

遺伝的差異を解析

ジェノタイピングの新技术 — 第2版



Sample & Assay Technologies

ジェノタイピング解析法とその問題点

ジェノタイピングとは、各生物個体間のゲノム DNA における差異を解析するために使用される様々なアプリケーションを指します。これらのアプリケーションは、研究・検査・診断のほぼ全領域において日常的に使用されています（図 1A 参照）。これらの領域は多様ですが、ジェノタイピング解析の際に生じる問題点は類似しており、サンプルの品質や量、感度、信頼性、結果を得るまでの時間、総合的な経費などが含まれます（図 1B）。

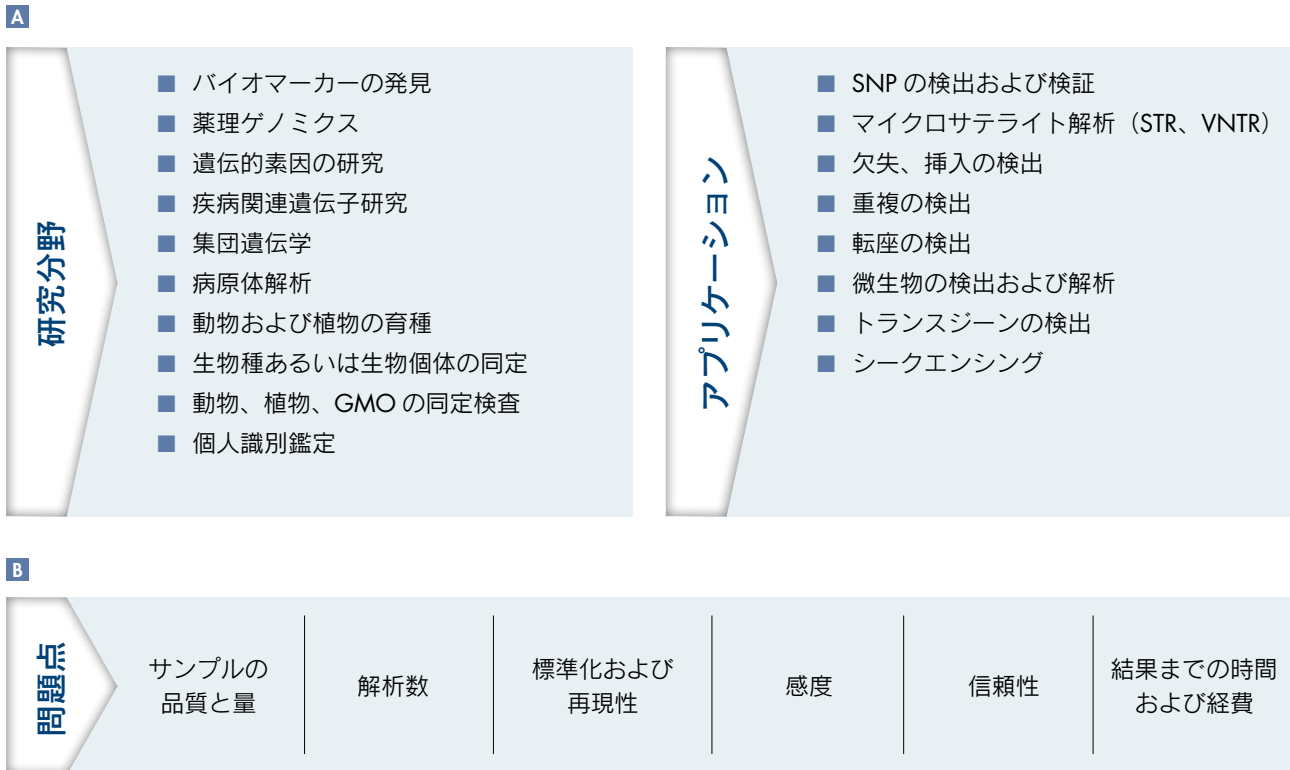


図 1. **A** ジェノタイピング研究分野におけるアプリケーション、**B** 関連する問題点

サンプル調製およびアッセイテクノロジーを提供する QIAGEN は、ジェノタイピング研究に関連した問題点を克服するために特別にデザインされた画期的な製品群を各種お届けしています。弊社の製品は以下の生物の正確で再現性の高いジェノタイピングを実現します。

- ヒト
- 植物
- ウイルス
- 動物
- 微生物

3 ページの概略図に示すように、QIAGEN はサンプルから結果まで、ジェノタイピングの全工程をカバーする幅広い製品ポートフォリオを提供しています。QIAGEN 研究開発部門の最新技術は、ジェノタイピングを実施するお客様のニーズに応じた新しいツールを常に開発し続けています。また、弊社のテクニカルサービス部門は QIAGEN 製品の使用方法に精通し、サンプル調製およびアッセイテクノロジーに関する幅広い実験技術と専門知識を有する経験豊富な科学者によって組織されており、皆様のテクニカルサポートを行ないます。

QIAGEN

R&D/QA/QC/Production/Services/Customer support

サンプル採取
および安定化

ゲノム DNA 精製

ゲノム DNA 保存
および
全ゲノム増幅

PCR による
ジェノタイピング
解析

検出



- QIAcard™ FTA®
- PAXgene® Blood DNA System
- PAXgene Tissue System
- TissueLyser
- TissueRuptor™
- Allprotect Tissue Reagent



- QIAamp® Kits
- DNeasy® Kits
- MagAttract® Kits



- QIAsafe DNA 製品
- REPLI-g® Kits



- Type-it™ PCR Kits
- Extensive PCR portfolio



- Rotor-Gene® Q
- QIAxcel™
- PyroMark Systems

遺伝的差異を解析

生物個体間の DNA における差異を解析することは、生物学や医学研究、診断分野において、ますます重要になってきています。科学論文で最も頻繁に引用されている“ジェノタイピング”という用語は、ヒト、動物、植物、微生物やウイルスサンプルに関連した幅広いアプリケーションと同義語として使用されています。

ジェノタイピングに使用されている技術や手法は多種多様ですが、これらは全て次のような基本的なテクノロジーを基盤にしています：

- フラグメントの長さによる多型解析
- アレイを含むハイブリダイゼーション・テクノロジー
- シークエンシング
- PCR をベースにした方法およびプライマー・エクステンション法

疾病あるいはがん遺伝子座のタイピングからバイオマーカーの発見や病原体検出まで、初めての実験でも成功をお約束します。ジェノタイピング実験に是非 QIAGEN 製品をご利用ください。

