

性能特性




RNeasy® DSP FFPE キット、バージョン 1

REF

73604

バージョン管理

この文書は「RNeasy DSP FFPE キット性能特性、バージョン 1 R1」です。

  	試験の実施前に最新の電子版を www.qiagen.com/HB-2416 で確認してください。現在の改訂状態は発行日（年/月で表示）により示されます。
---	--

導入・一般事項

The RNeasy DSP FFPE キットはホルマリン固定パラフィン包埋（formalin-fixed, paraffin embedded, FFPE）組織からのトータル RNA 精製を使用目的としています。

この製品は分子生物学技術について訓練を受けた技師や医師をはじめとしたプロフェッショナルな使用者向けの製品です。この製品は、酵素による残留 DNA の除去が含まれた、シリカスピнкаラムに基づく最適化されたプロトコルを使用します。

RNeasy DSP FFPE キットは 70 ヌクレオチドより長い RNA 分子を分離することで、RT-PCR などの応用に有用な RNA 断片の回収を可能とします。

精製 RNA の収量

ヒトのさまざまな組織の FFPE 標本を 5 点（乳がん、結腸がん、肺がん、メラノーマ、正常な皮膚、各 20 標本）用いて RNeasy DSP FFPE キットの基本的性能を評価しました。

FFPE 標本は、大きな組織不均質を示すことがあります。加えて、各 FFPE 標本で組織の表面部分は大きく異なっており、これにより抽出される RNA の量にもばらつきが生じます。よって、ユーザーは標本のセクションの数、セクションの厚みと表面積に加え、実験室で採用される手順を最適化する必要があります。

このキットを QIAGEN® ダウンストリームアプリケーションと組み合わせて使用する場合、関

係するハンドブックを参照してください。

FFPE 組織の準備で、抽出チューブでのパラフィン添加が多すぎ推奨より純度の低いエタノール（分子生物学用グレード試薬でないもの）を使用し、もしくは標本をエタノールに保持することで組織の脱水が不足する場合、抽出は最適なものとはならず、RNA の抽出量は減少し、ダウンストリームでの性能も低下します。

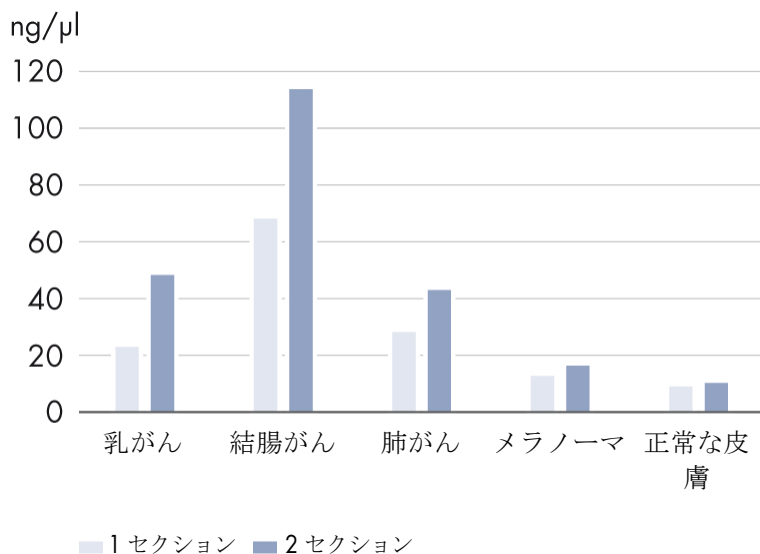


図 1.さまざまなヒト組織からの RNA 収量 (溶出量 32 μL)

ダウンストリームでの分析

溶出した RNA はダウンストリームでのアッセイにすぐに使用できます。性能を評価するため、RNeasy DSP FFPE キットを使い、5 つの異なるヒト組織（乳がん、直腸がん、メラノーマ、正常な皮膚、標本ごとに 1 つまたは 2 つのセクション、標本数 20 点）から RNA 10 ng を分離し、ヒト β-アクチン遺伝子をターゲットとして RT-PCR を使用しました。増幅は成功し、RNeasy DSP FFPE キットによって分離された RNA がダウンストリームの分析に活用できることが示されました。

ユーザーは標本のセクションの数、セクションの厚みと表面積に加え、以降実験室で採用する手順を最適化するか、もしくは関連するダウンストリームアッセイの具体的な性能を参照する必要があります。

	乳がん	結腸がん	肺がん	メラノーマ	正常な皮膚
RT-PCR 1 セクション	✓	✓	✓	✓	✓
RT-PCR 2 セクション	✓	✓	✓	✓	✓

図 2. 2つの異なったヒト組織から得た 10 µm の FFPE セクションの RT-PCR での増幅の成功例。

溶出の安定性

溶出の安定性は、同時に精製される不純物（組織の種類に関係）の含有量と種類、溶出の量、保存の条件に左右されます。必要となる溶出安定性をユーザーが決めることを推奨します。

