

# Femto Pulse System を用いた バイオバンクサンプルの ゲノム DNA 品質評価

## 著者

Chava Pocernich, Jolita Uthe,  
and Steve Siembieda  
Agilent Technologies, Inc.

## 概要

核酸サンプルの品質保証と品質管理は、バイオバンクやゲノム DNA を扱う施設において、また、さまざまな分子生物学アプリケーションにおいても重要です。Agilent Femto Pulse System は革新的な電気泳動装置で、高分子量ゲノム DNA の分析において、従来のパルスフィールド電気泳動装置にかわる装置です。Femto Pulse System は極めて高い感度での高速分析が可能で、シングルセル分に相当する量のゲノム DNA を 70 分以内で定量・定性分析することができます。アジレントの Genomic DNA 165 kb Kit は高分子量ゲノム DNA の分析用に設計されており、再現性の高いサイジング、定量、Genomic Quality Number (GQN) を用いた品質評価を行うことができます。

## はじめに

DNA の品質評価はバイオバンクでの品質管理に不可欠です。また、ゲノム DNA (gDNA) の品質を理解することは下流のプロセスの成功のために重要です。ロングリードシーケンスや、全ゲノムシーケンス、CGH (Comparative genomic hybridization)、Linked-read を用いたマッピング技術などへの関心が高まっており、gDNA の品質、断片化、サイジング、濃度などの情報は良好な結果を得るために必須です。

gDNA の品質評価には、サンプルの断片化や分解の程度を決定することが含まれています。サンプルの品質には、保存条件、抽出方法、凍結融解の繰り返し、変性などのさまざまな要因が影響します<sup>1</sup>。gDNA の物理的、酵素的、化学的な断片化による小さなフラグメントの生成は、gDNA の抽出やハンドリングといったさまざまなポイントで起こり得ます。物理的な断片化は、過剰な混合条件や凍結融解の繰り返し、氷の結晶形成などにより引き起こされます。DNA の周辺の細胞環境を破壊すると、フリーラジカル酸化や脱プリン化、ヌクレアーゼによる消化などによる酵素的・化学的な断片化の引き金となり、短い断片のスミアとなってしまいます。化学的な断片化は、DNA の抽出中の過剰な化学反応によっても起こり得ます。これらの断片化は、ワイドボアチップを使用し、穏やかに混合することで物理的に防ぐこと

ができ、また、化学的、酵素的なプロセスは凍結や脱水、EDTAなどのキレート剤の添加で防ぐことができます。このように、DNAの品質がさまざまな要因で変化してしまうことを考慮すると、長期間にわたって gDNA サンプルを保存する前に品質を記録しておくことが推奨されます。

従来、50 kb を超えるサイズの DNA の分析には、パルスフィールド電気泳動 (PFGE) を一晩かけて行うことが一般的でした。Agilent Femto Pulse System と Genomic DNA 165 kb Kit の組み合わせは、高分子量 gDNA の分析において PFGE にかわるソリューションです。電気泳動はわずか 70 分で終了し、サンプル品質を評価するための時間と費用を節約することができます<sup>2</sup>。また、アジレントのデータ解析ソフトウェア ProSize を使って gDNA の品質を Genomic Quality Number (GQN) で簡単に解析することができます。アプリケーションのニーズに応じて適切な閾値サイズを設定することが可能です。ProSize は、設定した閾値よりも大きいサイズの DNA の濃度を全体の濃度に対する割合として計算します。サンプルに対する GQN スコアは 0 から 10 のスケールで算出され、0 の場合はサンプル中に閾値サイズを超えるフラクションがないことを示し、10 の場合はサンプルすべてが閾値サイズを超えていることを示します。

## 実験方法

装置間の再現性と経時的な分解について、Coriell サンプルの no. 40 (gDNA sample 1) と no. 92 (gDNA sample 2) を 2 台の Femto Pulse System で Genomic DNA 165 kb Kit (型番 FP-1002-0275) を用いて分析し評価しました。GQN の柔軟性を示すため、PacBio の断片化 DNA Femto Pulse System と Genomic DNA 165 kb Kit を用いて分析しました。Promega 社のヒト gDNA (#G1521) を Femto Pulse System と Genomic DNA 165 kb キットを用いて分析し、ピークサイズと、Characteristic fragment length を示しました。

