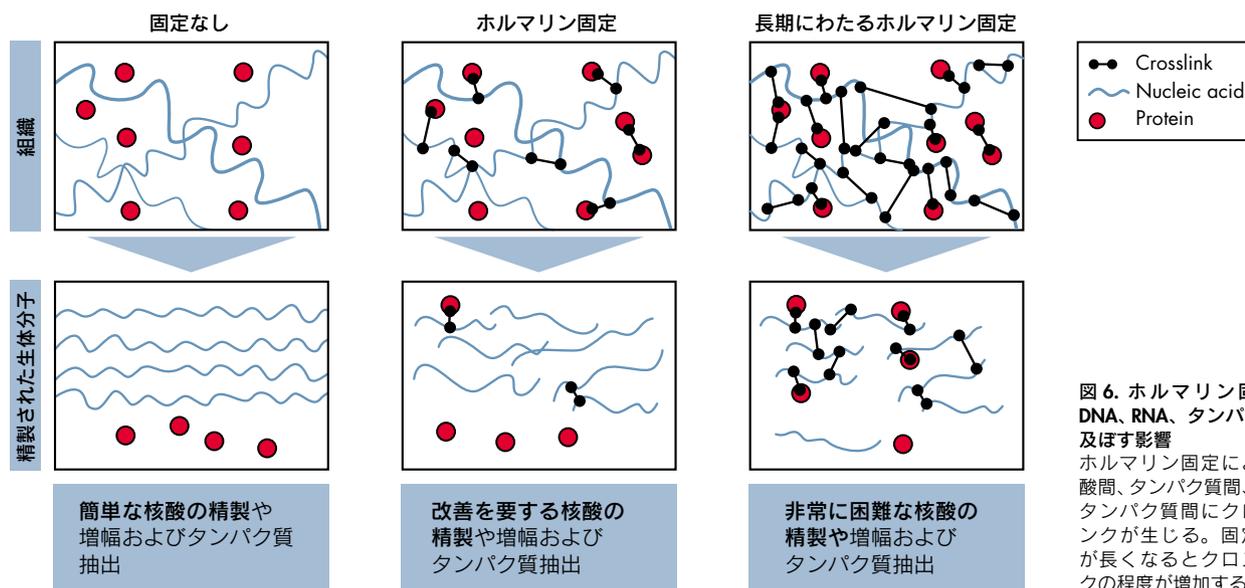


図 6. ホルマリン固定が DNA、RNA、タンパク質に及ぼす影響
ホルマリン固定により核酸間、タンパク質間、核酸・タンパク質間にクロスリンクが生じる。固定時間が長くなるとクロスリンクの程度が増加する。

3.2 ゲノム DNA 精製

FFPE サンプル中の DNA 分子は DNA 同士だけでなく、RNA やタンパク質分子にもクロスリンクするので、その後の精製操作で DNA を遊離させるためにクロスリンクを解離することが必要です。化学的に修飾された DNA は精製操作中に効率よく回収されず、PCR や他の酵素アッセイの基質として良好に機能しないため、クロスリンクに基づく化学修飾も可能であれば元の状態に戻さなければなりません。しかし、クロスリンクを解離したり、化学修飾を元の状態に戻す場合、それらの苛酷な反応条件がさらに DNA の断片化を引き起こす可能性があるので注意が必要です。

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

クロスリンクの問題を解決する効率的な一つの方法は、FFPE サンプルからのゲノム DNA 精製に特化された QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit を使用することです。まずサンプルを Proteinase K で 56°C、1 時間処理し、クロスリンクしたタンパク質を分解することで、DNA の遊離を促します。次に、部分的にクロスリンクを解離するために最適化されたバッファー中で 90°C のインキュベーションを行ないます。このインキュベーション中に、アミノ基の間のメチレンクロスリンクが壊れ、遊離したホルムアルデヒド分子がアクセプター分子に結合します。

過度の加熱は DNA 分解につながりますが、QIAGEN R&D では、1 時間 90°C のインキュベーションにより、分析可能なゲノム DNA が最適に回収されることを明らかにしました (図 7、8)。データはまた 56°C で 1 時間のインキュベーションに続いて 90°C で 1 時間のインキュベーションを行なえば、Proteinase K 分解を一晩行なう必要がないことを示しています。

図 7. ゲノム DNA を最適に回収

ラット肝の FFPE 切片を Proteinase K と 56°C で 1 時間処理した後、表記条件でさらにインキュベートした。コントロールとして、1 サンプルは Proteinase K と 56°C で 1 晩インキュベートした。QIAamp DNA FFPE Tissue Kit を用いてゲノム DNA を精製し、分光光度計で DNA 収量を測定した。90°C のインキュベーションは 80°C や 56°C で一晩のインキュベーションよりも高い回収率で DNA を精製できた。

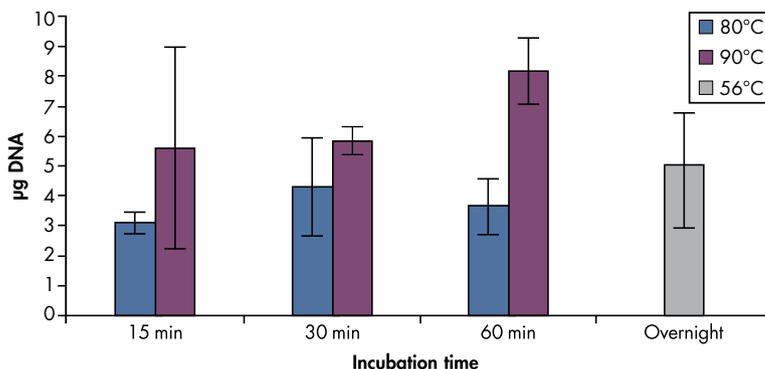
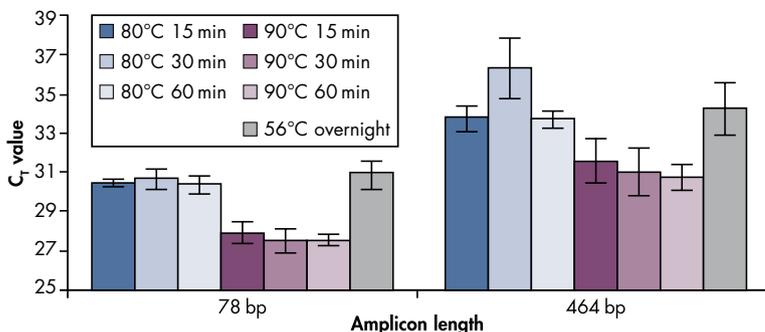


図 8. FFPE 組織から実験に利用できるゲノム DNA の回収

ラット肝の FFPE 切片を Proteinase K と 56°C で 1 時間処理した後、表記条件でインキュベートした。QIAamp DNA FFPE Tissue Kit を用いてゲノム DNA を精製し、QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit と Pmp2 遺伝子に特異的な 2 種類のプライマーペアを用いて SYBR Green ベースのリアルタイム PCR を行なった。得られた増幅産物のサイズは 78 bp あるいは 464 bp であった。90°C のインキュベーションでは、80°C のインキュベーションより低い C_T 値が得られた。これは 90°C のインキュベーションではクロスリンクの解離がより効率的に行なわれ、リアルタイム PCR 解析のための DNA が多く得られたことを示唆している。コントロールとして、1 サンプルは Proteinase K と 56°C で 1 晩インキュベートした。



3. FFPE サンプルから分析可能な生体分子を回収するための重要なファクター

2 回のインキュベーションステップの後、QIAamp MinElute® スピニングカラムを用いて DNA を精製します。DNA をシリカゲルメンブレン上に結合し、コンタミを洗浄により除去し、少量（20 ~ 100 μ l）で溶出します。サンプルの RNase A 分解はオプションで、DNA のシリカゲルメンブレンへの結合前に行なえます。このステップは、RNA コンタミの影響を受けやすい高感度なダウンストリームアプリケーションで DNA を分析する場合に非常に重要です。RNA のコンタミにより吸光度値が上昇し、DNA 収量の過大評価につながるため、精製した DNA を分光光度計で定量しなければならない場合も RNase A 分解は必須です。標準化と簡便さを高めるために、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit を用いた DNA の自動化精製が QIAcube™ で可能です（3.8 章参照）。