-15~-30°C および -60~-90°C で保存した FFPE 由来のヒト RNA 標本において、溶出の安定性をテストしました。12 週目までは劣化は見受けられず、常温（18~25°C）で保存された溶出液は 12 時間まで安定していました。ヒト β-アクチン遺伝子をターゲットとした RT-PCR を使用して、すべての条件を調べました。

このキットを QIAGEN ダウンストリームアプリケーションと組み合わせて使用する場合は、関係するキットのハンドブックを参照してください。

反復性

ヒト血液の有核細胞の FFPE 標本を使用し、反復性を評価しました。ABI® 7900 リアルタイム PCR サイ클アーにより、295 bp のヒト β-アクチン遺伝子断片向けの内部的に検証済みの試験を標本に対して行いました。

統計的分析のために、3 回の抽出バッチ（同一ロットのキット、オペレーター、日付）についての 108 のデータポイントが使用されました。統計的分析には、β-アクチン RT-PCR から取得した C_T 値の標準偏差 (SD)、変動係数 (CV) が含まれます。SD は 1.1 C_T 、変動係数は 4.1% でした (表 1)。

表 1.反復性結果

	反復性		
	平均 C_T	SD	CV (%)
バッチ 1	26.64	1.01	3.81
バッチ 2	27.51	1.16	4.2
バッチ 3	27.23	0.95	3.5
バッチ 1 + 2 + 3	27.13	1.11	4.07

再現性

再現性の検証はヒト血液の有核細胞の FFPE 標本から異なるオペレーター、異なる日、異なるオペレーターと日に RNA 抽出を行い、評価しました。ABI 7900 リアルタイム PCR サイクルにより、295 bp のヒト β -アクチン遺伝子断片向けの内部的に検証済みの試験を標本に対して行いました。統計的分析のため、3 回の抽出バッチから各テストにつき 108 のデータポイントが使用されました。統計的分析には、 β -アクチン RT-PCR から取得した C_T 値の標準偏差 (SD)、変動係数 (CV) が含まれます (表 2)。

表 2.再現性結果

	再現性		
	平均 C_T	SD	CV (%)
異なるオペレーター	26.92	1.06	3.95
異なる日	26.56	1.20	4.53
異なるオペレーターと日	26.63	1.01	3.78

直線性

RNeasy DSP FFPE キットはさまざまな種類の FFPE 組織からの RNA 分離に使用できます。ヒト血液の有核細胞の FFPE 標本から得た 1~4 のセクションについてシステムを検証し、RNA 収量が線形に増加することが示されました。直線性の範囲はカスタマの要求に基づいて決めるべきであり、特定の用途ごとに検証すべきです。異なる種類の組織では、システムへの組織の投入量、組織の特性、ダウンストリームアッセイにより、直線性の範囲も異なることが想定されます。

影響物質

さまざまな原因から影響を及ぼす物質が発生することがあります。例えば、組織や臓器の種類に特有の、天然の代謝物が病態時に発生する場合、患者の治療に由来する物質、患者が摂取した物質などが考えられます。影響物質の複雑さ、およびダウンストリームアプリケーションにおける感度が多様であることから、各ユーザーが使用するシステムごとに影響物質の効果を評価し、具体的なダウンストリームの診断アプリケーションで影響物質の干渉を管理できる手法を検証することを推奨します。

標本の処理と RNA 抽出においては、RNeasy DSP FFPE キットのコンポーネントに由来する影響物質は観測されませんでした。

特定の QIAGEN ダウンストリームアプリケーションについての影響物質の詳細については、キットのハンドブックを参照してください。

相互汚染

相互汚染のレベルを検証するため、血液からのトータル RNA 500 ng を脱パラフィン溶液に加え、隣接組織を RNA が含まれないチューブ（陰性対照）に分離しました。この検証は、ターゲット分子である RNA を多く含有する標本が抽出の手順を行っている間、他の標本を汚染する可能性の再現を試みたものです。RNA 精製は単一のロットの試薬により行いました。ヒト β -アクチン遺伝子をターゲットとした RT-PCR を使用して、相互汚染を調べました。結果では、全システムでの相互汚染が示されました。

最新のライセンス情報と製品ごとの免責事項については、該当する QIAGEN キットハンドブックまたはユーザーマニュアルを参照してください。QIAGEN キットハンドブックとユーザーマニュアルは www.qiagen.com から取得でき、もしくは QIAGEN テクニカルサービスないしは各地の代理店でご用意いたします。

注文 www.qiagen.com/contact | テクニカルサポート support.qiagen.com | ウェブサイト www.qiagen.com