## 結果と考察

### サイジング

Femto Pulse System は高分子量 gDNA の分離にパルスフィールド法を採用しています。この方法により、50 kb 以上の gDNA の平均サイズを決定することができます。また、エレクトロフェログラムは視覚的にサンプルのサイズ分布を表示します。パルスフィールド法を使用しない場合、約 50 kb を超えるサンプルはシャープなピークとして表示され、60 kb 以上としてサイジングされます。gDNA sample 1 は Femto Pulse System で Genomic DNA 165 kb Kit を用いて分析され、平均スミアサイズ 44,800 bp、サイズ分布の範囲は 1,200 から 300,000 bp との結果になりました (図 1)。

### 装置間の信頼性

2 種類の gDNA サンプルを Femto Pulse System で Genomic DNA 165 kb Kit を用いて分析しました。各サンプルはいくつかの異なる濃度で 2 台の異なる Femto Pulse System で分析し、装置間や異なる濃度レンジでのサイズ、濃度、gDNA の品質分析の信頼性・安定性を確認しました (図 2)。装置間および希釈系列での正確性は、サイジングについて 8% 以下、定量について 16% 以下のばらつきを示し、キットのスペック以内に十分おさまっていました。また、GQN は 3% CV という非常に正確な値を示しました。

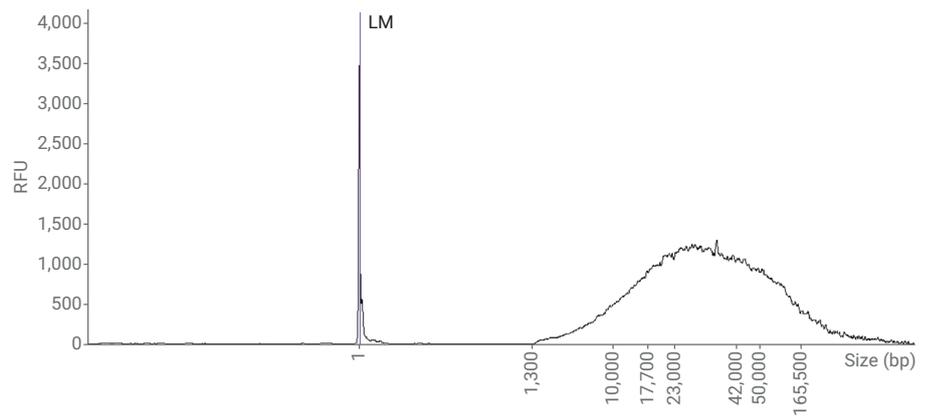


図1. gDNA sample 1 の Femto Pulse System/Genomic DNA 165 kb Kit による分析。LM=Lower Marker。