本冊子ではジェノタイピング・アプリケーションと関連する工程の概要および各ステップにおける様々な問題点を解決するために QIAGEN がお届けする専用製品について記載します。



サンプル採取および安定化



DNA サンプル素材の品質は、ジェノタイピングアッセイで正確かつ信頼できる結果を得るために重要です。サンプルの採取／輸送／保存が不適切な場合には DNA の品質が変化／分解し、実験結果の解析において正確性や再現性全体に悪影響を与えます。サンプルの再採取はプロジェクト経費を増大し、また同一のサンプルの再採取そのものが不可能な場合もあります。PreAnalytiX® 社のパートナーである QIAGEN は、血液採取と DNA 精製システムを統合した PAXgene Blood DNA System (室温で 14 日まで保存可能) (図 2)、また組織固定と組織内核酸の安定化および核酸精製を統合した PAXgene Tissue System (詳細は 5 ページ参照) を開発しました。

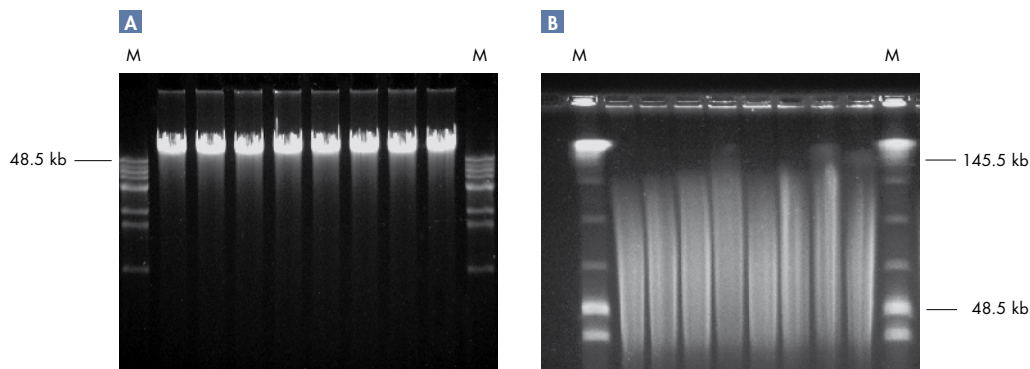


図 2. 高品質な高分子ゲノム DNA
PAXgene Blood DNA System を用いて 8 人のドナーの血液からゲノム DNA を精製した。A アガロースゲル解析。B 高分子ゲノム DNA を効果的に分離するパルスフィールドゲル電気泳動解析。M: マーカー

PAXgene Tissue System — 組織サンプルの採取、固定、安定化と核酸精製の統合システム

PAXgene Tissue System は組織採取用容器 (PAXgene Tissue Container) と、核酸精製用キットで構成されています。PAXgene Tissue Container に含まれる 2 種類の試薬は、採取した組織をホルマリンを使用せずに固定し、組織と核酸の安定化を実現します。組織形態や核酸が変化することなく、Container に入った状態で組織の輸送、保存が可能です (室温で最高 7 日間、2 ~ 8°C あるいは -20°C での長期保存)。また、その後 PAXgene Tissue DNA Kit を用いて同一サンプルから高品質な DNA を効率的に精製できます。



図 3. 組織の固定と核酸の安定化を行ない、組織形態を良好に保つ PAXgene Tissue Container

QIAcard FTA Spots — 室温でのサンプル採取と保存

QIAcard FTA Spots は実績ある Whatman® FTA テクノロジーを用いたサンプル採取システムで、核酸の取り扱いおよび処理を簡便化します。サンプルを QIAcard FTA Spots にアプライした後のゲノム DNA は室温でそのまま数年間安定です。QIAcard FTA Spots は輸送やアーカイブが容易で、また、核酸精製も直ちに行なえます。QIAcard FTA Spots 上に保存したサンプルから直接精製した DNA は高品質で、様々な高感度のジェノタイピングアプリケーションに使用できます (図 4)。

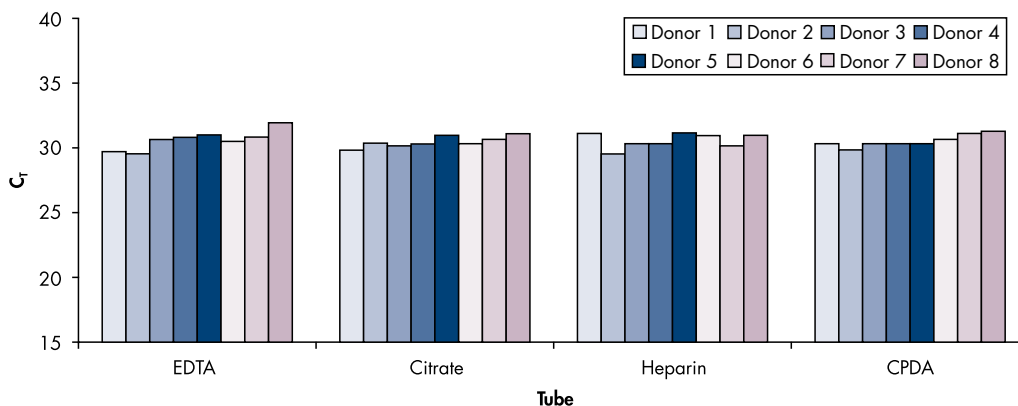


図 4. 様々な抗凝固剤で処理し、QIAcard FTA Spots 上で保存した血液から高品質 DNA を精製
表記の抗凝固剤を含む 4 種類の採血管を用いて 8 人のドナーから血液を採取した。125 µl の血液を QIAcard FTA Spots にアプライし、室温で一晩保存した。QIAcard FTA Spots の打ち抜いたディスクから QIAamp DNA Micro Kit を用いて DNA を精製した。β-アクトチン遺伝子フラグメント (294 bp) に特異的なプライマー、プローブと QuantiTect® Probe PCR Kit を用いて ABI PRISM® 7900HT SDS 上で精製 DNA を増幅した。



ゲノム DNA 精製



ゲノム DNA 精製は全てのジェノタイピング工程において重要なステップです。たとえ最良で適応性の高い検出テクノロジーを用いたとしても、テンプレート DNA の品質や純度が不十分な場合は信頼できる結果が得られません。QIAGEN の DNA 精製テクノロジーのポートフォリオは、DNA 精製における低収量や低品質などの問題を克服するために特別に改良され、ヒト、植物、動物、微生物に由来するほとんど全てのサンプルから最高品質の DNA を精製できます（7 ページ参照）。

