

Drop-off アッセイを利用した、高度なマルチプレックス、超高感度 EGFR 検出を実現するクリスタルデジタル PCR

Ready-to-use | Intuitive | Rapid time to results | High multiplexing | High sensitivity | ctDNA compatible

単一アッセイで 90%以上の NSCLC における EGFR 変異を検出

リキッドバイオプシーは、血液などの液体生体試料を採取して分析する方法です。この手法は、腫瘍の異質性を理解するための、侵襲性が低く簡便なサンプリングアプローチであり、循環腫瘍 DNA(ctDNA)の貴重な情報源となります。

ctDNA の測定には、高いバックグラウンドの野生型配列の中で、しばしば低レベルで生じる遺伝的異常を定量化するために、高感度で信頼性の高い検出技術が必要です。デジタル PCR は、リキッドバイオプシーの次世代解析のための強力な技術として登場しました。

Stilla 社の 6-color naica® system は、超高感度なデジタル PCR 技術であり、単一のサンプル内で多数のバイオマーカーを同時に正確に定量化することができます。これにより、検出プロセスが簡素化され、検出のばらつきが最小限に抑えられ、結果が得られるまでの手作業での時間が大幅に短縮されます。

非小細胞肺癌(NSCLC)は、世界での癌による死亡の主要な原因です。上皮成長因子受容体(EGFR)は頻繁に変異し、NSCLC におけるよく知られた遺伝的異常です。高度にマルチプレックス化された、EGFR 6-color Crystal Digital PCR™ kit は、循環遊離 DNA(cfDNA)から、NSCLC で記載されている EGFR 変異の 90%以上を検出することができます。これには、exon 18、19、20、21 における 32 種類の一般的な、希な、活性化されたおよび耐性のある体細胞 EGFR 変異が含まれます(表 1、次ページ)。

Application Note Highlights

- EGFR 6-color Crystal Digital PCR™ kit は、単一のアッセイで 32 種類の一般的な、希な、活性化された、および耐性のある体細胞 EGFR 変異を確実に検出します。
- EGFR 6-color Crystal Digital PCR™ kit は、naica® system を用いた超高感度かつ非常に堅牢な EGFR 変異検出のために最適化されており、Sapphire Chip を使用して、ターゲットにより LoD が 0.30~0.46 cp/μl の範囲で検出します。
- Crystal Miner software とカスタム EGFR 6-color 解析テンプレートにより、cfDNA の迅速かつ簡単な解析が可能です。

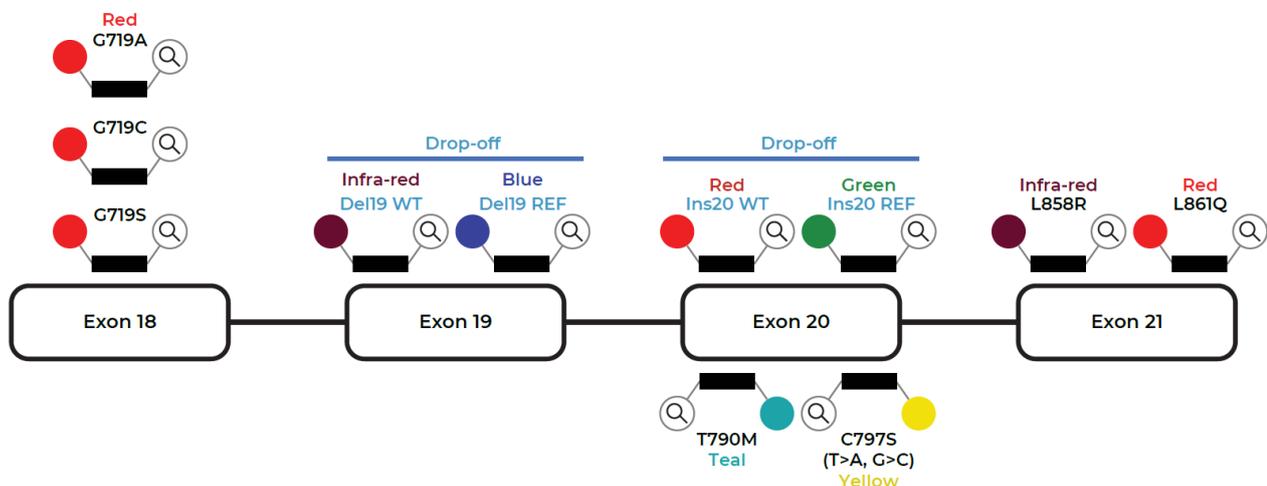
EGFR 6-color Crystal Digital PCR™ kit は、naica® system 上で高度にマルチプレックス化された cfDNA 解析を可能にします