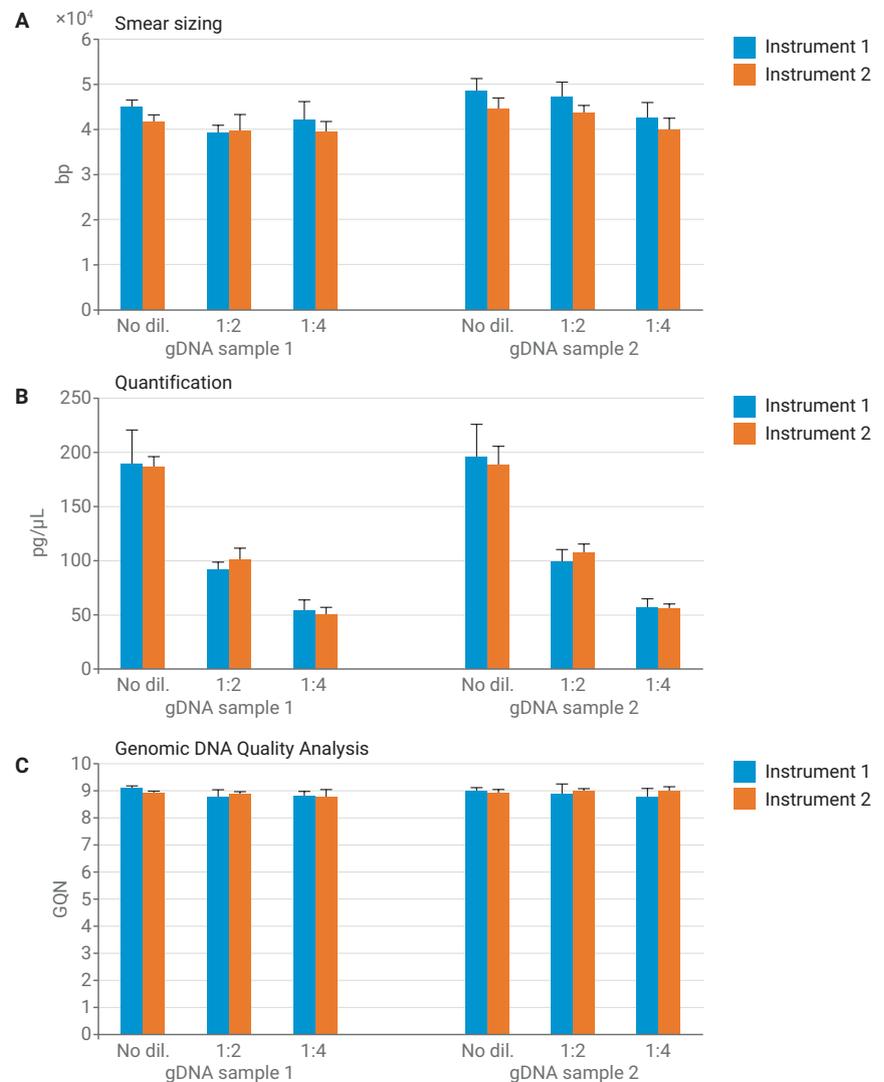


図 2. 2 種の gDNA サンプルを異なる濃度に調整し、2 台の Femto Pulse System で Genomic DNA 165 kb Kit を使用して分析しました。定量、サイジング、gDNA 品質解析 (GQN<sub>10,000</sub>) を 2 台別々の装置で比較し、信頼性と再現性を示しました。n=4。

### Genomic quality number (GQN)

GQN は gDNA の品質に対して、ユーザーが定義した閾値より大きいサイズの DNA 濃度の割合から算出されます。インタクトな gDNA でも生物種などの要因によりサイズのレンジは異なる場合があります。したがって、GQN でサイズの閾値をユーザーが設定できることは、さまざまなサイズの gDNA を扱う上で利点となります。ユーザーはサンプルを下流のプロセスで使用できるかどうかを客観的に判定するために、基準とするサイズを決められることとなります。

今回の分析では、GQN の閾値サイズを gDNA sample 1 と 2 のサイズ分布から 10,000 bp と設定しています。サンプル gDNA の希釈系列間でも DQN は 8.8-9.0 と非常にわずかな差におさまっています (図 2)。GQN 値が 9.0 というのは、サンプル中の 90 % が閾値として設定した 10,000 bp より大きいことを意味し、サンプル中の 10 % が閾値以下であることを示します。時間経過による GQN の低下は、サンプルの分解が起こっていることを示唆しています。

図 3 では、PacBio の断片化 gDNA に対して GQN の閾値サイズを 30,000 bp と設定し、gDNA の品質評価をフレキシブルに行えることを示しています。30,000 bp に閾値を設定すると、平均スミアサイズの小さなサンプルでは GQN が低くなり、平均スミアサイズの大きなサンプルでは GQN が高くなる、という期待通りの結果が得られています。