最適な溶解およびインキュベーション条件により FFPE サンプルから DNA を遊離し、ホルムアルデヒド修飾を部分的に解離できますが、精製 DNA をダウンストリームアッセイで使用するにはいくつかの問題があります。まず、固定ステップでの化学修飾は不要な配列変化を引き起こし、DNA の安定性と酵素アッセイの効率を低下させ、 A_{260}/A_{280} の測定による純度分析を困難にすることがあります。次に FFPE サンプル中の DNA は、時間の経過と共にますます断片化されるので、短い配列（例えば、PCR のアプリケーションで、短い増幅産物を生成するためのプライマーを設計する必要がある）の分析のみが可能です。さらに、短い DNA 断片では吸光度の数値が高くなるために、DNA 収量の過大評価につながる可能性があります。

注：QIAamp DNA FFPE Tissue Kit はホルマリンで固定したサンプルからの DNA 精製用に特化されています。DNA を完全に破壊するピクリン酸などの試薬で固定したサンプルには使用できません。



3.3 全ゲノム増幅

FFPE サンプルが希少なため精製される DNA 量が少なく、実施できる分子解析の回数は制限されます。高い増幅能力の DNA ポリメラーゼによりゲノム全体を増幅する Whole Genome Amplification (WGA) 法で DNA サンプル量を増加することができます。しかし FFPE サンプル由来の断片化した DNA で全ゲノム増幅を開始するのは困難です。

この目的のために改良された WGA 法を採用した REPLI-g® FFPE Kit は、FFPE サンプルからゲノム DNA の増幅を可能にし、増幅前の DNA 精製は不要です。まず断片化 DNA はランダムにライゲートして長鎖の DNA 分子を生成します。その後、高い増幅能力をもつ DNA ポリメラーゼにより WGA が行なわれます。DNA 断片は正しい順序で再構築されていないものの、アプリケーションによっては信頼性の高い DNA 分析が可能です。例えば、できるだけ短い増幅産物を生成するようにプライマーが設計されている場合、PCR およびリアルタイム PCR 解析を行なうことができます（図 9）。データは 358 bp フラグメントでも PCR 増幅が成功した例を示していますが、FFPE サンプルの DNA が断片化され、ホルムアルデヒド修飾により判読可能な DNA 配列の長さが短くなるために、約 100 bp の増幅産物を生成するように PCR アッセイをデザインすることを推奨します。

REPLI-g FFPE Kit

3. FFPE サンプルから分析可能な生体分子を回収するための重要なファクター

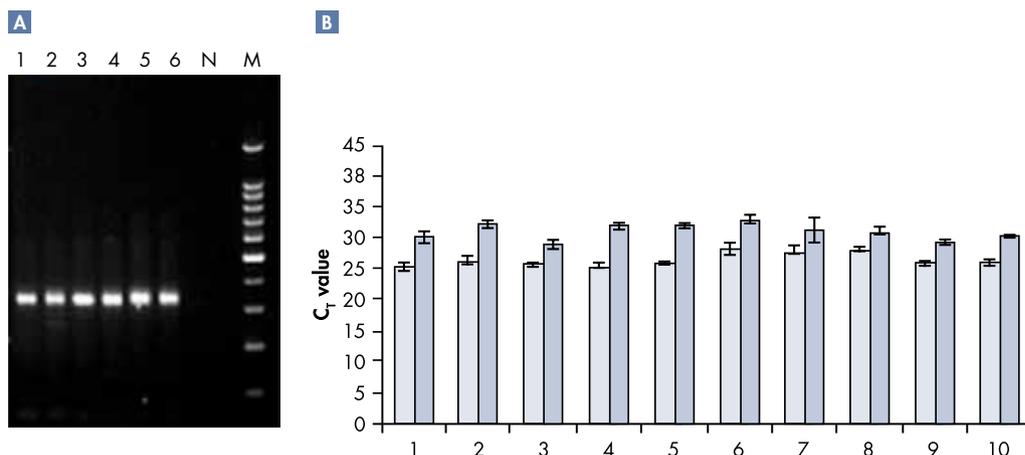


図 9. FFPE 組織からのゲノム DNA を用いた信頼性の高い PCR およびリアルタイム PCR

A 6 種類のヒト肝 FFPE サンプル (11 年間保存) から REPLI-g FFPE Kit を用いて WGA を行なった。得られた DNA サンプルを、QIAGEN Fast Cycling PCR Kit を用いて Eppendorf® Mastercycler® ep gradient S でエンドポイント PCR を行ない、358 bp の塩基配列を増幅した。1 ~ 6 : DNA サンプル ; N : no template control ; M : マーカー。 **B** 2 種類のヒト肝 FFPE サンプル (11 年間保存) から REPLI-g FFPE Kit を用いて WGA を個別に 10 回行なった。QuantiFast SYBR Green PCR Kit および Stratagene® Mx3005P cycler を用いてリアルタイム PCR を行ない、100 bp シークエンスを増幅した。

3.4 Bisulfite 変換

DNA メチル化解析における最初のステップで、非メチル化シトシンをウラシルに変換する Bisulfite 変換を行ないます。メチル化シトシンは Bisulfite 変換による影響を受けないので、これらを PCR あるいはリアルタイム PCR で検出、あるいはパイロシークエンス (Pyrosequencing®) 法により定量することができます。しかし Bisulfite 変換には高温かつ低 pH でのインキュベーションが必要なために、DNA の断片化が生じます。このことは、既に著しく断片化されている FFPE サンプル由来の DNA を取り扱う際に問題になる可能性があります。

この目的に特化した EpiTect® Plus FFPE Bisulfite Kit は、FFPE サンプルから DNA を回収し、さらに DNA を分解することなく Bisulfite 変換を実現します。まず、本キットでは至適化済みの脱パラフィンステップにより、手作業を最小限に抑えて時間を節約しながら DNA 収量を最高にします。脱パラフィン後、サンプルを最初に Proteinase K で 56°C、30 分処理することにより、クロスリンクしたタンパク質を分解して DNA を遊離します。その後、画期的なバッファーで 95°C、1 時間のインキュベーションを行ない、部分的に DNA のクロスリンクを解離します。このインキュベーション中に、アミノ基間のメチレンクロスリンクは壊れます。過度の加熱は DNA 分解の原因になりますが、QIAGEN R&D での実験結果では、95°C で 1 時間のインキュベーションにより、精製なしに Bisulfite 変換ステップで使用可能なゲノム DNA を最適に回収できます (図 10)。Bisulfite 変換中の DNA の化学分解は、革新的な DNA 保護テクノロジーにより保護されています。

