

著者

Sameer Kalghatgi, Ph.D.,
Nahid Turan, Ph.D.,
Susan Jones, M.S.
Coriell Institute for Medical
Research
Camden, NJ, USA

Dr. Eva Graf
Agilent Technologies, Inc.

Coriell Institute のバイオレポジトリにおける 長期 DNA 保存のモニタリング

概要

Coriell Institute for Medical Research (Coriell) は、バイオメディカル研究に利用可能な細胞株、DNA およびその他の生体材料の最も多様なコレクションを所有していると考えられています。2016 年に Coriell は従来のゲル電気泳動から TapeStation System の Agilent Genomic DNA ScreenTape Assay を用いる方法に変更し、TapeStation System が算出する DNA Integrity Number (DIN) をゲノム DNA の品質を評価するための客観的な指標として導入しました。本アプリケーションノートでは、さまざまな品質のゲノム DNA (gDNA) サンプルを用いた比較研究を行い、TapeStation System の機能を明らかにしました。さらに、Coriell が長期保存状態からどのように gDNA サンプルを取り出し、TapeStation System で品質確認を行うかについても示しています。1990 年から 2000 年に抽出された DNA サンプルの DIN を比較することで、Coriell が 30 年以上にわたり安定した品質で確実に DNA を保存していることが確認できました。

はじめに

Coriell Institute for Medical Research (Coriell) は、生体試料の収集、処理、凍結保存、配布および情報管理を提供するバイオバンキングサービスとして、国際的に高い評価を受けています。Coriell のバイオバンクは、バイオメディカル研究に利用可能な細胞株、DNA、その他の生体試料のもっとも多様なコレクションを保存している研究所のひとつと考えられています。Coriell は、複数のバイオレポジトリを発展・維持し、豊富な表現型データが付加された特徴が明確な高品質の DNA を科学コミュニティに提供しています。Coriell での主な強みは、DNA およびその他の生体試料の抽出、処理、凍結保存および確実な保存にあります。長期保存の前に、生体サンプルに対しさまざまな品質管理 (QC) のためのアッセイが実施されています。QC プロセスでは、蛍光光度計を用いた定量、酵素処理、同一性解析、分光光度計を用いた純度評価 (OD 比)、および品質評価などが含まれています。一連のすべての QC 項目に合格したサンプルのみが配布に適すると見なされ、保存されます。

実験方法

装置

Agilent 4200 TapeStation System (型番 G2991AA) および Agilent Genomic DNA ScreenTape (型番 5067-5365)、Agilent Genomic DNA 試薬キット (型番 5067-5366) を解析に使用しました。分解していない DNA の品質は、1 ~ 10 のスコアで評価し、10 が最も高い品質、1 が最も低い品質となります。スコアが 7.0 以上の DNA サンプルを高品質として分類しました。

DNA サンプルの濃度および OD は、Nanodrop UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Inc.) を用いて測定しました。

手順

1. gDNA は、ヒトの組織または血液サンプルから樹立された細胞株から 1990 年から 2000 年の間に抽出されました。
2. gDNA は Miller による塩析法を改変し抽出されました。方法の概要は以下の通りです。培養細胞に陰イオン界面活性剤を加え溶解し、RNase および Proteinase K により RNA およびタンパク質を分解しました。混合後、塩溶液を加え不溶性の細胞片を遠心分離により除去しました。上清に 2 倍量のエタノールを加え、析出した DNA を巻き取り回収しました。DNA ペレットは TE バッファ (10 mM Tris, pH 8.0/1 mM EDTA) に溶解しました。

3. サンプルは、温度モニタリングシステムを備えた -80 °C の標準的なフリーザーで保存されました。
4. 本研究では、管理された手作業の方法で 50 サンプルが取り出されました。フリーザーを開けている時間を減らすため、サンプルの取り出し過程ではフリーザーやフリーザー内の位置、サンプルボックスに関する電子情報が使用されました。解凍の管理ができるよう、サンプルはクライオカートを用いて収集しました。
5. DNA が制限酵素で切断されることを確認するため、酵素処理を行いました。DNA 溶液 (1 µg) は *EcoRI* および *HindIII* 制限酵素で処理しました。Thermo Scientific FastDigest *EcoRI* restriction enzyme (cat# FD0274) は G^AAATTC サイトを、Thermo Scientific FastDigest *HindIII* restriction enzyme (cat# FD0504) は A^AAGCTT サイトを認識します。両酵素は universal FastDigest Buffer を用いて 37 °C で 10 分間処理しました。
6. 制限酵素処理した DNA および未処理の DNA サンプルを 20 ng/µL に希釈し、TapeStation System と従来のゲル電気泳動を用いて評価しました。