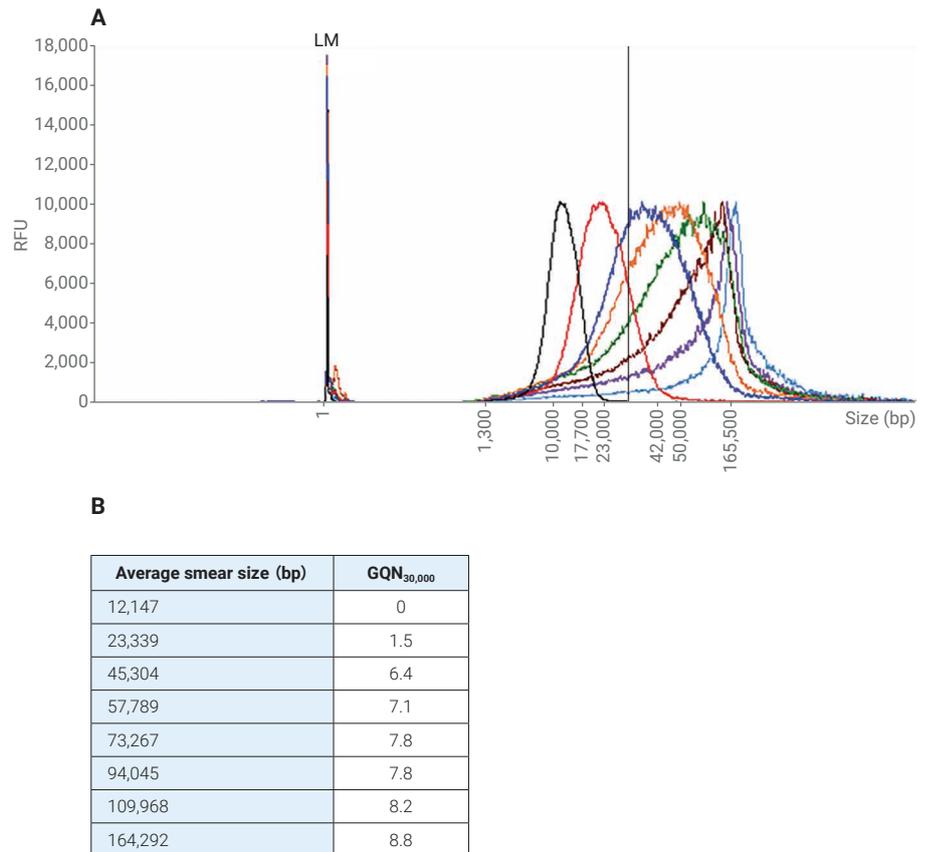
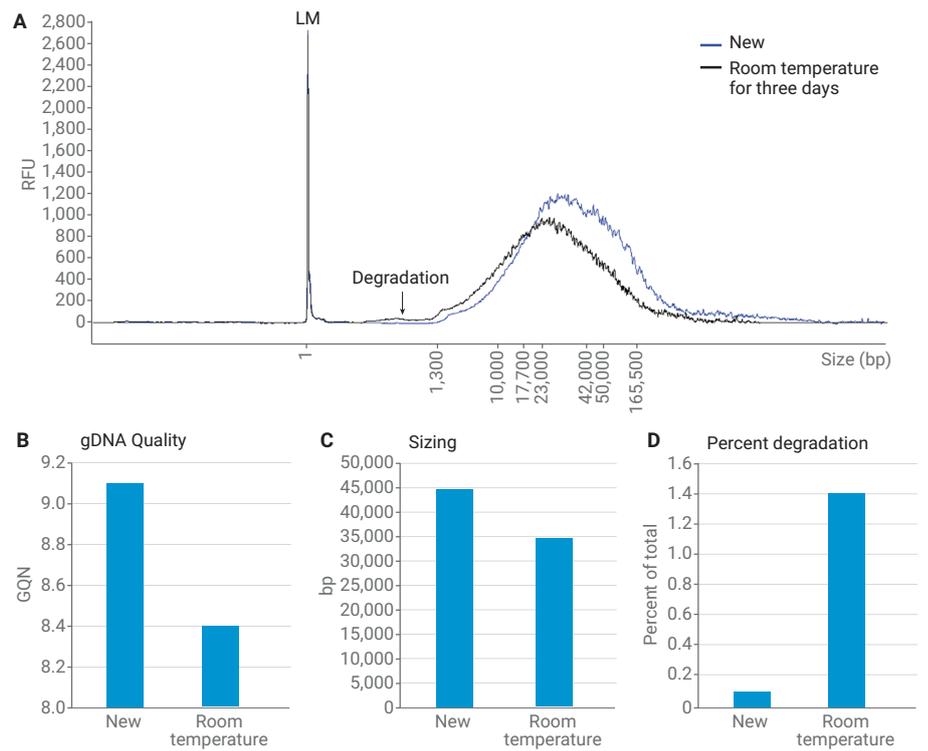


図 3. PacBio の断片化 gDNA を Agilent Femto Pulse System で Genomic DNA 165 kb Kit を用いて分析しました。A) エレクトロフェログラムで表示される泳動結果 B) 平均スミアサイズと GQN<sub>30,000</sub> の比較、n=2、LM=Lower Marker。