EpiTect Plus
FFPE Bisulfite Kit

3. FFPE サンプルから分析可能な生体分子を回収するための重要なファクター

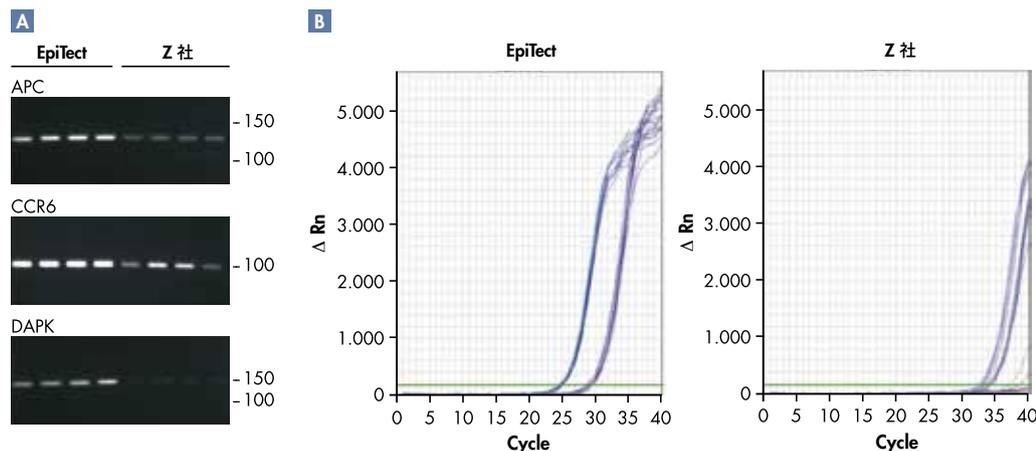


図 10. FFPE 組織サンプル由来の DNA を Bisulfite 変換した後の PCR 解析

EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit あるいは Z 社のキットを用いて、ラット肝の FFPE 組織切片 (10 μ m) から DNA を精製した。A 表示した遺伝子を検出するために、PyroMark™ PCR キットを使用してエンドポイント PCR を行なった。アガロースゲル電気泳動では、Z 社のキットで精製したテンプレートと比較すると、EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit を用いて精製したテンプレートから非常に安定した高い収量の DNA が得られたことを示した。B GSTP 遺伝子に対応する 2 種類のサイズの増幅産物 (156 および 279 bp) を検出するために、QuantiTect SYBR Green PCR Kit を用いてリアルタイム定量 PCR を行なった。4 サンプルに関して、各反応で 3 回の反復実験を行なった。左の増幅曲線は、EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit を用いて精製したテンプレートから、低い C_t 値と再現性の高い結果が両方の増幅産物で得られたことを示している。Z 社のキットを用いて精製したテンプレートからは、156 bp フラグメントしか増幅できず、しかも高い C_t 値であった (右側)。

3.5 トータル RNA および miRNA の精製

FFPE サンプル中の DNA に影響を与えるホルムアルデヒド修飾の問題は、RNA にも当てはまります (3.2 章参照)。RNeasy FFPE Kit および miRNeasy FFPE Kit はともに FFPE サンプルから RNA を精製するために特化されています (図 11、12)。RNA は熱処理によって容易に断片化されるので、最適化されたバッファー条件を使用し、インキュベーション温度は低く設定します。80°C を超えるインキュベーションにより RT-PCR での RNA のパフォーマンスがわずかに向上することがありますが、その結果、RNA の断片化の程度も高くなります。また、低い温度でのインキュベーションでは、収量が低下し、RT-PCR でのパフォーマンスが顕著に低下します。

FFPE サンプルは、まず Proteinase K で 56°C、15 分間処理することによりクロスリンクしたタンパク質分子から RNA 分子を遊離します。その後、80°C で 15 分間インキュベートしてホルムアルデヒド修飾を部分的に元に戻します。次に、DNA コンタミを回避するため、そしてリアルタイム RT-PCR などのダウンストリームアッセイを損なう可能性のある微量の小さな DNA 断片も除去するために、RNA を DNase Booster および DNase で処理します。その後、RNeasy MinElute スピнкаラムを用いて RNA を精製します。このステップで RNA はメンブレンに結合し洗浄され、そして最終的に 15 ~ 30 μ l の RNase フリー水で溶出されます。結合条件により異なりますが、約 70 nt までのトータル RNA (RNeasy FFPE Kit) あるいは約 18 nt までの miRNA を含むトータル RNA (miRNeasy FFPE Kit) が精製されます。RNA は断片化されやすいため、small-RNA の濃縮画分を別途精製するのは実用的ではありません。標準化と簡便化を増大するために、RNeasy および miRNeasy FFPE Kit を用いた RNA 精製を QIAcube 上で自動化することも可能です (3.8 章参照)。

RNeasy FFPE Kit

miRNeasy FFPE Kit

3. FFPE サンプルから分析可能な生体分子を回収するための重要なファクター

図 11. FFPE サンプル由来の RNA を用いたリアルタイム RT-PCR 解析

RNeasy FFPE Kit を用いてラット腎臓 FFPE サンプルからトータル RNA を精製した。PGK1 (phosphoglycerate kinase 1) のためのリアルタイム RT-PCR アッセイを Rotor-Gene™ Q サイクル上で、逆転写酵素を添加 (+RT) あるいは添加しない場合 (-RT) で行なった。-RT 曲線は、RNeasy FFPE Kit を用いて精製した RNA がゲノム DNA をほぼ含まないことを実証した。

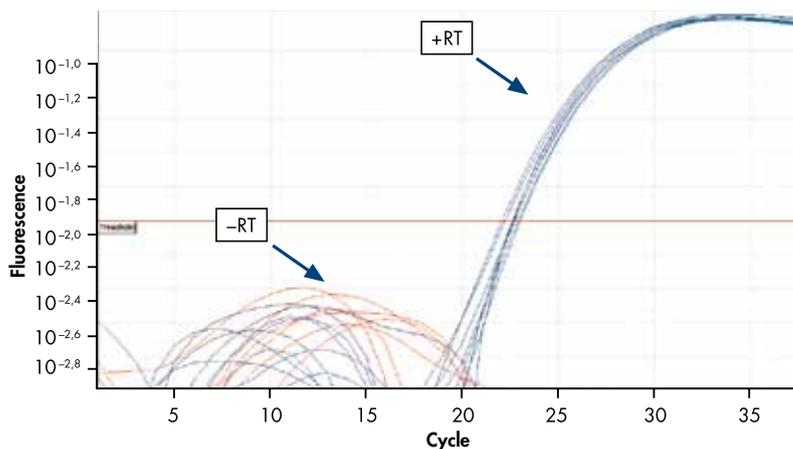
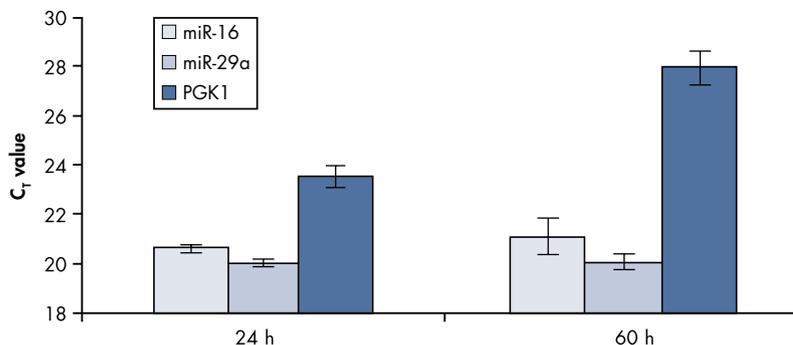


図 12. FFPE 組織からの効率的な miRNA 精製

ラット肝臓組織をホルマリンで 24 時間あるいは 60 時間固定し、miRNeasy FFPE Kit を用いて miRNA を含むトータル RNA の精製を行なった。miRNA miR-16 および miR-29a、PGK1 遺伝子の mRNA を検出するために、miScript PCR System によるリアルタイム定量 RT-PCR のテンプレートとして精製した RNA を用いた。これらの結果は同じ溶出液から miRNA と mRNA の検出に成功したことを示している。



3.6 タンパク質精製

核酸とは異なり、FFPE サンプル中のタンパク質の断片化が問題になることはありません。従って完全長のタンパク質の分離が可能です。しかし、FFPE サンプルからタンパク質を抽出する際にいくつか考慮すべき事項があります。まず、高純度に精製されたタンパク質ではなく FFPE サンプルのライセートがダウンストリームアプリケーションで必要とされる場合、パラフィンを徹底的に除去する必要があります。また Proteinase K および強力な変性剤はタンパク質の分解を引き起こすので、ホルマリンのクロスリンク解離に使用することはできません。

タンパク質の精製効率は、切片の厚みに影響されます。サンプルを 10 ~ 15 μm の厚さにすることを推奨します。収量は切片あたりの組織量と組織の特性により異なります。3 切片 (10 μm) から得られる典型的な収量は、肝臓から 1.5 μg/μl、脳組織から 1.6 μg/μl です。

Qproteome FFPE Tissue Kit

Qproteome FFPE Tissue Kit は、FFPE サンプルから完全長のタンパク質を効率的に回収するために独自のテクノロジーを使用しています。組織切片からパラフィンを除去するためにキシレンで複数回処理した後、最適化された抽出バッファーで 2 回インキュベートします。ホルマリンのクロスリンクを解離するために、最初のインキュベーションは 100°C で 20 分間行ないます。2 回目はタンパク質の可溶化を最大限にするために 80°C で 2 時間行ないます。結果として 100 μl の容量をもつタンパク質含有ライセートが得られ、質量分析やウエスタンブロット解析などのアプリケーションに最適です (図 13)。