結果と考察

Coriell Institute における TapeStation System の導入

2016 年以前は、Coriell では gDNA サンプルを従来のゲル電気泳動を行い、画像を取得し視覚的に品質の評価を行っていました。DNA が制限酵素で切断可能であるか確認するために、*EcoRI* または *HindIII* で処理した gDNA と未処理の gDNA とを並べて泳動していました (図 1A)。DNA 濃度および OD は、Nanodrop UV-Vis spectrophotometer で測定されていました。

2016 年に Coriell Institute では、抽出された gDNA の品質を評価するための客観的な指標として、DNA Integrity Number (DIN) を利用するため、TapeStation System が導入されました。TapeStation System の性能を評価するために、さまざまな品質の gDNA サンプルを用いた比較試験が行われました。図 1B では各サンプルの TapeStation System でのゲル画像を並べて表示しています。TapeStation Analysis Software のゲル画像では、酵素処理・未処理のサンプルの比較において、従来の手法と同様のアプローチができ、同じ結論となることが分かります。さらに、各サンプルに対して自動的に算出される DIN により、サンプル品質に対する客観的な数値が得られます。制限酵素処理していないサンプルの DIN は、従来のゲル電気泳動の結果を視覚的に評価したこれまでの結果と相関していました。

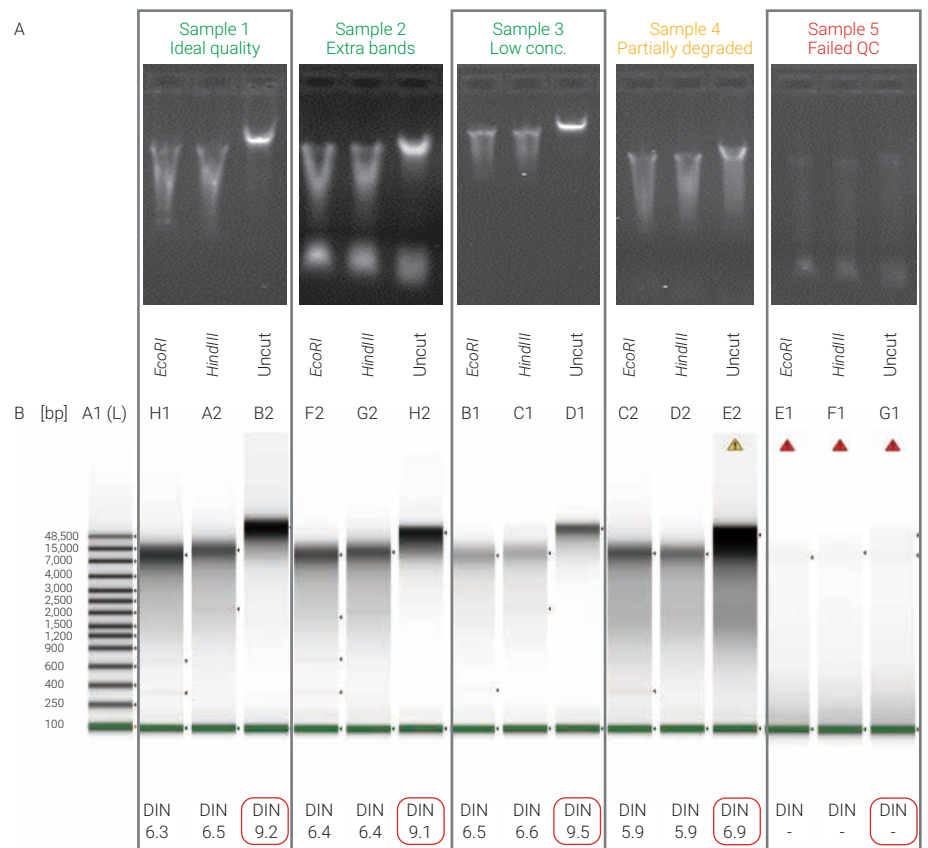


図 1. 品質の異なる 5 種類の gDNA サンプルの評価

各サンプルで、制限酵素未処理の gDNA を *EcoRI* または *HindIII* 処理したサンプルの隣に表示しています。A) 従来のゲル電気泳動の画像のキャプチャ B) 同じサンプルでの TapeStation Analysis Software のゲル画像。未処理のサンプルの DIN を赤色で表示。黄色の警告は、サンプルの濃度が高すぎることを、赤色の警告はサンプル濃度が DIN 推奨範囲外であることを示しています。

DNA の長期保存

Coriell では生体サンプルの長期保存を行っています。DNA は安定した分子と考えられていますが、さまざまな条件によって DNA 塩基の欠失や DNA 鎖が切断されることがあります。長期間 -80 °C で保存した後の DNA の安定性について判定する試験を実施し、1990 年から 2000 年