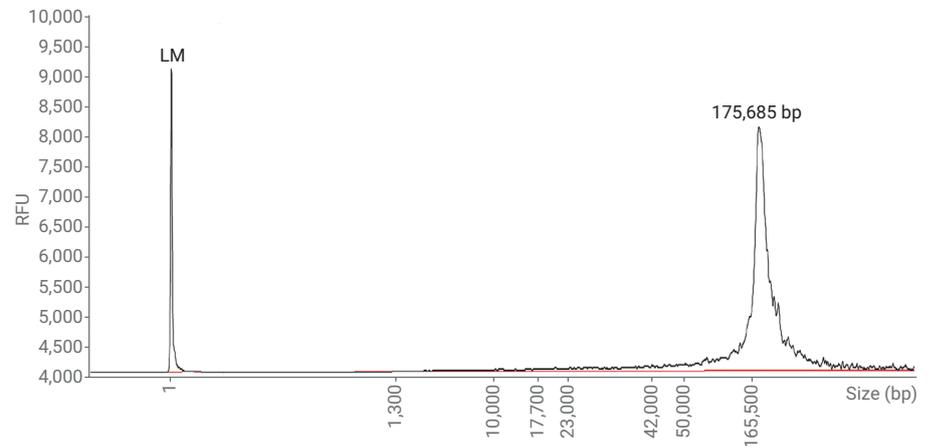
## 分解の検出

Femto Pulse System を使用すると、軽微な分解も検出可能で、GQN の値にも反映されます。gDNA sample 1 のプレートを調製後すぐに解析し、その後 3 日間室温で放置し再度解析しました。gDNA sample 1 の分解は Femto Pulse System による分析では低分子のスメアの存在と、平均スメアサイズの低分子へのシフト（調製直後の測定で 44.8 kb のところ、3 日後の測定で 34.5 kb）に明確にあらわれました（図 4）。

また、分解は GQN<sub>10,000</sub> の値が 9.1 から 8.4 に低下したにも反映されていました。ProSize には Smear Analysis タブで特定のサイズ範囲での設定オプションもあり、分解を示す低分子側のサンプル中の割合を計算することも可能です。Sample 1 について、200 bp から 1,200 bp の分解を示す範囲を解析しました。この範囲にはサンプルのメインのピークより低分子側が含まれ、Lower Marker は除いて解析されます。分解産物は室温で放置したことにより、0.1% から 1.4% に増加しました（図 4）。これはスメア率（smear ratio : SR）もしくは“X kb 以下のフラクション”ともいえます<sup>1</sup>。スメア率により凍結融解による断片化や化学的な分解等を受けた DNA の割合を見積もることができます。



**図 4.** gDNA sample 1 を Femto Pulse system で Genomic DNA 165 kb Kit を用いて分析しました。(A) 室温に 3 日間放置する前（青）および後（黒）のトレース。エレクトロフェログラムにはメインのピークより低分子側に分解によるスメアが観察されます。3 日間室温に放置することにより、Genomic Quality Number (GQN<sub>10,000</sub>) (B) およびサイズ (C) は低下し、低分子領域の分解の割合 (D) は増加しました。n=2、LM=Lower Marker。



**図 5.** Promega 社ヒト gDNA を Femto Pulse System で Genomic DNA 165 kb Kit を用いて分析しました。ピークサイズ 175,685 bp、LM=Lower Marker。

## Characteristic fragment length (CFL)

Characteristic fragment length (CFL) とは、サンプルの中で最も量が多いフラグメントのことを指します<sup>3</sup>。ProSize ではピークサイズとしてレポートされます。DNA の品質をゲル電気泳動で評価する際に、CFL は常にレポートされています。CFL の低分子側へのシフトは簡単に検出可能で、物理的な断片化ストレスによる分解の指標として使用することができます。Promega 社のヒト gDNA を Femto Pulse System で Genomic DNA 165 kb Kit を使用して分析しました。エレクトロフェログラムには 175,685 bp にシャープなピークが表示され、このサンプルの CFL に相当します (図 5)。図 1 にみられるように、すべてのサンプルが明確な CFL を示すわけではありません。そのような場合には、分解度合いのトラッキングに最も量の多いフラグメントのピークサイズ (CFL) のかわりに、平均スミアサイズの変化を利用することができます。

## 結論

高分子量 gDNA の品質を記録することは、ロングリードシーケンスや全ゲノムシーケンスへの関心の高まりにつれてますます重要になってきています。Femto Pulse System は高分子量 gDNA の分析のために従来のパルスフィールドゲル電気泳動を置き換えられる装置で、60 kb 以上の高分子量 gDNA を 70 分以内で分析可能で、シングルセル分に相当する量の DNA まで高感度に検出することができます。gDNA の分解は Femto Pulse System の GQN や平均スミアサイズの変化、Characteristic fragment length、低分子領域のスミアの増加などの指標を用いて簡単に評価することが可能です。

## 参考文献

1. Klingstrom, T.; Bongcam-Rudloff, E.; Pettersson, O. V. A Comprehensive Model of DNA Fragmentation for the Preservation of High Molecular Weight DNA. *BioRxiv: The Preprint Server for Biology* **2018**.
2. Pocerich, C.; Uthe, J.; Wong, K-S. Genomic DNA Sizing and Quality Control with the Agilent Femto Pulse System. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5994-0516EN, **2017**.
3. Cinselli, C. W.; *et al.* Combining Qualitative and Quantitative Imaging Evaluation for Assessment of Genomic DNA Integrity: The SPIDA Experience. *Anal. Biochem.* **2015**, 479, 60-62.

### [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, February 14, 2019

5994-0520JAJP