EGFR 6-color Crystal Digital PCR™ kit は、TaqMan™ プローブを使用して、8 つの点突然変異および 24 種類の exon19 欠失と exon 20 挿入変異を Drop-off アッセイで検出します(図 1、次ページ)。

表 1 | EGFR 6-color Crystal Digital PCR™ kit で検出可能な EGFR 変異

Exon	Mutation	Base changes	Cosmic ID
Exon 18	p.G719A	c.2156G>C	COSM6239
	p.G719C	c.2155G>T	COSM6253
	p.G719S	c.2155G>A	COSM6252
Exon 19 deletion Drop-off	p.E746-A750del	c.2236_2250del	COSM6225
	p.E746.T751del	c.2236_2253del	COSM12728
	p.E746-T751delinsA	c.2237_2251del	COSM12678
	p.E746.T751delinsI	c.2235_2252delinsAAT	COSM13551
	p.E746.S752delinsA	c.2237_2254del	COSM12367
	p.E746.S752delinsD	c.2238_2255del	COSM6220
	p.E746-S752delinsV	c.2237_2255delinsT	COSM12384
	p.E746-P753delinsVS	c.2237_2257delinsTCT	COSM18427
	p.L747-E749del	c.2239_2247del	COSM6218
	p.L747-A750delinsS	c.2240_2248del	COSM4170221
	p.L747-A750delinsP	c.2239_2248delinsC	COSM12382
	p.L747-A750delinsP	c.2238_2248delinsGC	COSM12422
	p.L747-T751del	c.2240_2254del	COSM12369
	p.L747-T751delinsP	c.2239_2251delinsC	COSM12383
	p.L747-T751delinsQ	c.2238_2252delinsGCA	COSM12419
	p.L747-A751delinsS	c.2240_2251del	COSM6210
	p.L747-S752del	c.2239_2256del	COSM6255
	p.L747-P753delinsS	c.2240_2257del	COSM12370
p.L747-P753delinsQ	c.2239_2258delinsCA	COSM12387	
Exon 20	p.T790M	c.2369C>T	COSM6240
	p.C797S	c.2389T>A	COSM6493937
	p.C797S	c.2389G>C	COSM5945664
Exon 20 insertion drop-off	p.D770.N771insG	c.2310_2311insGGT	COSM12378
	p.H773-V774insH	c.2319-2320insCAC	COSM12377
	p.H773-V774insPH	c.2319-2320insCCCCAC	COSM28944
	p.H773-V774insAH	c.2319-2320ins-CCCACG	COSM1238028
	p.H773-V774insNPH	c.2319-2320insAAACCCCAC	COSM18491
Exon 21	p.L858R	c.2573T>G	COSM6224
	p.L861Q	c.2573T>G	COSM6213