QIAGEN のゲノム DNA 精製用製品

サンプルの種類	重要な要素								QIAGEN 製品							
	PCR 阻害物質の除去	DNA 量に制限がある	DNA 回収率	サンプルタイプの多様性	溶解が困難	短い DNA フラグメント	不均一なサンプル素材	細胞密度が高い	マニュアル	自動化システム						
	QIAamp	QIAcube	EZ1	QIAAdvanced シリーズ	QIAasymphony TM SP	BioRobot [®] MDx および BioRobot [®] Universal System	BioSprint [®] 96	Autopure LS								
全血	■								■	■	■	■	■	■	■	■
パフィコート						■			■	■	■	■	■	■	■	■
血漿および血清		■							■	■	■	■	■			
無細胞体液		■							■	■	■	■	■			
尿	■	■							■	■	■	■	■			
唾液	■								■	■	■	■				■
骨髄									■	■	■					■
乾燥血液斑			■						■	■	■		■	■		
組織				■		■			■	■	■	■			■	
固定組織					■	■			■	■	■					
骨および歯	■	■		■					■	■	■					
培養細胞									■	■	■	■			■	■
スワブ						■			■	■	■	■	■	■	■	■
法医学ケースワークサンプル		■		■					■	■			■			
毛髪		■							■	■	■		■			
糞便	■					■			■	■		■	■			
昆虫				■					■	■						
マウス尾				■					■	■					■	
植物サンプル	■								■	■					■	

スピнкаラムや 96 ウェルフォーマットのこれらの精製用製品は、マニュアル法での遠心操作あるいは吸引操作で使用することも、QIAGEN 独自の自動化システムを利用して完全自動化もできるので、どのようなダウンストリームアプリケーションに対しても適応でき、ニーズに応じた選択が可能です。QIAcube や QIAasymphony SP のような完全自動化システムは、DNA 精製におけるマニュアル操作が不要になるため、貴重な時間を節約し、どのようなスループット規模でも人為的ミス回避することにより再現性が増大します (図 5)。

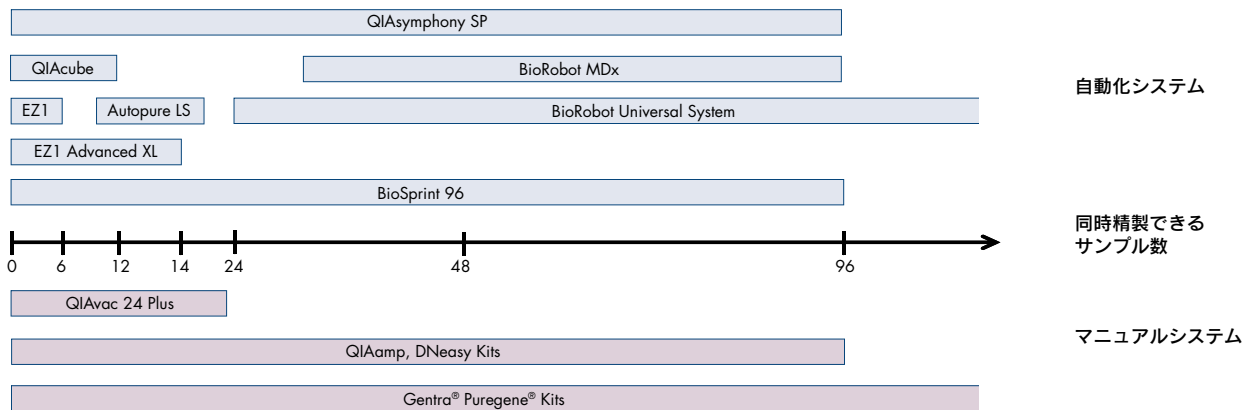


図 5. ジェノタイピング・アプリケーションにおいて様々なスループット規模に最適な DNA 精製システムを提供
同時に処理可能なサンプル数に対する自動化およびマニュアル DNA 精製システムを図に示す。すべてのシステムは迅速かつ簡便な操作で高品質 DNA を精製するために最適化されている。

効率的な精製のために特殊な処理が必要なサンプルの場合には、精製効率を最高にするための専用キットおよび最適化済みのプロトコルを提供しています (図 6)。オンライン検索システムの ProductFinder により、実験ニーズにマッチした最適なシステムを迅速かつ簡単に見つけることができます (www.qiagen.com/Products/ProductFinder)。

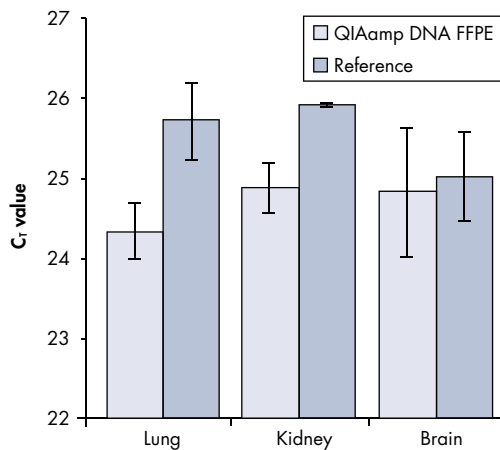


図 6. FFPE サンプルの効果的な溶解法
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit を用いて様々なラット FFPE 組織からゲノム DNA を精製、あるいは対照として一般的な Proteinase K 分解 (一晩) 後 QIAamp DNA Mini Kit を用いて DNA を精製した。DNA を分光光度計で定量し、テンプレートとして 20 ng をリアルタイム PCR 解析に用いた。QIAamp DNA FFPE Tissue Kit で精製した DNA で得られた C_t 値がより低いことは、対照と比較して増幅可能な DNA の回収量が多いことを示唆している。



ゲノム DNA 保存および全ゲノム増幅



DNA 精製後、時間を経て他の場所でアッセイを行なう場合、あるいは DNA サンプルを長期にアーカイブする場合など、サンプル採取の後、精製 DNA サンプルを保存する必要があります。高感度なジェノタイピングアッセイを実施する際、実験データを正確に解釈するためには、DNA サンプルの安定性が非常に重要です。不適切な保存はサンプルの品質に影響を与え、最終的にはダウンストリームアプリケーションに影響し、経費も増大します。QIAGEN は常温でゲノム DNA の輸送、保存やアーカイブのために経済的な各種製品をお届けしています。