3. FFPE サンプルから分析可能な生体分子を回収するための重要なファクター

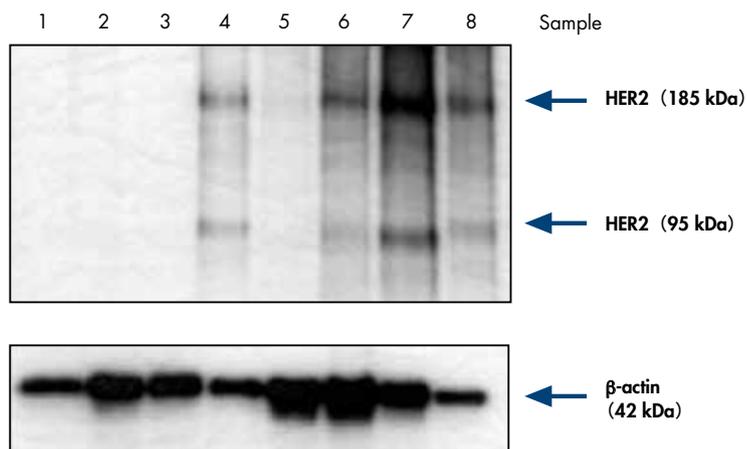


図 13. 乳がん生検からの HER2 検出

乳房組織の FFPE サンプル 8 つを Qproteome FFPE Tissue Kit で処理し、タンパク質を SDS-PAGE で分離した。ウエスタンブロットの後、HER2 (上部パネル) または β -actin (下のパネル、コントロール) の抗体で検出した。FFPE 組織から抽出したタンパク質サンプルで HER2 の p185 および p95 フォームがともに検出された (Data kindly provided by Karl-Friedrich Becker and Christina Schott, Technical University of Munich, Germany.)。



AllPrep DNA/RNA
FFPE Kit

3.7 複数の生体分子を同時精製

同一 FFPE サンプルから DNA と RNA の両方を精製した場合、ゲノムとトランスクリプトームのデータを高い信頼性で比較することができます。健常細胞と悪性細胞が不均一に分布している腫瘍組織を取り扱う際には、これは特に重要です。同じサンプルでも異なる切片では、それらの細胞組成が異なる可能性があります。DNA および RNA を別々に精製するためにサンプルを分割すると、性質の異なる可能性のある細胞集団から DNA および RNA を精製することになります。FFPE サンプルは希少で、回収が難しく、また量が限られているために、同一サンプルからの DNA と RNA の同時精製により、サンプルの浪費を回避できます。

しかし、同一サンプルから DNA と RNA を分離するためには大きな問題があります。断片化 DNA が短く、部分的に一本鎖であり、インタクトな DNA よりも RNA に類似していることです。この断片化 DNA の特性のために DNA および RNA の物理的な分離は困難です。AllPrep® DNA/RNA FFPE Kit は、特許申請中の溶解法により同一 FFPE サンプルから DNA と RNA を別々に遊離できます。この方法では、FFPE サンプルを至適化済みの溶解バッファーとインキュベートすることで、RNA が遊離し DNA は沈殿します。遠心操作後、RNA を含む上清と DNA を含むペレットは別々の操作により精製されます。さらにインキュベーションにより部分的にクロスリンクは切断され、その後 RNeasy MinElute スピニングカラムあるいは QIAamp MinElute スピニングカラムを用いて RNA あるいは DNA を精製します。精製 RNA に関しては、カラム上での DNase 処理によりコンタミした DNA を効率的に除去します (図 15C)。

RNA の結合条件によって、miRNA などの small RNA を含む RNA、または含まない RNA の精製が可能です。スピニングカラム処理を行なう前に DNA と RNA は既に分離されているため、精製された DNA の RNA コンタミは最小限に抑えられています。オプションでカラム上での RNase 処理を行なうこともできます。

AllPrep DNA/RNA FFPE Kit を用いて精製した DNA および RNA は、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit および RNeasy FFPE Kit/miRNeasy FFPE Kit を用いてそれぞれ精製した DNA および RNA に匹敵する品質を持っています (図 14)。従って精製した核酸は、リアルタイム PCR、RT-PCR (図 15) あるいはパイロシーケンスなどのダウンストリームアプリケーションに最適です。

3. FFPE サンプルから分析可能な生体分子を回収するための重要なファクター

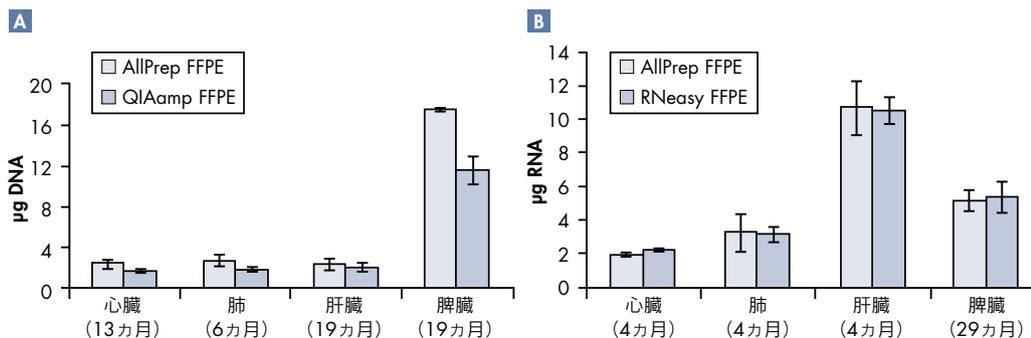


図 14. FFPE サンプルからの DNA および RNA 精製

A 室温で表記期間保存した様々なラット FFPE 組織からゲノム DNA を精製した。AllPrep DNA/RNA FFPE Kit あるいはコントロールとして QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (FFPE サンプルからの DNA 精製用キット) を用いて精製した。両キットともに RNase 分解ステップを実施した。各サンプルの切片 (20 µm) から得た DNA 収量を、吸光度を測定して計算した。
B 室温で表記期間保存した様々なラット FFPE 組織から RNA を精製した。AllPrep DNA/RNA FFPE Kit あるいはコントロールとして RNeasy FFPE Kit (FFPE サンプルからの RNA 精製用キット) を用いて精製した。各サンプルの切片 (10 µm) から得た RNA 収量を、吸光度を測定して計算した。AllPrep Kit は、FFPE サンプルから DNA/RNA をそれぞれ分離精製する専用の DNA/RNA 精製キットと同様の性能を示した。

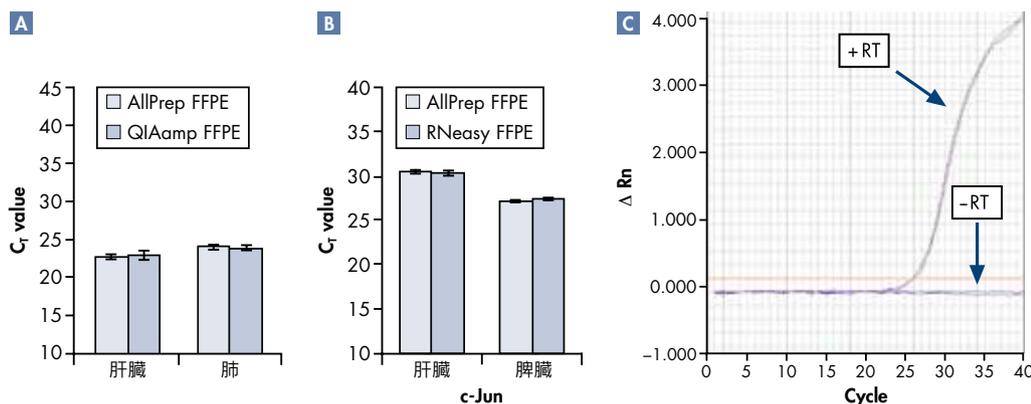


図 15. FFPE サンプル由来の DNA および RNA を用いた信頼性の高い増幅

AllPrep DNA/RNA FFPE Kit、あるいはコントロールとして FFPE サンプルからの DNA または RNA 精製用キット (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, RNeasy FFPE Kit) を用いて様々なラット FFPE 組織から DNA (A) および RNA (B, C) を精製した。Prnp 遺伝子の増幅産物 (78 bp) の解析には QuantiTect SYBR Green PCR Kit (A) を、発がん遺伝子 Jun の発現解析には QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (B, C) を用いて、ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System でリアルタイム PCR あるいは RT-PCR を行なった。AllPrep Kit による精製は、専用キットで精製した核酸で得られた Ct 値と同等であったことから、同等品質の DNA や RNA を効率よく精製できることを示唆している。C さらに逆転写酵素なし (-RT) で Jun 遺伝子の発現解析を行なった。DNA リッチな組織である脾臓サンプルの増幅曲線はゲノム DNA コンタミが実質上ないことを示した。

