

製品コード NN0001

研究用

Takara

**Takara FFPE DNA QC
All-in-One Kit**

説明書

v202312Da

ホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin Fixed Paraffin Embedded : FFPE) 試料は臨床および研究を問わず広く利用されており、近年 FFPE 試料を解析する頻度が増加しています。FFPE 試料は長期保存に有効ですが、固定プロセスで用いるホルマリンが核酸やタンパク質に化学的および物理的修飾を引き起こし、下流アッセイ (PCR 増幅など) に影響を与えることが知られています。DNA の断片化を評価する方法としてはアガロースゲル電気泳動がありますが、測定に使用する DNA 量が 50 ng 程度必要であり、貴重なサンプルの評価には適していません。また、吸光度から DNA 濃度を測定することは可能ですが、DNA の断片化は評価できません。

本製品は、ヒトハウスキープング遺伝子上に長短 2 つのアンプリコンを増幅するプライマーを用いて、リアルタイム PCR により有効分子数の定量および断片化を評価することが可能なキットです。段階希釈した Standard DNA を用いて PCR を行い、得られた Ct 値を y 軸に、Standard DNA のコピー数の対数値を x 軸にプロットして検量線を作成します。この検量線をもとに、短鎖のアンプリコンの増幅から有効分子数を定量します。断片化が進んだ FFPE 由来 DNA は、長鎖アンプリコンの増幅が低下することから、長短アンプリコンの定量値から以下の式で比 (Long/Short 比) を求め、FFPE 由来 DNA の断片化評価を行います。断片化していないサンプルは Long/Short 比 = 1.0 となり、断片化が進むほど値は小さくなります。

Long/Short 比 = Long Assay 定量値 / Short Assay 定量値

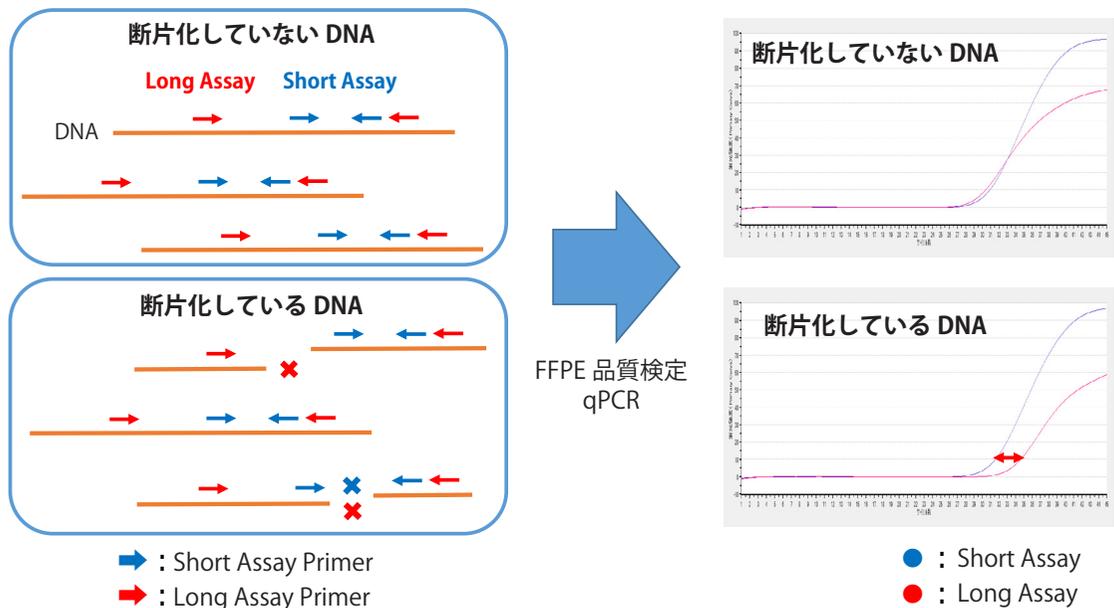


図 1. DNA の断片化を評価する仕組み

短いアンプリコンを増幅する Short Assay (92 bp) と長いアンプリコンを増幅する Long Assay (268 bp) で増幅を比較することにより、DNA の断片化を評価することができます。断片化している DNA では、Long Assay の増幅が低下します。