研究者はダウンストリーム解析に使用する DNA 量が限られていたり、十分でないという問題に直面することが多々あります。QIAGEN の REPLI-g Kit は微量サンプルあるいは貴重なサンプルから全ゲノム DNA を均一かつ高収量で増幅することでこの問題を解決します。

QIAsafe™ — 室温での DNA 保存で冷凍庫は不要

QIAsafe DNA Tube および 96 ウェルプレートは画期的なアンハイドロビオシス (anhydrobiosis) をベースにしたテクノロジーを使用することにより、室温で精製 DNA の輸送および保存を安定して行なえます (図 7)。室温保存により冷却経費を節約でき、冷凍庫の無い環境や故障時でもサンプル消失のリスクを回避できます。“水を添加するだけ”の簡単操作で QIAsafe マトリックスから DNA を回収できます。

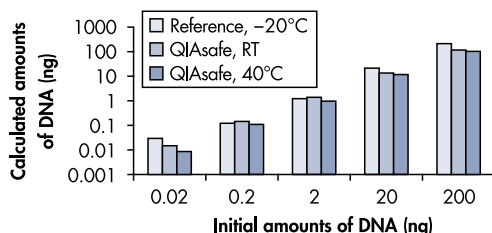


図 7. 1 年間保存したゲノム DNA の高回収量

様々な量のゲノム DNA を次の条件で 1 年間保存した；溶液として -20°C (Reference)、QIAsafe DNA Tube 内で室温 (RT) あるいは 40°C。水を添加し QIAsafe サンプルから DNA を回収後、β-アクトチンフラグメントのリアルタイム PCR を行ない、DNA を定量した。DNA 量は Reference サンプルを基に計算した。

REPLI-g Kits — 全ゲノム DNA 増幅

DNA 量が限られていたり不十分な場合、ジェノタイピング・アプリケーションが困難になることがあります。全ゲノム増幅のための QIAGEN の Multiple Displacement Amplification (MDA) テクノロジーは、微量サンプルや貴重なサンプルからの全ゲノム DNA を高収量に増幅することによりこの問題を解決します。REPLI-g Kit は、オリジナルの DNA を配列による偏りなく正確かつ均一に増幅します。増幅した DNA は様々な遺伝解析に直接使用できます。REPLI-g により増幅した DNA を表 1 に記載したすべての方法でテスト・検証しました。詳細情報に関しては REPLI-g Web Resource ウェブページ (www.qiagen.com/goto/wga) をご覧ください。

表 1. REPLI-g で増幅した DNA のバリデーション

アプリケーション	検出システム	キット/アッセイ
SNP ジェノタイピング	全てのサーマルサイクラー	Type-it Fast SNP Probe PCR Kit
SNP ジェノタイピング	Affymetrix®	GeneChip® Mapping System 10k、100k、500k
SNP ジェノタイピング	Affymetrix	GenomeWide SNP Arrays 5.0、6.0
SNP ジェノタイピング	Affymetrix	Targeted Genotyping System
SNP ジェノタイピング	Illumina®	GoldenGate Assay
SNP ジェノタイピング	Illumina	Infinium II Assay
SNP ジェノタイピング	リアルタイム PCR サーマルサイクラー (ABI™)	SNPlex Genotyping System
SNP ジェノタイピング	Sequenom	Mass Array、HotStarTaq® DNA Polymerase
SNP ジェノタイピング	HRM (High Resolution Melt)	Type-it HRM PCR Kit
STR 解析	全てのシークエンサー	Type-it Microsatellite PCR Kit
マイクロサテライト解析	ゲルを使用	Type-it Microsatellite PCR Kit
変異検出	QIAxcel	Type-it Mutation Detect PCR Kit
変異検出	ゲルを使用	Type-it Mutation Detect PCR Kit
変異検出	HRM (High Resolution Melt)	Type-it HRM PCR Kit



PCR によるジェノタイピング解析



診断研究における変異の同定、疾病関連遺伝子座のタイピング、血縁および親子鑑定などの遺伝的差異の検出および解析における多くの手法にとって PCR 増幅技術は必須なものとなってきましたが、一方、それぞれの増幅方法で達成すべき特性があります（表 2）。

表 2. PCR によるジェノタイピングアプリケーションの特性

アプリケーション	増幅方法	特性
マイクロサテライト解析	特異性の高いマルチプレックス PCR 蛍光標識プライマーが必要	複数の産物を同時に増幅 解像度の高い検出プラットフォーム
変異検出	特異性の高いマルチプレックス PCR 画期的な HRM テクノロジー	複数の産物を同時に増幅 高いバックグラウンドでの特異的な増幅 高精度、迅速性
シングルセル PCR	特異性の高いホットスタート PCR	高感度
SNP 検出	SNP ジェノタイピング (TaqMan® プローブを使用) SNP ジェノタイピング (HRM を使用)	高いコールレート スループット数 高精度、迅速性

Type-it PCR Kits シリーズ — 信頼できるジェノタイピング結果を迅速、簡単に実現

正確なジェノタイピング解析には実験パラメーターの至適化が広範囲にわたり必要になります。ジェノタイピング研究において多数の SNP を解析しなければならない場合や、生検あるいは FFPE 組織切片のようなサンプルで実験を行なう場合など、サンプル量は限られています。表 2 にリストアップした特性に加え、いくつかの研究では、ある疾病に関連している特定遺伝子の様々な変異（例；欠失、転座、挿入）に対して、複数の解析が必要です。Singleplex または 2～3 種類のマルチプレックス PCR 解析を行なっている場合には、必要なインターナルコントロールを含む膨大な数の PCR 反応が必要になり、その結果、経費および解析時間の増大に繋がります。QIAGEN はこのような課題に取り組み、SNP 解析から変異検出やマイクロサテライト遺伝子座の検出にわたるジェノタイピング・アプリケーションに専用の信頼できる PCR ベースのキットを開発しました（表 3）。