3.8 回収および精製の自動化

FFPE からの分析対象になる生体分子の自動化精製は、精製プロセスの標準化を促進し、手作業を軽減します。また、複数のサンプルを処理する際に有用です。QIAcube は、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (3.2 章)、RNeasy FFPE Kit および miRNeasy FFPE Kit (3.5 章) などの QIAGEN の各種スピナラムキットを自動化し、低スループットの自動化精製 (1 ランあたり最高 12 サンプル) を可能にします。低から中程度のスループットで FFPE サンプルから DNA を精製する場合は、EZ1 Advanced 装置と、EZ1 DNA Paraffin Section Card および EZ1 DNA Tissue Kit を用いて 1 ランあたり 1 ~ 6 個、あるいは 1 ~ 14 個の FFPE サンプルから DNA を精製できます。EZ1 Advanced 装置は、試薬カートリッジにより簡便かつ高い安全性で高速な自動化精製工程を実現し、データ管理も簡単に行なえます。

QIAcube

EZ1 Advanced

4. FFPE サンプルの分子解析の成否を決定する重要なファクター



FFPE サンプルの分子解析の成否を決定する重要なファクター

本誌で既に記載したように、ホルマリン固定およびパラフィン包埋により、FFPE 組織サンプルから得られた核酸の品質が損なわれることがあります。本章では、低品質の生体分子が FFPE サンプルの分子解析にどのように悪影響を及ぼすかを説明し、この問題を克服するために必要な手順をご紹介します。

調製および保存

回収と解析



4. FFPE サンプルの分子解析の成否を決定する重要なファクター

4.1 RNA の品質チェック

RNA サンプルの品質チェックを行なう際に測定する一般的なパラメータとして、260 nm と 280 nm での吸光度比（高純度 RNA の A_{260}/A_{280} 比は、10 mM Tris-Cl、pH 7.5 で 1.9 ~ 2.1）と、28S rRNA と 18S rRNA の比率（2 : 1 の比率は、インタクトな RNA を示す）があります。QIAxcel™システムなどのキャピラリー電気泳動による RNA サンプルの解析は、RNA 断片化の状態を示します（図 16）。QIAxcel システムは最高 96 の RNA サンプルをマニュアル操作なしで解析可能です。また、本システムは、すぐに実施可能なゲルカートリッジにより取り扱いが簡便で、他の品質管理システムよりも迅速に分析を実現します。

QIAxcel System

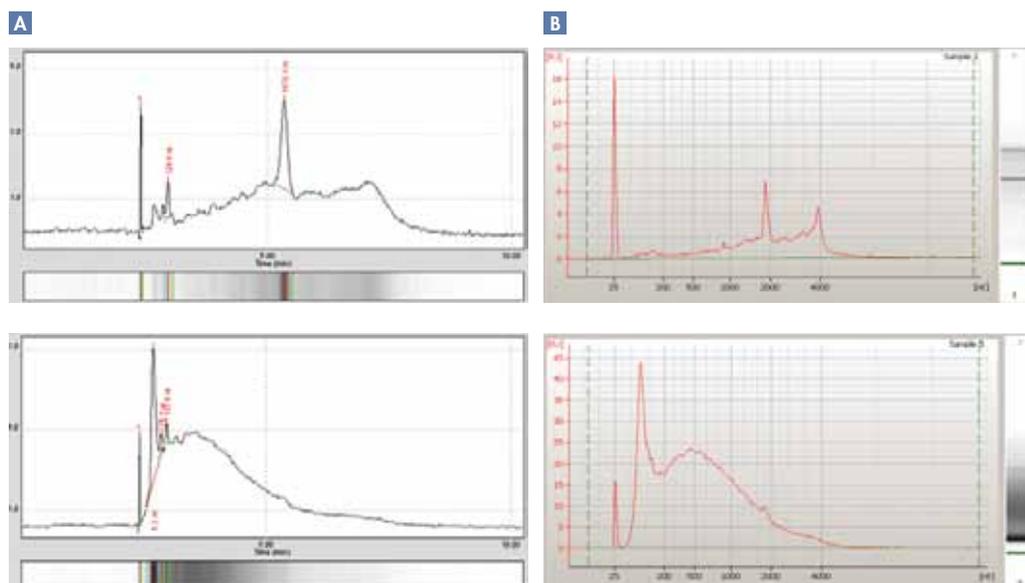


図 16. FFPE サンプル由来の RNA の品質チェック

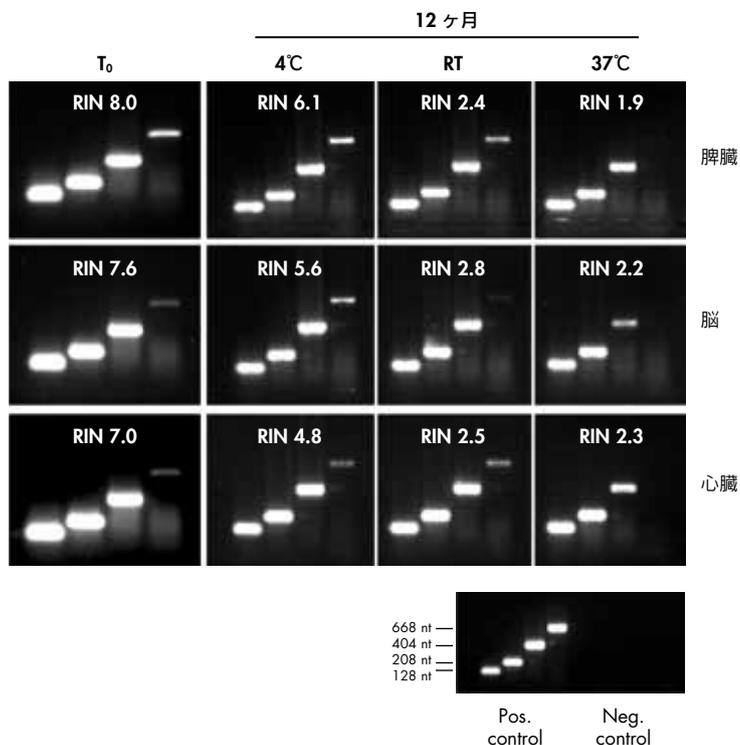
ラット腎臓サンプルをホルマリン固定し、パラフィンで包埋した。包埋直後（上図）、あるいは 12 ヶ月の保存後（下図）に切片を作製し、RNeasy FFPE Kit を用いてトータル RNA を精製した。精製した RNA を QIAxcel（**A**）あるいは Agilent 2100 BioAnalyzer（**B**）で解析した。

4. FFPE サンプルの分子解析の成否を決定する重要なファクター

Agilent 2100 Bioanalyzer などのシステムでは、1 から 10 で表示される RIN (RNA Integrity Number) などのツールが提供されています。RIN 値が 10 を示す場合は RNA が非常にインテクトであることを示し、RIN 値が 1 を示す場合は RNA が高度に断片化されていることを示します。これらのパラメータにより、RNA の純度と分解度を予測できますが、化学修飾に関する情報を提供しているわけではありません。前述したように、ホルマリン固定は分子間にクロスリンクを引き起こし、ホルムアルデヒドによる RNA の修飾は、RT-PCR のようなダウンストリームにおける酵素アッセイを損なうことがあります (図 17)。