I. 内容 (100 回、20 μ l 反応系)

○ 2X Premix FFPE QC* ¹	2 \times conc.	1 ml \times 2
● Short Assay Primer/Probe Mix* ²	10 \times conc.	200 μ l
● Long Assay Primer/Probe Mix* ²	10 \times conc.	200 μ l
⊕ RNase Free H ₂ O		1 ml \times 2
● DNA Standard FFPE QC EASY Dilution (for Real Time PCR)	3.3 $\times 10^5$ copies/ μ l	100 μ l 1 ml \times 2
● ROX Reference Dye II* ³	50 \times conc.	100 μ l

* 1 : 酵素、基質等を含みます。

* 2 : 蛍光標識プローブを含んでいるため、遮光に留意してください。

* 3 : 蛍光物質を含んでいるため、遮光に留意してください。

II. 保存 - 20°C

III. 本製品以外に必要な器具、機器など (主なもの)

【器具】

- ・ マイクロピペット
- ・ マイクロピペット用チップ (疎水性フィルター付)
- ・ リアルタイム PCR 用のチューブ 等

【機器】

- ・ リアルタイム PCR 装置 (FAM を検出可能なもの)
 - Thermal Cycler Dice® Real Time System IV (製品コード TP1000/TP1010/TP1030)
 - Thermal Cycler Dice Real Time System III (製品コード TP950/TP970/TP980/TP990)
 - CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (製品コード 640231/640232)
 - CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
 - LightCycler 96 System/ LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics 社)
 - QuantStudio 5 Real-Time PCR System (96-well, 0.1 または 0.2 mL block)
(Thermo Fisher Scientific 社)

IV. 操作上の注意

1. ヒトゲノム DNA を測定する製品のため、作業者の DNA が混入しないよう操作にはご注意ください。
2. 万一、プライマー・プローブがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出ができません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、操作は細心の注意を払ってください。
3. 2X Premix FFPE QC は、使用時に泡立てないよう穏やかに転倒混合し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬が完全に混合されていない場合、十分な反応性が得られなくなります。
4. ボルテックスによる混合は行わないでください。なお、2X Premix FFPE QC を -20°C で凍結保存した場合、保存中に沈殿を生じることがあります。軽く手で暖めるか室温にしばらく置いた後、転倒混合することで完全に溶解します。必ず均一に混合してからご使用ください。
5. 反応液調製時には、試薬を氷上に置いてください。反応液の調製、分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。
6. 反応液の調製から検体サンプルの添加まで、次の3つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します (VII. 補足：エリア分けについてを参照)。どのエリアにおいても、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。
 - エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
 - エリア 2：検体の調製を行います。
 - エリア 3：反応液へ検体の添加を行います。

本製品では増幅反応と検出をリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などで解析する必要はありません。実験室内の核酸のコンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。

V. 操作

1. FFPE 由来 genomicDNA サンプルの調製 (エリア 3 で実施)

各 gDNA サンプルを EASY Dilution (for Real Time PCR) で $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ に希釈する。

2. 検量線作成用スタンダードサンプルの調製 (エリア 3 で実施)

DNA Standard FFPE QC を使用して、 $3.3 \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{l}$ ~ $13 \text{ copies}/\mu\text{l}$ の 5 段階希釈液を用意する。

[注意] DNA 希釈液は必ず用時調製してください。

- 1) EASY Dilution (for Real Time PCR) を $45 \mu\text{l}$ ずつ 1.5 ml マイクロチューブに 6 本分注する。
- 2) 1) の 1 本に ● DNA Standard FFPE QC ($3.3 \times 10^5 \text{ copies}/\mu\text{l}$) を $5 \mu\text{l}$ 添加し、よく混和後、軽く遠心して $3.3 \times 10^4 \text{ copies}/\mu\text{l}$ の希釈液を調製する。
- 3) $45 \mu\text{l}$ の新しい EASY Dilution (for Real Time PCR) に 2) で調製した $3.3 \times 10^4 \text{ copies}/\mu\text{l}$ を $5 \mu\text{l}$ 添加し、よく混和後、軽く遠心して $3.3 \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{l}$ を調製する。
- 4) $45 \mu\text{l}$ の新しい EASY Dilution (for Real Time PCR) に 3) で調製した $3.3 \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{l}$ を $15 \mu\text{l}$ 添加し、よく混和後、軽く遠心して $8.25 \times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{l}$ を調製する。希釈操作を繰り返し、 $13 \text{ copies}/\mu\text{l}$ までの段階希釈を調製する。