表 3. Type-it PCR Kit シリーズを用いたアプリケーション

キット	専用アプリケーション	研究分野
Type-it Microsatellite PCR Kit	マイクロサテライト STR (short tandem repeats) VNTR (variable number of tandem repeats) SSR (simple sequence repeat)	生物種あるいは生物個体の同定 血縁鑑定 マイクロサテライトの不安定性 集団遺伝学 血統鑑定
Type-it Mutation Detect PCR Kit	欠失 挿入 重複 転座 SNP 検出前の増幅 (SNaPshot™ Multiplex Kit*)	疾患関連遺伝子座のタイピング トランスジェニック植物/動物のタイピング GMO 解析
Type-it Fast SNP Probe PCR Kit	TaqMan MGB Probe を用いた SNP 検出	疾患関連遺伝子座のタイピング バイオマーカーの発見および検証
Type-it HRM PCR Kit	SNP および変異の検出 変異スキャニング 病原体検出	疾患関連遺伝子座のタイピング バイオマーカーの発見および検証

* Applied Biosystems® から入手可能

Type-it Microsatellite PCR Kit

Type-it Microsatellite PCR Kit はマルチプレックス PCR を用いた迅速で信頼できるマイクロサテライト解析専用キットです。ヒト、動物、植物、バクテリアの正確なジェノタイピング解析がマイクロサテライト、STR または VNTR マーカーを用いて得られます（表 3）。Type-it Microsatellite PCR Kit は PCR パラメーターの至適化が不要で、全てのフラグメントを同時に高収量で増幅します。その後キャピラリーシークエンサーで解析できるため、ルーチン解析にも新しいアッセイの確立にも最適なツールです（図 8）。

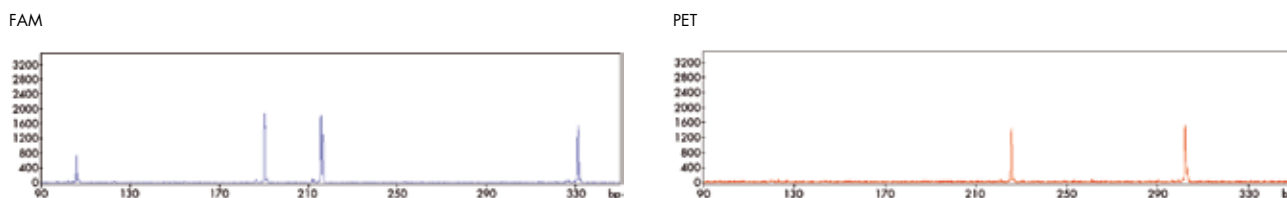


図8. Type-it Microsatellite PCR Kitを用いて正確な13-plex STR解析
3730 xl Capillary Sequencer (ABI) の4チャンネルで解析した13種類の遺伝子座のうちFAMとPETチャンネルでの6種類をのみを表示している。

Type-it Mutation Detect PCR Kit

Type-it Mutation Detect PCR Kit は、欠失、挿入、転座のような変異を迅速かつ正確に検出するために特別に開発されました (表 3)。本キットは SNaPshot Multiplex Kit* のようなジェノタイピングシステムの前処理として SNP 検出前のマルチプレックス PCR による増幅にも最適です。Type-it Mutation Detect PCR Kit は、多数のマルチプレックス実験において全てのアンプリコンを同等の効率で増幅できるため、全ターゲットの増幅効率を損なうことなくより多くの変異ターゲットを解析できます (図 9 および 15)。

Type-it Fast SNP Probe PCR Kit

Type-it Fast SNP Probe PCR Kit は、増幅の難しいテンプレートや微量のテンプレートでも正確な SNP ジェノタイピングを実現する最高のソリューションです (表 2)。アレルの明確な分離およびばらつきのないクラスタリングにより、高いコールレートおよび正確で再現性の高い確実なジェノタイピング結果が得られます (図 10)。標準的なサーマルサイクラーだけでなく、高速な加熱・冷却機能を持つサーマルサイクラーでも PCR 時間を顕著に短縮できるため、経費も節約できより高い適応性を提供します。Type-it Fast SNP Probe PCR Kit は Rotor-Gene Q (15 ページ参照) などの適切なリアルタイム PCR 装置上で TaqMan SNP Genotyping Assay により性能が検証されています。

Type-it HRM PCR Kit

Type-it HRM PCR Kit は画期的な HRM テクノロジーを用いて非常に正確なジェノタイピング解析を実現します (14、15 ページ)。

非常に豊富な PCR/RT-PCR 製品を提供

ジェノタイピング PCR ポートフォリオ、Type-it PCR シリーズにおける最新の開発だけではなく、QIAGEN は初めての試験でも正確な結果が得られるように特別に開発した様々な PCR および RT-PCR 製品をお届けしています。QIAGEN は、実験操作の簡便化を実現するマスターミックスフォーマット、ゲルローディング PCR バッファー、能率的なプロトコルを提供しています。これらは、アガロースゲル、キャピラリーシークエンサー、あるいは QIAxcel システムのような自動化電気泳動システムなどの検出装置にも最適です。どのような PCR アプリケーションでもお客様のニーズにマッチするキットを QIAGEN はお届けします。詳細は弊社ウェブサイト www.qiagen.com/goto/pcr をご覧ください。

* Applied Biosystems から入手可能

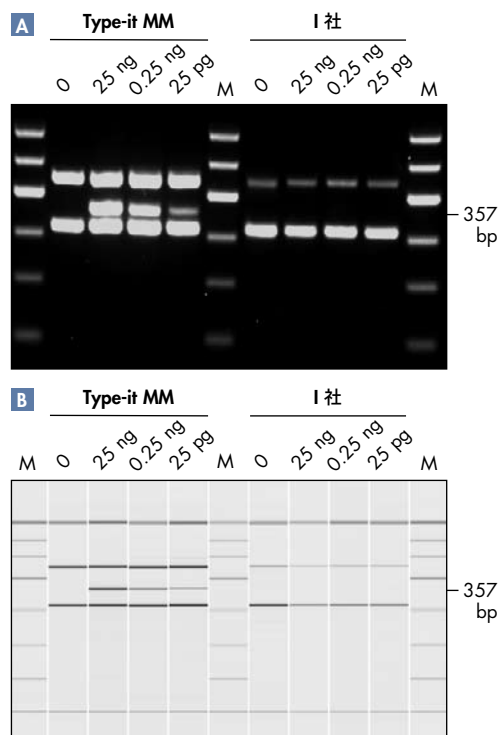


図 9. がんに関連している遺伝子の変異を高感度に検出
リンパ腫細胞株 (Ramos) から精製した様々な量の DNA (上図に記載) をヒト白血球 DNA に添加し、変異した Ramos 由来のターゲットを 2 種類のインターナルコントロールと共に検出した。Type-it Mutation Detect Kit を用いた場合、わずか 25 pg の DNA でも、変異した遺伝子が検出された。A DNA を 1.3% アガロースゲルで電気泳動解析した。B QIAxcel High Resolution Cartridge を用いて QIAxcel システム上で電気泳動を行なった。M: 100 bp ラダー