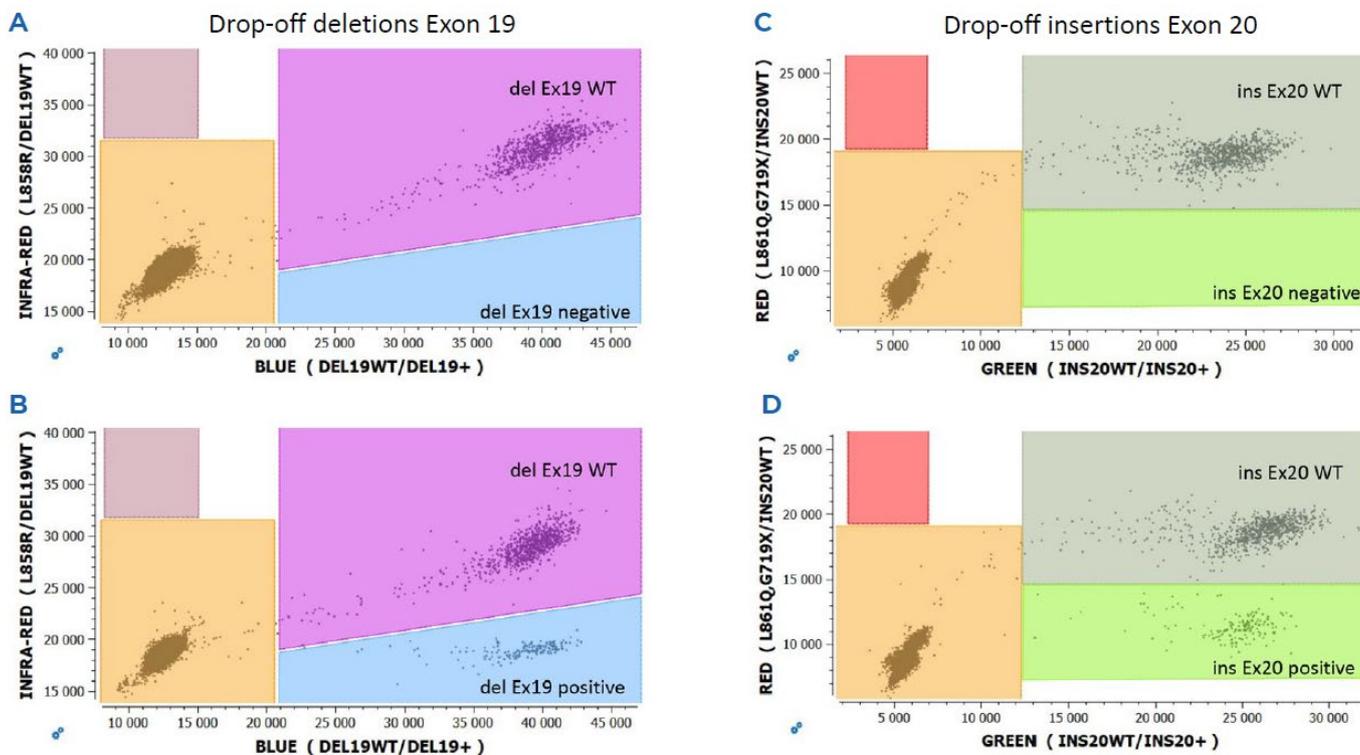
図 1 | EGFR 6-color Crystal Digital PCR kit の検出デザイン。各 exon 上の TaqMan™プローブの位置と蛍光色コードを示す。



Drop-off デジタル PCR アッセイの主な利点は、最小限の試薬を使用して短いゲノム間隔内で多数の近接遺伝子病変(欠失、挿入、ヌクレオチド置換を含む)を簡略化して検出できることです。実際、Drop-off アッセイには、同じアンプリコンを標的とする 2 つの TaqMan™ プローブのみが必要です。1 つは遺伝子病変部位をまたぐが野生型配列にのみ相補的な野生型プローブ、もう 1 つは変異部位に隣接してハイブリダイズし、変異体と野生型の両方に相補的なリファレンスプローブです。野生型アレルが存在する場合、野生型プローブとリファレンス