No.	希釈液濃度	希釈液調製方法
1	$3.3 \times 10^4 \text{ copies}/\mu\text{l}$	DNA Standard FFPE QC 原液 $5 \mu\text{l}$ + EASY Dilution $45 \mu\text{l}$
2	$3.3 \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{l}$	1. の $3.3 \times 10^4 \text{ copies}/\mu\text{l}$ 溶液 $5 \mu\text{l}$ + EASY Dilution $45 \mu\text{l}$
3	$8.25 \times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{l}$	2. の $3.3 \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{l}$ 溶液 $15 \mu\text{l}$ + EASY Dilution $45 \mu\text{l}$
4	$2.06 \times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{l}$	3. の $8.25 \times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{l}$ 溶液 $15 \mu\text{l}$ + EASY Dilution $45 \mu\text{l}$
5	$52 \text{ copies}/\mu\text{l}$	4. の $2.06 \times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{l}$ 溶液 $15 \mu\text{l}$ + EASY Dilution $45 \mu\text{l}$
6	$13 \text{ copies}/\mu\text{l}$	5. の $52 \text{ copies}/\mu\text{l}$ 溶液 $15 \mu\text{l}$ + EASY Dilution $45 \mu\text{l}$

※ 上記の 6 段階の希釈溶液のうち、No. 2 ~ 6 ($3.3 \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{l}$ ~ $13 \text{ copies}/\mu\text{l}$) を検量線作成用スタンダードサンプルとして反応を実施します。
(1 反応にはそれぞれ $2 \mu\text{l}$ を使用。n=2 の反応を推奨)

3. リアルタイム PCR 反応

1) 反応液の調製 (エリア 1 で実施)

以下の組成で、サンプル等の鑄型以外のコンポーネントを必要本数 (検量線作成用スタンダード、サンプル数 + NTC) × 1.1 倍調製する。Short Assay 用および Long Assay 用の 2 本のマスターミックスを調製する。反応チューブまたはプレートに 18 μl ずつ分注して軽くふたまたはシールをする。

[注意] 蛍光ノイズの原因になりますので、チューブまたはプレートや、ふたまたはシールには素手で触れないようにしてください。

【ROX Reference Dye を使用しない場合*1】

< Short Assay >

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
○ 2X Premix FFPE QC	10.0 μl
● Short Assay Primer/Probe Mix	2.0 μl
⊕ RNase Free H ₂ O	6.0 μl
サンプル (または検量線作成用スタンダードサンプル) (または ⊕ RNase Free H ₂ O)	2.0 μl
Total	20.0 μl

< Long Assay >

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
○ 2X Premix FFPE QC	10.0 μl
● Long Assay Primer/Probe Mix	2.0 μl
⊕ RNase Free H ₂ O	6.0 μl
サンプル (または検量線作成用スタンダードサンプル) (または ⊕ RNase Free H ₂ O)	2.0 μl
Total	20.0 μl

* 1 : 対象機種

- Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ (製品コード TP1000/TP950 他)
- CronoSTAR 96 Real-Time PCR System (製品コード 640231/640232)
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
- LightCycler 96 System/LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics 社)

【ROX Reference Dye を使用する場合*2】

< Short Assay >

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
○ 2X Premix FFPE QC	10.0 μ l
● Short Assay Primer/Probe Mix	2.0 μ l
● ROX Reference Dye II	0.4 μ l
Ⓣ RNase Free H ₂ O	5.6 μ l
サンプル (または検量線作成用スタンダードサンプル) (または Ⓣ RNase Free H ₂ O)	2.0 μ l
Total	20.0 μ l

< Long Assay >

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
○ 2X Premix FFPE QC	10.0 μ l
● Long Assay Primer/Probe Mix	2.0 μ l
● ROX Reference Dye II	0.4 μ l
Ⓣ RNase Free H ₂ O	5.6 μ l
サンプル (または検量線作成用スタンダードサンプル) (または Ⓣ RNase Free H ₂ O)	2.0 μ l
Total	20.0 μ l

* 2 : 対象機種

- QuantStudio 5 Real-Time PCR System (96-well, 0.1 または 0.2 mL block)
(Thermo Fisher Scientific 社)

2) サンプル (鋳型) の添加 (エリア 3 で実施)

チューブまたはプレートに、Ⓣ RNase Free H₂O (Negative Control)、検量線作成用スタンダードサンプル (3.3×10^3 copies/ μ l、 8.25×10^2 copies/ μ l、 2.06×10^2 copies/ μ l、52 copies/ μ l、13 copies/ μ l)、サンプル DNA を 2 μ l 添加し、しっかりとふたまたはシールをする。

3) リアルタイム PCR の実施

以下の条件でリアルタイム PCR 反応を実施する。

[注意]