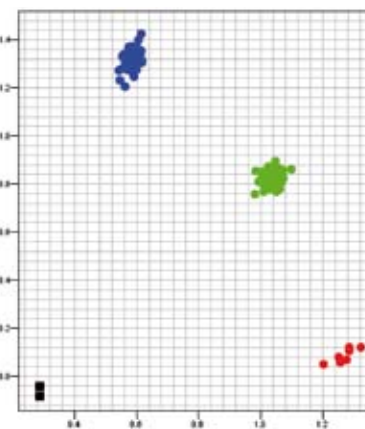


図 10. Type-it Fast SNP Probe PCR Kit によるアレルクラスタの明確な分離およびばらつきのないクラスタリング
異なるゲノム DNA パネル (各 10 ng/10 μ l 反応液) とテンプレートを含まないコントロール (NTCs) 2 つを TaqMan MGB ベースの SNP ジェノタイピングアッセイを用いて StepOnePlusTM Real-Time PCR Instrument でクラスタープロット解析を行なった。各ドットは一つのサンプルを表している。黒: NTCs。青: FAM 蛍光により検出されたホモ接合体 (T allele)。緑: ヘテロ接合体サンプル。赤: VIC[®] 蛍光により検出されたホモ接合体 (A allele)。

HRM テクノロジー — 迅速性、感度、経済性に優れたジェノタイピング研究手法

HRM は、温度の上昇に伴う二本鎖 DNA から一本鎖 DNA への融解挙動に基づいて二本鎖 PCR 産物の解析を行ないます。HRM 解析を用いることで PCR 産物は、その配列、長さ、GC 含量、あるいは相補性の違いなどにより、わずか 1 塩基ペアの差異でも簡単かつ迅速に識別されます。SNP や欠失のようなバイオマーカーがヒトの疾病やがんの指標として利用されていることから明らかなように、遺伝的な差異を理解することは遺伝性疾患の予測および治療にとって極めて重要です。QIAGEN の HRM 解析用のハードウェア、ソフトウェア、キットは、時間のかかる至適化なしに特異性、感度、精度の高い結果を実現し、市販の他製品より優れた性能を示します。

PCR によるジェノタイピング解析と様々な検出プラットフォーム

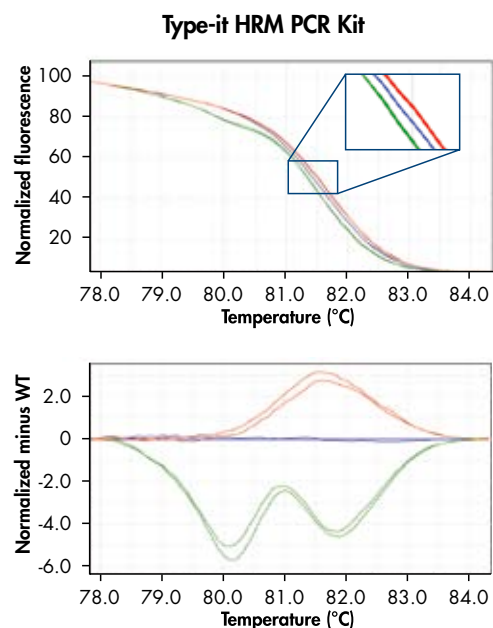


図 11. Type-it HRM PCR Kit を用いて A/T Class IV SNP の正確なジェノタイピング

Type-it HRM PCR Kit を用いたヒト GYS1 遺伝子の SNP (rs2270938) タイピングの結果、再現性が高く正確な結果が得られた。Normalized melting curve ならびに difference plot は、Class IV SNP の 3 種類のジェノタイプ (野生型、ヘテロ接合体、変異体) を明確に識別できたことを示している。青色：野生型；緑色：ヘテロ接合体；赤：変異体。解析は Rotor-Gene Q 5plex HRM 装置で行なった。

表 4. HRM を用いた代表的なジェノタイピング・アプリケーション

専用アプリケーション	概要
SNP 検出	Class IV (最も困難かつ希少)
変異検出	欠失、挿入、転座、点変異
変異スキャニング	未知のサンプルで新しい変異をスクリーニング
病原体のタイピング/検出	微生物研究におけるスクリーニング

Type-it HRM PCR Kit による正確なジェノタイピング

ジェノタイピング専用製品 Type-it シリーズに Type-it HRM PCR Kit が新たに加わりました。至適化済みの本キットは配列の違いを正確に解析できることが検証されており、HRM テクノロジーを用いてアレルを明確に識別する優れたツールです。本キットは増幅困難な遺伝子座の解析を実現し、Rotor-Gene Q、LightCycler® 480、Applied Biosystems 7500 および 7900 Fast System などの HRM 解析用に適したリアルタイム PCR 装置において使用できます。マスターミックスに含有されている斬新な EvaGreen 蛍光色素により明確な融解曲線が得られます。他社のキットとは異なり Type-it HRM PCR Kit は新しい HRM 解析実験系設定の際に至適化実験が不要です。ユニークなマスターミックスと至適化済みの HRM バッファーにより、Class IV SNP 解析でさえも特異的な増幅産物と信頼できる結果が得られます (図 11)。

Rotor-Gene Q を用いて卓越したリアルタイム PCR 結果を実現

QIAGEN のリアルタイム PCR 装置 “Rotor-Gene Q” (図 12) は、高い感度と再現性を実現するために数多くの工夫がなされており、最高のパフォーマンスと研究ニーズにマッチした最適な結果を実現します。Rotor-Gene Q の遠心エアコントロール方式による卓越した温度均一性と光学的均一性は HRM に最適です。Rotor-Gene Q は、最も困難とされている Class IV SNP の HRM による正確な判別が可能で唯一のリアルタイム PCR 装置です。Rotor-Gene Q に HRM オプションとして搭載の HRM 励起チャンネルと $\pm 0.02^{\circ}\text{C}$ の高い温度分解能、さらに高性能な HRM 解析ソフトにより、良好な結果が簡単に得られます。