プローブの両方がターゲットにハイブリダイズし、二重陽性集団が形成されます(図 2A および 2C)。一方、変異アレルが存在する場合、リファレンスプローブのみがターゲットにアニーリングし、追加の陽性集団が形成されます(図 2B および 2D)。*EGFR* 6-color Crystal Digital PCR™ kit に付属するカスタム解析テンプレートと Crystal Miner software を組み合わせることで、2D プロットの自動生成とサンプルの定量化が可能になります。

図 2 | A: 野生型(WT) exon 19 欠失 および B: exon 19 欠失陽性 cfDNA サンプルの代表的な 2D プロット
 C: 野生型 exon 20 挿入 および D: exon 20 挿入陽性 cfDNA サンプルの代表的な 2D プロット
 x 軸および y 軸は、指定されたカラーチャネルの蛍光単位を示す。



EGFR 6-color Crystal Digital PCR™ kit は、naica® system による超高感度かつ高い特異性を持つ検出に最適化されています

EGFR 6-color Crystal Digital PCR™ kit は、高感度の Sapphire Chip を用いた naica® system で使用できます。各 EGFR ターゲットの検出感度を決定するために、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP17-A2 スタンダード (検出限界および定量限界の決定のためのプロトコール; 承認ガイドライン) に従って、ブランク限界 (LoB) および検出限界 (LoD) を決定しました。EGFR 6 colors Crystal Digital PCR™ kit における EGFR 変異検出の LoB は、ターゲットに応じて 0.06~0.17 copy/μl (cp/μl) の範囲であり、LoD はターゲットに応じて 0.30~0.46 cp/μl の範囲です (表 2)。

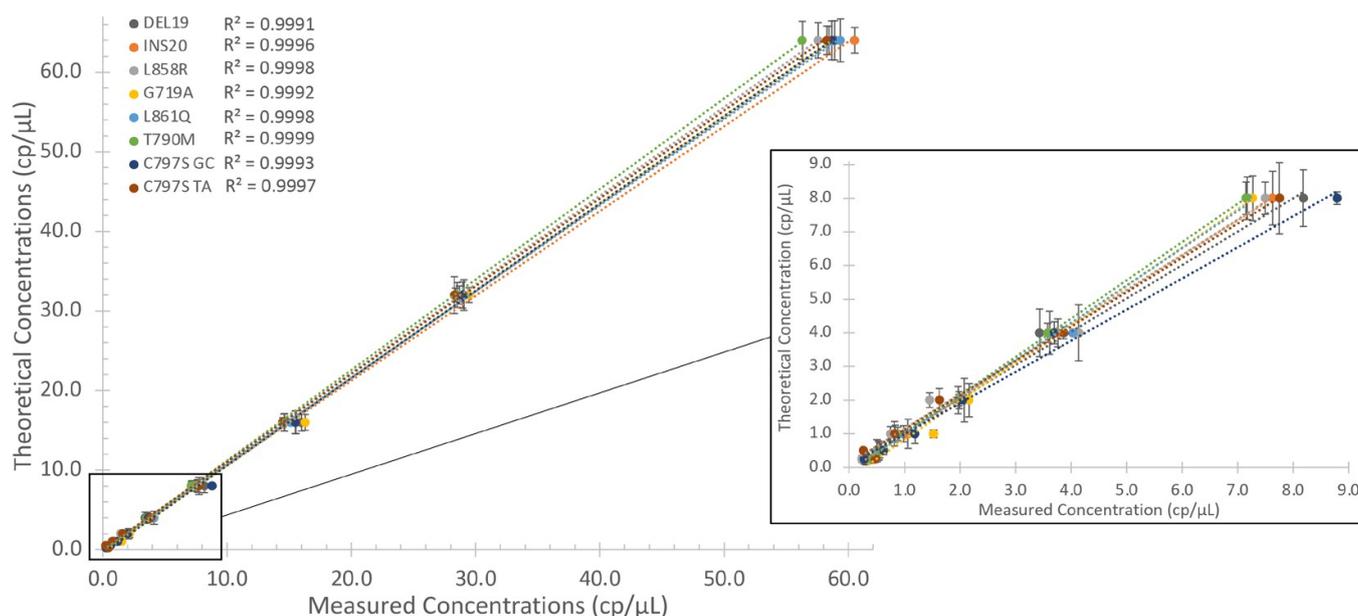
EGFR 6-color Crystal Digital PCR™ kit の感度を評価するために、EGFR exon19 欠失、EGFR exon20 挿入、EGFR L858R、EGFR G719A、EGFR L861Q、EGFR