図 17. ホルマリン固定パラフィン包埋が RT-PCR 効率に及ぼす影響

様々なラット組織をホルマリン固定パラフィン包埋した。包埋後 3 日目 (T₀) または 4℃、20 ~ 25℃、37℃ で 1 年間保存後に、RNeasy FFPE Kit を用いて RNA を精製した。RNA の分解度を Agilent 2100 Bioanalyzer で解析し、RIN を上部に示した。エレクトログラムは 9 ページの図 4 に示されている。128、208、404、668 nt の増幅産物を生成するラット Hprt1 遺伝子に特異的なプライマーペアと QIAGEN OneStep RT-PCR Kit を用いた 1 ステップ RT-PCR に、精製した RNA を使用した。ポジティブコントロールとして、新鮮な組織から精製した RNA を用いて RT-PCR を行ない、ネガティブコントロールとして、テンプレートなしで RT-PCR を行なった。結果は、長いセグメントの増幅が FFPE サンプルで損なわれたことを示している。さらに、PCR 性能は RNA 分解度と相関関係はなかった。これはほとんどのサンプルで、ホルムアルデヒドは RNA の化学修飾に影響するが RNA フラグメントの長さには影響しないためである (Data excerpted from von Ahlfen et al. [2007] Determinants of RNA quality from FFPE samples. PLoS ONE 12, e1261.)。



従って、FFPE サンプルからの RNA 品質をチェックするためには、1) 増幅産物のサイズの上限を決定するために、RT-PCR アッセイの際、コントロールとして異なる長さの増幅産物を得ることができる各種プライマーセットを追加する方法と、2) oligo-dT-primed cDNA を用いた場合で、RNA 転写物の 3' 末端から徐々に離し、かつ同じサイズの増幅産物を生成するような各種プライマーセットを設計して RT-PCR アッセイを行なう方法の 2 つのアプローチが考えられます。増幅反応の成功率により、全転写物における RNA の分解度が示唆されます。しかし FFPE サンプルから精製した RNA は断片化されており、2) の方法は推奨できないため (4.3 章参照)、1) の方法を利用してください。

高度に断片化した RNA サンプルの Agilent 2100 Bioanalyzer 分析で、RIN が約 4 またはそれ以下の場合、QIAGEN で実施した実験ではその RIN はあまり有用ではなく再現性がありません。強く分解した RNA の場合は、RNA の分解度の指標としてピークのフラグメントの高さ (電気泳動図から推定可能) を使う方が良いと考えられます。

4. FFPE サンプルの分子解析の成否を決定する重要なファクター

4.2 PCR およびリアルタイム PCR による DNA 解析

本誌で既述したように、FFPE サンプルのゲノム DNA はしばしば著しく断片化され、また、ホルマリンクロスリンクにより修飾されています。QIAamp DNA FFPE Tissue Kit を用いたゲノム DNA の精製によりクロスリンクの一部が解離されますが、その他は不可逆的なクロスリンクであり精製後も残留します。このような増幅困難なテンプレートは、適応性の高い PCR システムを使用して効率的に増幅することが必要です。スタートテンプレートの一部のみが増幅可能なため、感度と特異性の高い PCR を行なうことが、FFPE サンプルからの検出を成功させるための前提条件です。QIAGEN のユニークな PCR Buffer と組み合わせた HotStarTaq[®] DNA Polymerase および HotStarTaq Plus DNA Polymerase は、このタイプのスタートテンプレートから高感度な PCR を実現します。さらに、FFPE サンプル由来のゲノム DNA で PCR やリアルタイム PCR 解析を行なう場合には、できるだけ短い増幅産物を生成するようにデザインすることを推奨します。



4.3 リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析

遺伝子発現解析は、サンプルから精製した RNA をまず逆転写酵素により cDNA に変換し、必要な cDNA ターゲットをリアルタイムで増幅・検出するリアルタイム RT-PCR 法により実施することができます。

プライマーが cDNA およびゲノム DNA 配列の両方を増幅するようにデザインされている場合、RNA サンプル中のゲノム DNA コンタミの存在は、リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析の精度に悪影響を与えます。従って、正確な結果を得るためにゲノム DNA コンタミの除去は不可欠です。分離した RNA に存在する微量のゲノム DNA 断片を除去するステップが組み込まれている RNeasy FFPE Kit、miRNeasy FFPE Kit、AllPrep DNA/RNA FFPE Kit を用いて RNA を精製することによりこの目的を達成できます。さらに、リアルタイム RT-PCR は、QuantiTect Reverse Transcription Kit を用いて cDNA 合成し、続いて QuantiFast PCR Kit による増幅を行なう 2 ステップアプリケーションとして実施できます。QuantiTect Reverse Transcription Kit は、cDNA 合成中にゲノム DNA のコンタミを除去するために斬新な gDNA Wipeout テクノロジーを採用しています。あるいは、リアルタイム RT-PCR 前にゲノム DNA コンタミを除去する QuantiFast[™] Probe RT-PCR Plus Kit を用いて 1 ステップのリアルタイム RT-PCR も可能です。ゲノム DNA 含量と遺伝子発現のレベルにより異なりますが、QuantiFast Probe RT-PCR Plus Kit を用いて得られる C_T 値が、他の方法よりも有意に高くなることがあります。これはキットの PCR 感度が低いからではなく、キットが cDNA のみを検出し、cDNA とゲノム DNA の両方を検出しないためです (図 18)。

QuantiFast Probe
RT-PCR Plus Kit

4. FFPE サンプルの分子解析の成否を決定する重要なファクター

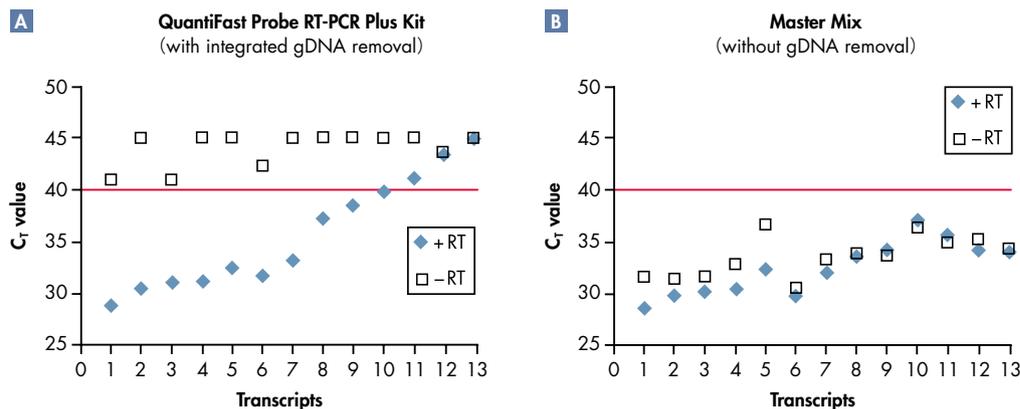


図 18. 正確な遺伝子発現解析のための効率的なゲノム DNA 除去
ヒト乳房、肝臓、腎臓 FFPE サンプルから RNeasy FFPE Kit を用いてトータル RNA を精製した。逆転写ステップを実施 (+RT) あるいはなし (-RT) で、QuantiFast Probe Assays (FAM™ 標識) を用いて異なる発現レベルを持つ様々なターゲットの duplex リアルタイム RT-PCR を行なった。QuantiFast Probe RT-PCR Plus Kit (A) あるいはゲノム DNA 除去ステップが組み込まれていないマルチプレックス PCR 用キット (B) を使用した。全ての反応は ABI StepOnePlus™ サーマルサイクラーで行なった。A -RT サンプルで Ct 値が高いことは増幅がなくゲノム DNA のコンタミがないことを示す。従って +RT サンプルで得られた Ct 値は、正確で信頼性の高い RNA 検出を反映している。ターゲット 12 (TUSC2) および 13 (EZH2) は発現しておらず、これらの結果は、QuantiFast Probe RT-PCR Plus Kit がゲノム DNA を効率的に除去したことを示唆している。B -RT および +RT サンプルで類似した Ct 値が得られたことは、混入しているゲノム DNA を検出し、これらの結果が信頼性の低いことを示している。