図 12. Rotor-Gene Q

Rotor-Gene ScreenClust HRM Software による効率的なデータ解析

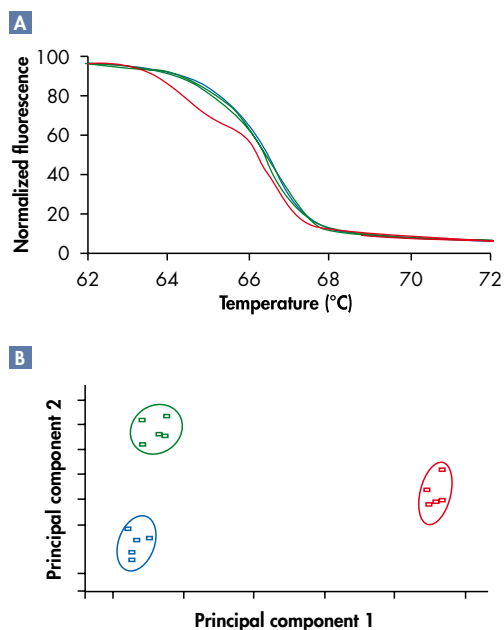
Rotor-Gene ScreenClust HRM Software は HRM 実験で異なるアレルを識別するために革新的な数学的手法と卓越した統計的手法を駆使しています (図 13)。Rotor-Gene ScreenClust HRM Software はサンプルをクラスターに分類し、ジェノタイピングや新規変異スクリーニングなどのアプリケーションを実現します。本ソフトウェアを用いた解析はスピードと特異性、感度を兼ね備えているので信頼性の高い結果が迅速に得られます。この強力なソフトウェアは現在市販されている他社の HRM ソフトウェアの解析性能をはるかに上回っています。

HRM によるジェノタイピングに最高の組み合わせ

Type-it HRM PCR Kit と Rotor-Gene Q および Rotor-Gene ScreenClust HRM Software の組み合わせは HRM ベースのジェノタイピングのトータルソリューションとして正確で信頼できる結果をお約束します。弊社製品は最高の温度分解能と簡単なソフトウェア解析を組み合わせ、特異性の高い増幅を実現し、現在市販されている他社の HRM 製品よりはるかに優れています。

図 13. 困難な A/T Class IV SNP を正確に同定

Type-it HRM PCR Kit を用いて Rotor-Gene Q で AHRR7 遺伝子を解析した。Rotor-Gene ScreenClust HRM Software は野生型 (青)、ホモ接合体変異型 (緑)、ヘテロ接合体 (赤) アレルを正確なクラスターに分類した。本実験におけるホモ接合体体間の融解温度の差異は 0.1°C 以下であった。A Normalized melting curve. B Principal component plot はクラスターに分類されたサンプルを示す。



PyroMark システムを用いた検出



パイロシークエンシング (Pyrosequencing®) — 遺伝子解析に最適な検出プラットフォーム

高感度な変異解析や混在する細胞集団におけるアレルを定量する際にパイロシークエンシングは高い精度を発揮します。さらにターゲットの周辺配列情報も取得できるため、確実にターゲットを解析できていることを確認することが可能です。また、HRM による変異スクリーニングの後、パイロシークエンスを組み合わせることで解析することにより、有用な変異を効率良く、高精度にバリデーションできます (図 17)。



図 16. PyroMark Q24 装置と PyroMark Q24 Vacuum Workstation

PyroMark Q24

PyroMark Q24 は既に確立されているパイロシークエンシング法を駆使して 1 ~ 24 サンプルの変異解析をわずか 15 分で行ないます (測定時間は配列長に依存)。PyroMark Q24 は PyroMark Q24 装置、一本鎖 DNA 調製のための PyroMark Q24 Vacuum Workstation、試薬とコントロール、さらに解析用の PyroMark Q24 Software (図 16) から構成されています。

PyroMark Q96 ID

ハイスループット用には PyroMark Q96 ID をお届けします。本製品は SNP や変異の配列ベースのリアルタイム検出ならびにアレル頻度に最適です。最高 96 サンプルの解析が可能です。PyroMark Q96 ID 装置は PyroMark Q96 Vacuum Workstation、アプリケーション・ソフトウェア、PyroMark 試薬、コントロールと組み合わせることによりパイロシークエンシング解析のトータルソリューションをお届けします。

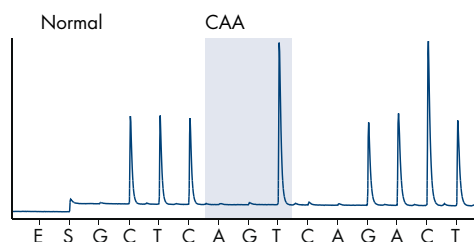


図 17. PyroMark Q24 KRAS Kit v2.0* および PyroMark Q24 によるコドン 61 の変異解析結果
コドン 61 の解析はリバースアッセイで行なっているため CAA は TTG として読まれる。パイログラムは野生型のジェノタイプサンプルを示す。淡青色部分は可変領域を示す。

* キットには、コドン 12、13 解析用のプライマーも含まれています。キットの詳細については、お問い合わせください。

完全なワークフロー

ジェノタイピングには遺伝的な個体差を検出するために使用する幅広いアプリケーションが含まれており、様々な生物学的研究分野において使用されています。ジェノタイピング解析の成功には、感度、信頼性、再現性が必須条件です。全てのジェノタイピングワークフローにおいて QIAGEN は画期的な製品を提供しています。ジェノタイピングに関連する問題点を克服するために専用テクノロジーを開発することにより、時間のかかる至適化なしに正確で再現性の高い結果が迅速に得られます。サンプル収集および精製から解析や検出まで、お客様のニーズに合った、実験工程の効率化を支援する至適化済みのキットをお届けします。