T790M、EGFR C797S (GC) および EGFR C797S (TA) 変異を対象とした線形滴定が、64 cp/μl から 0.25 cp/μl までの範囲で行われました (図 3)。この実験は、120 cp/μl の野生型 EGFR DNA (25 μl の Sapphire Chip 反応あたり 3,000 copy に相当) のバックグラウンドで行われました。EGFR 6-color Crystal Digital PCR™ kit は、すべての変異に対して超高感度かつ信頼性の高い検出を示しました。

表 2 | CLSI EP17-A2 スタンダードに従って決定された EGFR 6-color Crystal Digital PCR™ kit の LoB および LoD (Sapphire Chip ウェル濃度: cp/μl)

Target	LoB95	LoD95
DEL19+	0.11	0.37
L858R	0.09	0.38
INS20+	0.17	0.46
L861Q, G719X	0.09	0.37
T790M	0.12	0.46
C797S	0.06	0.30

図 3 | EGFR exon19 欠失、EGFR exon20 挿入、EGFR L858R、EGFR G719A、EGFR L861Q、EGFR T790M、EGFR C797S (GC) および EGFR C797S (TA) DNA の理論濃度 64 cp/μl、32 cp/μl、16 cp/μl、8 cp/μl、4 cp/μl、2 cp/μl、1 cp/μl、0.5 cp/μl および 0.25 cp/μl の滴定を、120 cp/μl の野生型 EGFR (25 μl 反応あたり 3,000 コピー) のバックグラウンドで行った。反応は、97 から 124 ヌクレオチドの範囲の合成 Ultramer™ 変異 DNA オリゴヌクレオチドテンプレートと野生型ヒトゲノム DNA を使用して行った。各ターゲットについて、最低 3 回の測定の平均値と標準誤差を示す。



EGFR 6-color Crystal Digital PCR™ kit は、ターゲットに応じて濃度の RSD(相対標準偏差)が 4.5%から 8.6% (N = 12) の範囲で、堅牢な run 間の再現性を示しました(図 4)。

さらに、*EGFR* 6-color Crystal Digital PCR™ kit は高い特異性を示し、偽陽性は得られませんでした(表 3)。

図 4 | *EGFR* 6-color Crystal Digital PCR™ kit の run 間の再現性。run 間の再現性は、*EGFR* 6-color Crystal Digital PCR™ kit を使用して、12 回の異なる run(N = 12)で得られた 1 つの陽性コントロールサンプルチャンバーの結果を比較することで測定された。