- ・ 反応前にチューブまたはプレートスピンドウンし、内壁への反応液の付着や気泡がないことを確認してください。気泡があると、蛍光検出に影響を及ぼす場合があります。
- ・ リアルタイム PCR 装置は事前に電源を入れておき、Lid のプレヒートを行ってください。

<反応条件>

Hold

95℃ 30 秒

PCR：45 サイクル

95℃ 5 秒

60℃ 60 秒 (蛍光検出：FAM)

※ Thermal Cycler Dice Real Time System IV / III では、Speed は Fast を選択し、解析する際に正規化補正を OFF にしてください。正規化補正の設定変更方法は、弊社ウェブサイトをご参照ください (<https://catalog.takara-bio.co.jp>)。

VI. 判定

1. 反応終了後、増幅曲線および解析パラメータが適切であることを確認し*、Ct 値を算出する。

*：解析方法は、ご使用のリアルタイム PCR 装置の取扱説明書をご参照ください。

<検出対象と蛍光検出フィルター>

検出対象	蛍光検出フィルター
Short Assay	FAM
Long Assay	FAM

2. 検量線作成用スタンダードサンプル (DNA Standard FFPE QC 段階希釈液) のコピー数の対数値を x 軸、その濃度における Ct 値を y 軸にプロットして Short Assay および Long Assay の検量線をそれぞれ作成する。

<検量線評価ポイント>

検量線の評価するポイントは、傾きと直線性の2つである。傾きからは PCR 増幅効率を計算することができ、80 ~ 120% が適正範囲とされる。増幅効率は以下の計算式で算出することができる。

$$\text{増幅効率 (E)} = 10^{[-1/\text{slope}] - 1}$$

(x 軸に初期鋳型濃度 (Log10)、y 軸に Ct 値を取った場合)

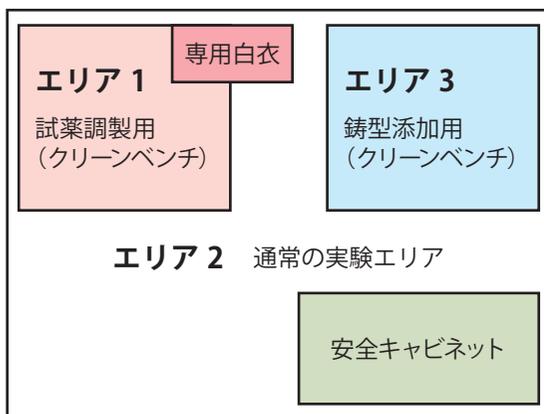
直線性は、相関関数 (r^2) で評価し、その値が 0.98 以上であることが望ましい。

3. 2. の検量線より、各測定対象サンプルの Ct 値から Short Assay および Long Assay の定量値 (copies / 反応) を算出し、n=2 の定量平均値を求める。
4. Short Assay の定量平均値より、各 FFPE DNA 中の有効分子数 (copies/ μ l) を算出する。
 - ・ 検量線より決定した定量平均値を 2 μ l (各 qPCR 反応に加えた量) で割る。
 - ・ V. 操作 > 1. で希釈した希釈倍率をかけて有効分子数 (copies/ μ l) を求める。
5. 以下の数式より断片化評価 (Long/Short 比) を求める。

Long/Short 比 = (Long Assay 定量平均値) / (Short Assay 定量平均値)

※ Long/Short 比は、0-1 で評価され、値が 1 に近いほど品質の高い DNA (DNA が断片化していない) を意味します。

VII. 補足：エリア分けについて



- エリア 1：反応試薬のみを扱うエリア
リアルタイム PCR 反応液の調製、分注を行う。
(鋳型となる DNA は一切持ち込まない)
- エリア 2：通常の実験エリア
検体の取扱いや DNA 調製を行う。
必要に応じて安全キャビネットを設置する。
- エリア 3：高濃度 DNA を扱うエリア
分注済みの反応液への鋳型 DNA の添加を行う。
測定対象サンプルおよび標準サンプルの希釈もここで行う。

VIII. 関連製品

Thermal Cycler Dice® Real Time System IV (製品コード TP1000/TP1010/TP1030)
Thermal Cycler Dice® Real Time System III (製品コード TP950/TP970/TP980/TP990)
CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (製品コード 640231/640232)
NucleoSpin DNA FFPE XS (製品コード 740980.10/.50/.250)

IX. 注意

- ・ 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・ タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・ Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。CronoSTAR はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995
ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社