表 5. ジェノタイピングに関連する有用なウェブアドレス・リスト

ウェブページ	概要	リンク URL
ジェノタイピングアプリケーション用ページ	ジェノタイピングに関するアプリケーション、製品、情報の概要を記載したジェノタイピング情報ページ	www.qiagen.com/goto/genotyping
ProductFinder	アプリケーションに基づいて最適な QIAGEN 製品を検索するオンラインツール	www.qiagen.com/Products/ProductFinder
自動化ソリューション用ページ	QIAGEN の自動化システムおよび関連情報の概要を掲載した自動化情報ページ	www.qiagen.com/goto/automation
全ゲノム増幅アプリケーション用ページ	QIAGEN の全ゲノム増幅用製品や関連する技術などを掲載した全ゲノム増幅情報ページ	www.qiagen.com/goto/wga
エピジェネティクスアプリケーション用ページ	メチル化研究に関する製品および各種情報の概要を記載した QIAGEN エピジェネティクスアプリケーション用ページ	www.qiagen.com/goto/epigenetics
PCR および RT-PCR 概要ページ	QIAGEN がお届けする様々な PCR および RT-PCR ポートフォリオの概要	www.qiagen.com/goto/pcr
HRM ジェノタイピング用ページ	HRM を用いた QIAGEN ジェノタイピング用製品の概要	www.qiagen.com/goto/HRMgenotyping

オーダーインフォメーション

製品名	内容	Cat. no.	価格 (¥)
QIAamp DNA Mini Kit (50)*	For 50 DNA preps from genomic, mitochondrial, bacterial, parasite, or viral samples	51304	24,000
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	For purification of genomic FFPE tissues	56404	33,000
QIAcard FTA One Spot (100)*	For room-temperature sample collection and storage	159201	Inquire
QIAsafe DNA Tubes (50)*	For room-temperature storage of DNA	159104	Inquire
PAXgene Tissue Containers (10)	For collection, fixation, and stabilization of 10 samples: 10 Prefilled Reagent Containers, containing PAXgene Tissue Fix and PAXgene Tissue Stabilizer	765112	17,500
PAXgene Tissue DNA Kit (50)	For 50 DNA preps: PAXgene DNA Mini Spin Columns, Processing Tubes, Microcentrifuge Tubes, Carrier RNA, and Buffers; to be used in conjunction with PAXgene Tissue Containers	767134	31,500
REPLI-g Mini Kit (25)*	For genomic DNA preparation using whole genome amplification	150023	30,000
Type-it Microsatellite PCR Kit (200)*	For multiplex PCR analysis of microsatellite loci	206243	31,000
Type-it Mutation Detect PCR Kit (200)*	For multiplex PCR analysis of mutations	206343	31,000
Type-it Fast SNP Probe PCR Kit (100)*	For SNP genotyping using TaqMan or TaqMan MGB probes	206042	19,000
Type-it HRM PCR Kit (100)*	For genotyping using HRM technology	206542	19,000
Rotor-Gene ScreenClust HRM Software	For HRM data analysis	9020147	Inquire
Rotor-Gene Q	For outstanding performance in real-time PCR	Inquire	Inquire
PyroMark Q24	For Pyrosequencing in 24-well format	9001514	Inquire
PyroMark Q96 ID	PyroMark Q96 ID Instrument, PyroMark Q96 ID Software, PyroMark Q96 ID installation	9001525	Inquire
QIAxcel Advanced system	For automated DNA fragment analysis	Inquire	Inquire

* その他のキットサイズ/フォーマットは www.qiagen.co.jp をご覧ください。

記載の QIAGEN 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、各製品の英語版 Handbook あるいは User Manual 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®, QIAcard™, QIAcube™, QIASymphony™, QIAsafe™, QIAxcel™, BioRobot®, BioSprint®, DNeasy®, EZ1™, Gentra®, HotStarTaq®, MagAttract®, Puregene®, QuantiTect®, REPLI-g®, TissueRaptor™, Type-it™ (QIAGEN Group); Affymetrix®, GeneChip® (Affymetrix, Inc.); ABI™, ABI PRISM®, Applied Biosystems®, StepOnePlus™, SNaPshot™, VIC® (Applied Biosystems or its subsidiaries); FTA® (Whatman PLC); LightCycler®, TaqMan® (Roche Group); PAXgene®, PreAnalytiX® (PreAnalytiX GmbH); Pyrosequencing® (Pyrosequencing AB); Rotor-Gene® (Corbett Research Pty Ltd); Illumina® (Illumina Inc.); Whatman® (Whatman International Ltd.).

Registered names, trademarks, etc. used in this document, even when not specifically marked as such, are not to be considered unprotected by law.

Purchase of this product is accompanied by a limited, non-transferable immunity from suit to use it with detection by a dsDNA-binding dye as described in U.S. Patents Nos. 5,994,056 and 6,171,785 and corresponding patent claims outside the United States for the purchaser's own internal research. No real-time apparatus or system patent rights or any other patent rights, and no right to use this product for any other purpose are conveyed expressly, by implication or by estoppel. The QIAGEN silver logo is exclusively licensed to Corbett Research. NOTICE TO PURCHASER: The purchase of this product (Rotor-Gene Q, Rotor-Disc) includes a limited, non-transferable license to certain patents (see details below) surrounding rapid polymerase chain reaction (PCR) methods and instrumentation, the use of SYBR Green I in PCR reactions, melting curve analysis, analysis methods of DNA melting data, specifically high resolution melting (HRM) and others. The purchase of this product (Rotor-Gene Q, Rotor-Disc) includes a limited, non-transferable license to one or more of US Patents Nos 6,787,338; 7,238,321; 7,081,226; 6,174,670; 6,245,514; 6,569,627; 6,303,305; 6,503,720; 5,871,908; 6,691,041; 7,387,887; and U.S. Patent Applications Nos. 2003-0224434 and 2006-0019253 and all continuations and divisionals, and corresponding claims in patents and patent applications outside the United States, owned by the University of Utah Research Foundation, Idaho Technology, Inc., and/or Roche Diagnostics GmbH, for internal research use or for non-in vitro diagnostics applications. No right is conveyed, expressly, by implication or estoppel, for any reagent or kit, or under any other patent or patent claims owned by the University of Utah Research Foundation, Idaho Technology, Inc., and/or Roche Diagnostics GmbH, or by any other Party. For information on purchasing licences for in-vitro diagnostics applications or reagents, contact Roche Molecular Systems, 4300 Hacienda Drive, Pleasanton, CA 94588, USA. This real-time thermal cycler (Rotor-Gene Q) is licensed under U.S. Patent No. 6,814,934 and corresponding claims in any foreign counterpart patent thereof owned by Applied Biosystems LLC, in all fields, including research and development, all applied fields, and human and animal in-vitro diagnostics. No rights are conveyed expressly, by implication or estoppel to any patents on real-time methods, including but not limited to 5' nuclease assays, or to any patent claiming a reagent or kit. For further information on purchasing additional rights, contact the Director of Licensing at Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California, 94404, USA.

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