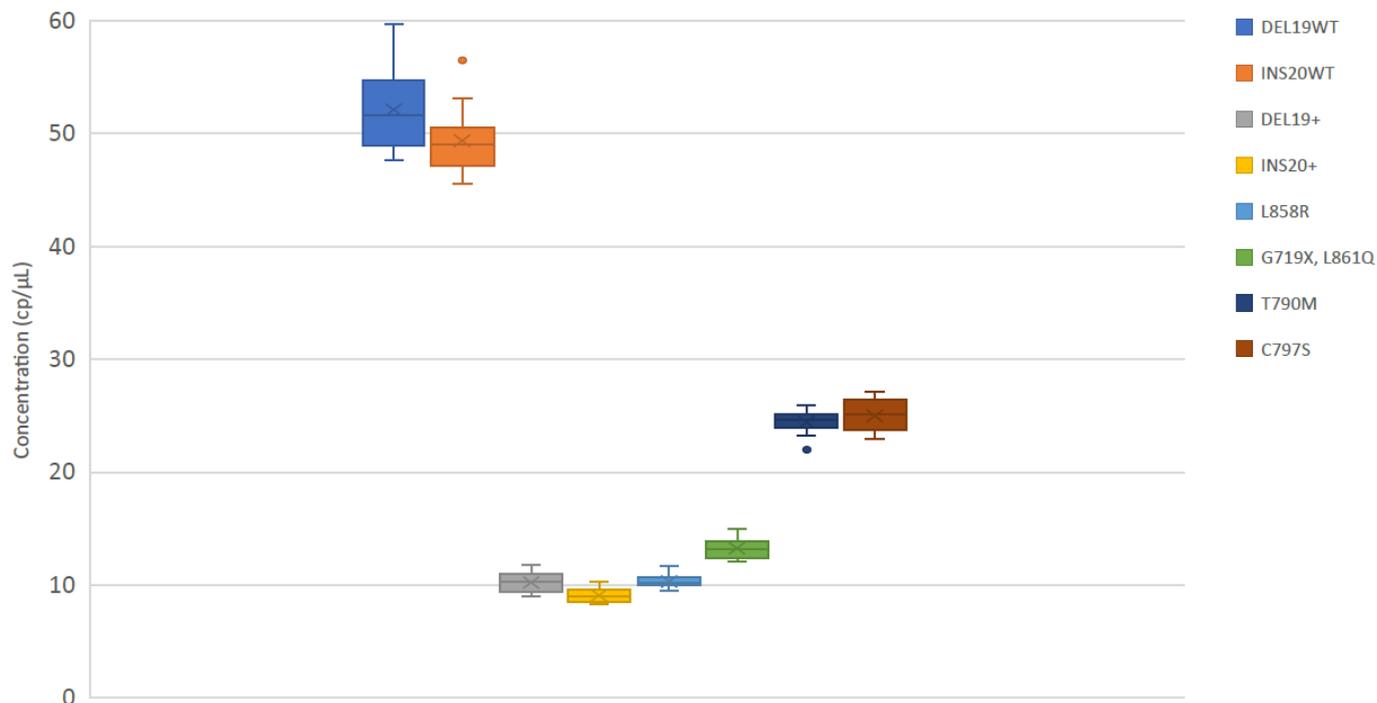


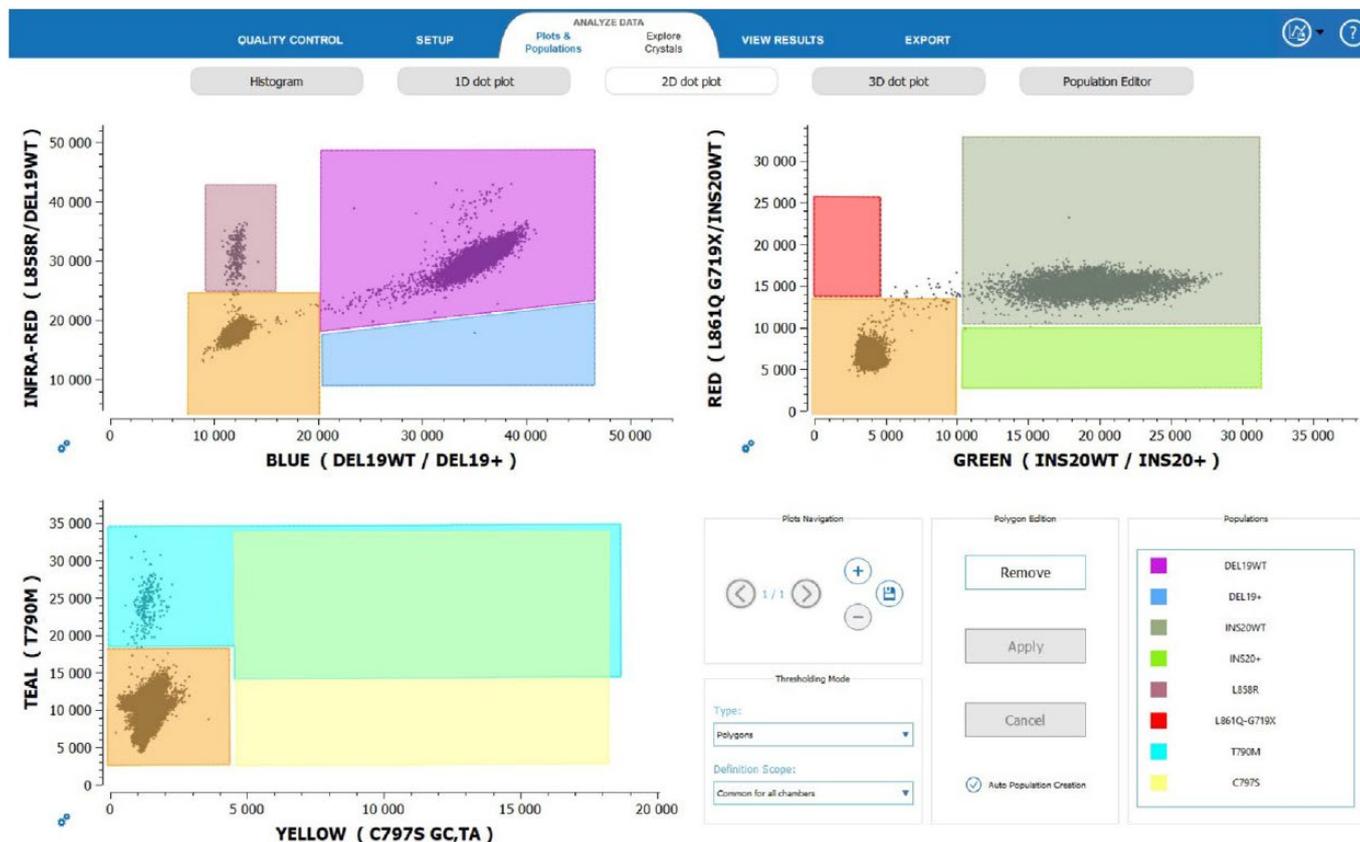
表 3 | *EGFR* 6-color Crystal Digital PCR™ kit を使用した Crystal Digital PCR™の特異性結果。反応は、合成 Ultramer™変異 DNA オリゴヌクレオチドと野生型ヒトゲノム DNA をテンプレートとして使用して、重複して実施された

Targets	DEL19+	INS20+	L858R	L861Q, G719X	T790M	C797S
WT hgDNA	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
DEL19+ DNA	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
INS20+ DNA	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
L858R DNA	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
L861Q DNA	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
G719A DNA	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
G719C DNA	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
G719S DNA	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
T790M DNA	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
C797S-GC DNA	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
T790M/C797S-TA DNA	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS

EGFR 6-color Crystal Digital PCR™ kit に付属する解析テンプレートと Crystal Miner software を組み合わせ

ることで、2D プロットを簡単に生成し(図 5)、非常に一致した結果を迅速に取得することが可能になります。

図 5 | Crystal Miner software とカスタム EGFR 6-color Crystal Digital PCR™ kit 解析テンプレートを使用した、L858R および T790M 陽性 NSCLC 臨床 cfDNA サンプルの解析の代表例。cfDNA サンプルは、予想結果と測定結果が完全に一致した。x 軸および y 軸は、指定されたカラーチャネルの蛍光単位を表す



- ・ 本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。
- ・ 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。
- ・ ライセンスなどに関する最新の情報は弊社ウェブサイトをご覧ください。
- ・ 製品仕様は予告なく変更される場合があります。
- ・ 本パンフレット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。

タカラバイオ株式会社

営業部(東京) TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282
 営業部(本社) TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995
 テクニカルサポートライン TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995
 Website <https://www.takara-bio.co.jp>
 公式 X @Takara.Bio.JP / <https://x.com/Takara.Bio.JP>

取扱店