逆転写反応で最も汎用されるプライマーは、ランダムヘキサマーまたはオリゴ dT プライマーです。しかしこれらのプライマーは、FFPE 組織から化学的に修飾され、断片化された RNA との使用には適していません。オリゴ dT プライマーを使用すると、逆転写は mRNA 転写産物の poly-A tail から始まります。従って、RNA がホルムアルデヒドにより著しく断片化または修飾されている場合、転写産物の 3' 末端に対応する cDNA のみが合成されます。ランダムヘキサマーは、特にプロファイリング研究 (例; マイクロアレイ解析) に適しています。しかしこれにも限界があり、シングル遺伝子の発現研究を行なう場合は問題が生じます。目的の増幅産物に近いランダムヘキサマーのみが、リアルタイム PCR 解析に必要なターゲット cDNA を合成します。このヘキサマーは逆転写反応において全ヘキサマーの一部にすぎないので、プライミング効率が非常に低くなります。

QuantiFast Probe Assays

リアルタイム RT-PCR で最適な結果を得るためには、目的の増幅産物に近い遺伝子特異的プライマーを逆転写反応に使用する必要があります。あるいは、QuantiTect Reverse Transcription Kit に入っているオリゴ dT プライマーとランダムオリゴマーのミックスを使用できます。さらに、リアルタイム PCR ステップのためのプライマーは、できるだけ短い増幅産物を生成するように設計する必要があります。生成される増幅産物が RNA 断片よりも長い場合、増幅されず、不正確な結果が得られます。典型的な FFPE サンプルからの RNA 断片のサイズは通常 50 ~ 300 ヌクレオチドの範囲であり、ほとんどのフラグメントのサイズは約 100 ヌクレオチドです。十分に確立された加水分解プローブテクノロジー (TaqMan® などの 5' ヌクレアーゼテクノロジー) に基づいた QuantiFast Probe Assays は、プローブベースのリアルタイム RT-PCR により FFPE サンプルの遺伝子発現解析を行なうために、独自のアルゴリズムを使用して設計されています。QuantiFast Probe Assays は 100 bp 未満の RNA および cDNA ターゲットの増幅と検出を高い効率と信頼性で実現します (図 19)。

4. FFPE サンプルの分子解析の成否を決定する重要なファクター

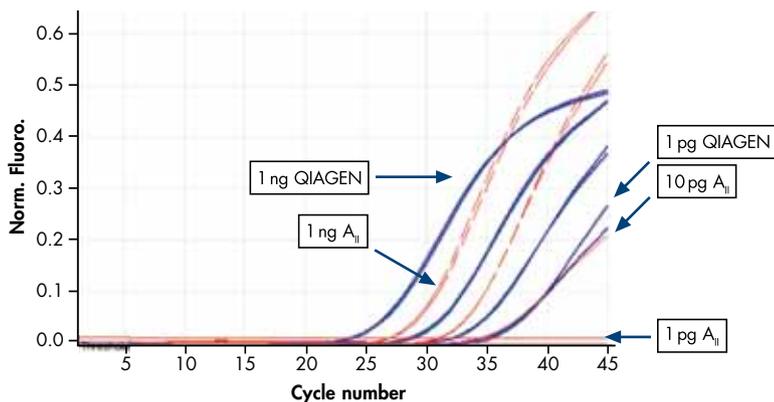


図 19. FFPE サンプル由来の RNA を用いて効率的なリアルタイム RT-PCR 検出

乳房 FFPE 組織サンプルから RNeasy FFPE Kit を用いてトータル RNA (1 ng、100 pg、10 pg、1 pg) を精製した。ヒト MUC1 遺伝子の転写物を、QuantiFast Probe RT-PCR Plus Kit と QuantiFast Probe Assay (青) あるいは Aii 社のデザイン済みアッセイ (赤) を用いて Rotor-Gene Q サイクルで増幅・検出した。Aii 社のアッセイを用いた結果に比べて、QuantiFast Probe Assay を用いた場合に得られた C_T 値はより低く、感度が高いことを示した。QuantiFast Probe Assay を用いてわずか 1 pg のテンプレートを検出できた (Aii 社のアッセイを用いた場合、1 pg のテンプレートを検出できなかった)。

FFPE サンプルは希少であるために少量の RNA しか回収されず、リアルタイム RT-PCR による解析数は制限されます。これは多数の遺伝子を分析する必要がある場合には重要な問題になる可能性があります。解析用の cDNA ターゲット量を増やすためには、逆転写反応とリアルタイム PCR ステップとの間に事前増幅ステップを導入できます。cDNA 合成の後に RT² FFPE PreAMP テクノロジーを用いて、特定のパスウェイや疾病状態に特異的な遺伝子由来の cDNA ターゲットを事前増幅してマルチプレックス PCR を行ないます。事前増幅の後、各 cDNA ターゲットは、適切な RT² Profiler PCR Array を用いたリアルタイム PCR により個々に定量化されます (図 20)。RT² FFPE PreAMP テクノロジーはリアルタイム PCR 解析の感度を高めるだけでなく、オリジナルの遺伝子発現プロファイルを保持します。

RT² FFPE PreAMP
technology

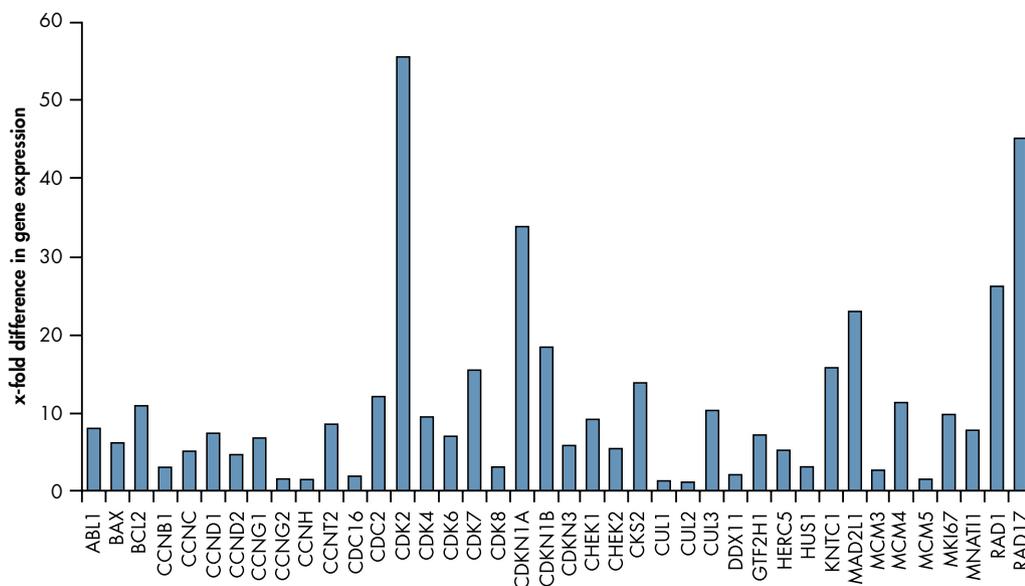


図 20. cDNA ターゲットの事前増幅後のアレイ解析

AllPrep DNA/RNA FFPE Kit を用いてヒト乳房 FFPE 組織からトータル RNA を精製した。RT² FFPE PreAMP テクノロジーを使用して RNA を逆転写し、事前増幅を行なった。Human Cell Cycle RT² Profiler PCR Array を用いてリアルタイム PCR による遺伝子発現を行ない、健常組織とがん組織を比較した。 $\Delta\Delta C_T$ 解析の結果、健常組織に比較してがん組織の遺伝子発現に数倍の差異が示された。

4. FFPE サンプルの分子解析の成否を決定する重要なファクター

4.4 パイロシーケンス法を用いたメチル化解析および突然変異解析

パイロシーケンス法は PCR 後 15 分程度の簡便かつ迅速な前処理で、塩基配列を高精度にシーケンシングするだけでなく、CpG 部位でのメチル化または突然変異など、目的の配列内の遺伝的変異を高い感度で正確に定量する斬新な技術です (図 21、22)。FFPE サンプル由来の DNA 分子は互いに、あるいは他の分子とクロスリンクしているため、パイロシーケンス解析前にこれらのクロスリンクの解離が必要になります。FFPE サンプルからゲノム DNA を精製する EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit (図 21) あるいは QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (図 22) は、ホルマリン固定によるクロスリンクを部分的に解離し (一部のクロスリンクは不可逆的)、増幅およびその後のパイロシーケンス解析に最適なテンプレート DNA を作製します。