の間に抽出された 50 サンプルを選択し、濃度および品質評価基準を確認しました。濃度は分光光度計 (Nanodrop) を用いて測定し、当初の濃度との差が 10 % 以内、OD 260/280 比はおよそ 1.75 ~ 1.80 で品質が良いと判断されました。検証したすべてのサンプルに対して DIN は 7.0 を超えていました (図 2)。

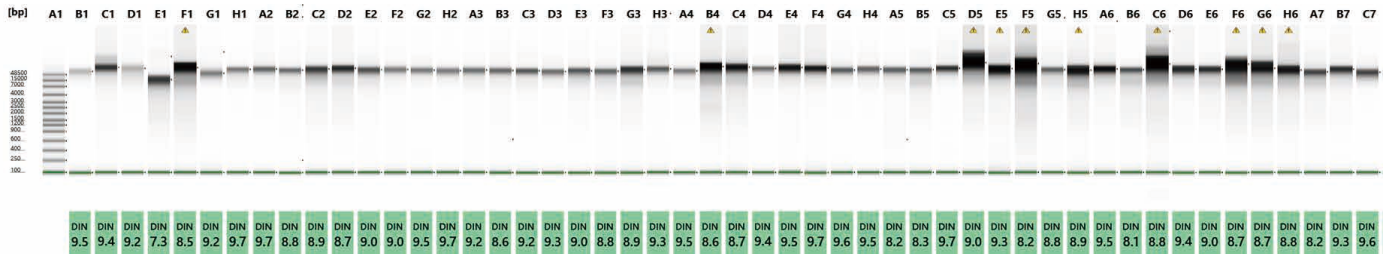


図 2. 1990 年から 2000 年の間に抽出され、Genomic DNA ScreenTape Assay で解析した 50 サンプルのゲル画像および DIN レーン上の警告は濃度が高すぎることを示しています。

サンプルを抽出した年と DIN の関連を図 3 に示します。DNA の品質は 10 年間で安定しており、安定して信頼度の高い DNA 抽出が行われていることが明らかになりました。さらに、すべてのサンプルで高い DIN が得られたことから、20 ~ 30 年にわたる長期の保存後でも DNA サンプルが持続して高い品質を示すことも確認できました。

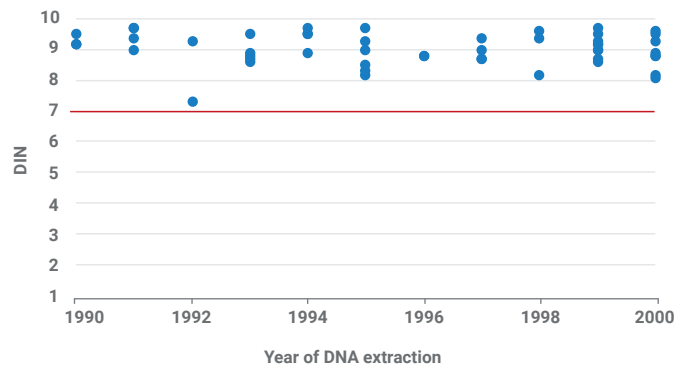


図 3. 1990 年から 2000 年の間に抽出され Genomic DNA ScreenTape Assay で解析した 50 サンプルの DIN

結論

Coriell Institute for Medical Research では、DNA、RNA、およびその他の生体試料の最も多様なコレクションを保有し、国際的な研究コミュニティに提供しています。Coriell では、2016 年に従来のゲル電気泳動に代わり TapeStation System を導入しました。TapeStation System は、核酸分析を自動化し、評価者の経験に依存しない客観的な DNA 品質の指標として、DIN を算出します。DIN を用いて、1990 年から 2000 年の間に

抽出し長期保存された、50 サンプルの品質に関してレトロスペクティブ解析を行いました。すべてのサンプルで高い DIN (> 7.0) を示したことから、Coriell では数十年にわたって gDNA サンプルが高い水準で扱われ、確実に長期保存されていることが確認されました。TapeStation System のような新しい QC 手法の登場により、バイオバンクのサンプルの品質において科学コミュニティが求める品質基準を満たすことを保証することができます。

www.agilent.co.jp/chem/tapestation

本資料掲載の製品は、すべて研究用です。その他の用途にご利用いただくことはできません。

[お問い合わせ窓口]

アジレント・テクノロジー株式会社

本社 / 〒192-8510 東京都八王子市高倉町9-1

●カスタマコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

mail : email_japan@agilent.com

※仕様は予告なく変更する場合があります。

※本資料掲載の製品はすべて研究用です。

その他の用途にご利用いただくことはできません。

<http://www.agilent.com/chem/genomics:jp>

© Agilent Technologies, Inc. 2020

本書の一部または全部を画面による事前の許可なしに複製、改変、翻訳することは、著作権法で認められている場合を除き、法律で禁止されています。

Printed in Japan, October 21, 2019

5994-1362JAJP