図 21.
パイロシーケンス法を用いた DNA メチル化解析
EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit を用いてラット肝 FFPE 組織 (10 μm) から DNA を精製した。3 個の CpG 部位を持つ APC 遺伝子のセグメントを PyroMark PCR キットで増幅し、PyroMark Gold Q24 Reagent を用いてパイロシーケンス法で解析した。ピークパターンは高精度なシーケンスの結果を示すパイログラムであり、青色でハイライトされている箇所は、各 CpG 部位での高感度なメチル化定量解析結果を示す。黄色でハイライトされている箇所は、DNA が完全に Bisulfite 変換されていることを示すコントロール部位である。

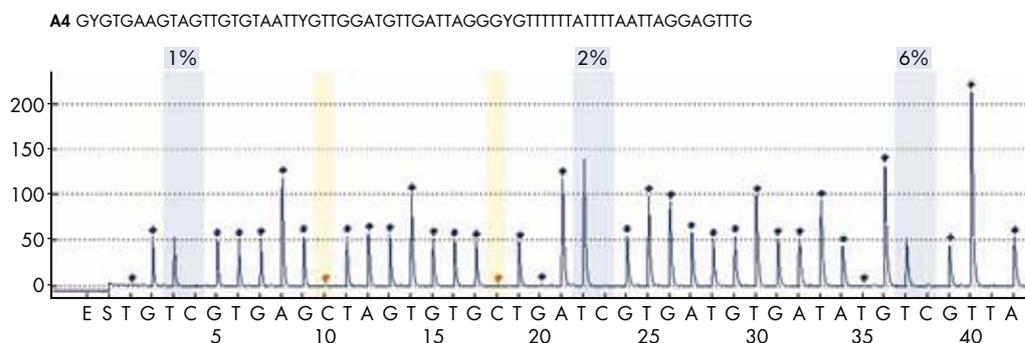
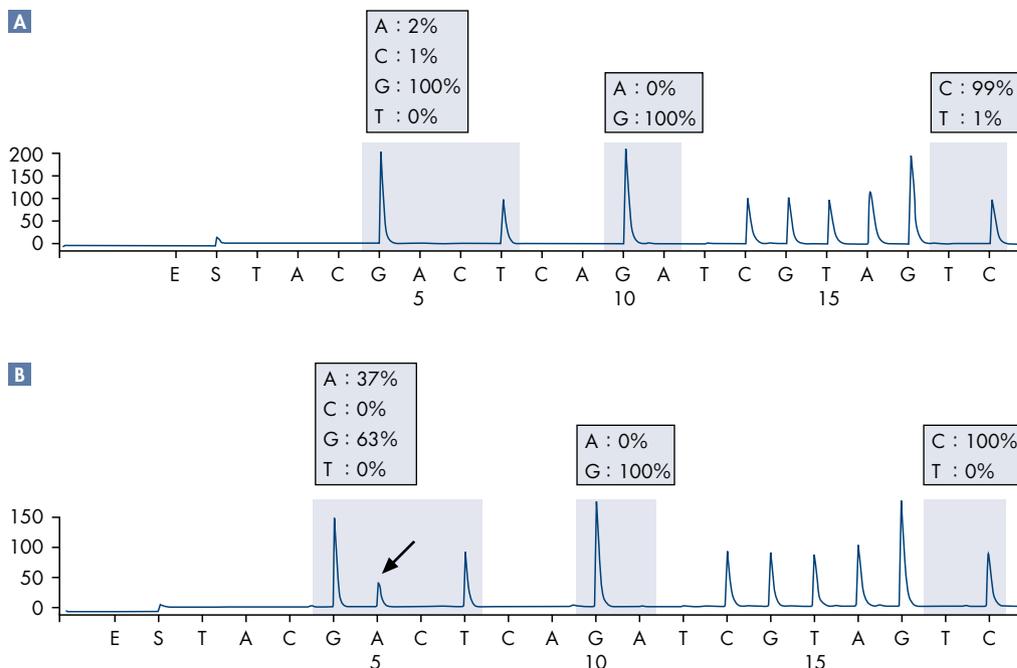


図 22.
パイロシーケンス法を用いた突然変異解析
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit を用いて大腸がん FFPE 組織から DNA を精製した。KRAS 遺伝子の変異を同定するために、KRAS Pyro Kit を用いてパイロシーケンス解析を行った。**A** コドン 12 と 13 で正常な遺伝子型を持つサンプルの分析後のパイログラム。**B** コドン 12 の 2 番目の塩基で GGT → GAT の突然変異 (塩基 35、矢印で示す) をもつサンプルの分析後のパイログラム。



5. オーダーインフォメーション

オーダーインフォメーション

製品名	内容	ページ	Cat. no.
Deparaffinization Solution	2 x 8 ml	11	19093
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	For 50 DNA preps: Buffers, plasticware, and reagents	12	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	For 48 DNA preps: Buffers, plasticware, and reagents	19	953034
REPLI-g FFPE Kit (25)*	For 25 x 50 µl whole genome amplification reactions: Buffers, plasticware, and reagents	13	150243
EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit (48)	For 48 x 25 µl DNA preps with bisulfite conversion	14	59144
RNeasy FFPE Kit (50)	For 50 RNA preps: Buffers, plasticware, and reagents	15	73504
miRNeasy FFPE Kit (50)	For 50 miRNA preps: Buffers, plasticware, and reagents	15	217504
Qproteome FFPE Tissue Kit (20)*	For 20 protein preps: Buffer and plasticware	16	37623
AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (50)	For 50 preps: Buffers, plasticware, and reagents	18	80234
Quantifast Probe Assays (80)*	For 80 x 25 µl reactions; kit included	24	Varies
Quantifast Probe RT-PCR Plus Kit (80)*	For 80 x 25 µl reactions	23	204482
RT ² FFPE PreAMP cDNA Synthesis Kit	For 12 reactions: Buffers and reagents	25	330461
RT ² FFPE PreAMP Primer Mixes	Pathway-focused Primer Mixes for all RT ² Profiler PCR Arrays	25	Varies
RT ² Profiler PCR Arrays	For pathway-focused expression analysis	25	Varies
関連製品			
EZ1 Advanced, PrioPLUS	Robotic workstation, 3-year warranty on parts and labor, 1 preventive maintenance visit each on 2nd and 3rd year after installation, 48-hour priority response		9001873
EZ1 Advanced XL, PrioPLUS	Robotic workstation, 3-year warranty on parts and labor, 1 preventive maintenance visit each on 2nd and 3rd year after installation, 48-hour priority response		9001876
QIAcube (110V), Priority	Robotic workstation, 2-year warranty on parts and labor, 48-hour priority response		9001883
QIAxcel Advanced, PrioPLUS	Capillary electrophoresis device, including computer and QIAxcel ScreenGel Software, Depot repair [†] , 3-year warranty on parts and labor, 48-hour priority response		9002125

* 大きいサイズも入手可能です。お問い合わせください。

† 修理は機器の引き取りによる対応になります。

記載の製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。最新のライセンス情報および製品ごとの否認声明に関しては www.qiagen.co.jp の "Trademarks and Disclaimers" をご覧ください。QIAGEN キットの Handbook および User Manual は www.qiagen.co.jp から入手可能です。

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube™, QIAxcel™, AllPrep®, EpiTect®, HotStarTaq®, MinElute®, PyroMark™, Pyrosequencing®, Qproteome®, QuantiFast™, QuantiTect®, REPLI-g®, RNeasy®, Rotor-Gene™ (QIAGEN Group); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.), Orbitrap™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); SYBR® (Molecular Probes, Inc.); TaqMan® (Roche Group); StepOnePlus™, ABI™, ABI PRISM®, FAM™ (Applied Biosystems or its subsidiaries); Eppendorf®, Mastercycler® (Eppendorf AG); Stratagene® (Stratagene Inc.).

"RNAlater[™]" is a trademark of AMBION, Inc., Austin, Texas and is covered by various U.S. and foreign patents.

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。© 2011 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

株式会社 キアゲン ■ 〒 104-0054 ■ 東京都中央区勝どき 3-13-1 ■ Forefront Tower II
Tel: 03-6890-7300 ■ Fax: 03-5547-0818 ■ E-mail: techservice-jp@qiagen.com

