

**WHO 分類 2016(4th. rev.) Diffuse glioma/遺伝子分析プロトコル案 1 : DNA 配列解析 (ダイレクトシーケンス) について 11 Sep. 2017 氏福**

**DNA 抽出法**

1. パラフィン包埋検体からの抽出する場合 (フェノールクロロホルムエタノール沈殿)

**< Materials >**

**Paraffin section** 5-10 $\mu$ m 厚。もっと厚くても、後の proteinase K 処理で消化/溶かせるなら大丈夫。

**Xylene** 脱パラフィン剤

**Ethanol (EtOH)/100% および 70%** 処理の有機溶媒をのぞいたり、エタノール沈殿に使ったり。

**Digestion buffer = 50mM Tris HCl (pH 8.5), 1mM EDTA, 0.5% Tween 20** キレートと、界面活性剤入りのバッファー (緩衝液)。Proteinase K 処理時に使用  
**10mg/ml proteinase K** 検体 (肉) を溶かす

**10mg/ml RNase A** いらぬ RNA を分解。きわめて安定で、そのほかの RNA 実験に対してコンタミネーションを起こすため、必ずフェノール処理などで失活させる。

**Phenol/Chloroform 1:1** タンパク質変性剤。途中で使った酵素や肉に含まれるいらぬタンパクを除去

**Chloroform** タンパク変性、およびフェノールを除去する目的。

**3M NaOAc (酢酸ナトリウム)** エタノール沈殿で使う

**DDW** 純水製造装置を使って作った実験用の脱イオン水。電気 (代) の塊。

1) パラフィン包埋組織を 5-10 $\mu$ m の厚さに切断し (大きさは少なくとも 6mm $\times$ 6mm)、切片 1~3 枚を 1.5ml エッペンドルフチューブに移す。あるいは、HE 染色で腫瘍部位を特定し、カッターナイフで切り取る (未染プレパラート 10 枚分程度)。

2) Xylene 1ml を加え 20 分前後静置/あるいは振盪。室温 12000rpm 5 分間遠心分離し、上清を除く。この操作をもう一度追加。パラフィンが残存しているようであれば操作を適宜繰り返す <パラフィン除去のステップ>。

3) Xylene を除いたチューブに、100% EtOH を加え、手で軽く振盪。室温 12000rpm 5 分間遠心分離。上清を除く。この操作を一度追加 <Xylene 除去のステップ>。

4) Digestion buffer 100  $\mu$ l と proteinase K 10  $\mu$ l を加え、十分組織を混和

/pipeting して 37°C 水浴中で overnight (O/N)。

5) ×100 RNase A を 1 μl 加え、37°C 1 時間水浴。

6) フェノールクロロホルム (1:1) 液 100 μl 加え、vortexing (機械で激しく混和)。4°C 12000rpm 5 分間遠心分離。底に沈んだ有機層や中間に沈んだ pellet (変性したタンパク) を吸わないように DNA が溶け込んだ水層を回収する。この操作を 1 回追加。

7) クロロホルム 100 μl を加え、6) 同様の操作を 2 回行う (フェノール除去のステップ)。

8) 回収した水層に、100% EtOH 200 μl および 3M NaOAc を 10 μl 加え混和。DNA 共沈剤として 50mg/ml グリコーゲン を 0.5 μl ずつ加える。

9) 4°C 12000rpm 15 分間遠心分離。上清を捨て、70% EtOH を加え 1 分遠心。十分に上清を除去して風乾。DDW 150 μl を加え、DNA pellet を溶解する。見えなくても、DNA が沈殿するはずの部分に水を加え、十分 pipeting する。十分に溶解するつもりなら 4°C で O/N とする。

10) Nanodrop で濃度と A260/A280 を計測。10ng~2μg を次の実験に用いる (可能であれば 2μg 使用)。今回は genomic DNA であり 10ng 使用。

2. 凍結保存組織からの抽出→組織は氷冷、あるいは液体窒素保存で Lab に搬入する。

<Materials> QIamp DNA Mini kit を使用する/カラム (=合成樹脂でできたフィルターで、いったん目的の DNA をとらえて、後で溶かしだすことのできるもの、と思えばよい) キット。注: バッファーや溶液の名前が紛らわしいので間違えないように。AL、ATL、AE、AW1、AW2 は全部別物です。

- 1) 検体 (最大 25mg) を滅菌した 100cc ビーカーに移し、手術用のはさみでホモジネートする (のが正統派)。→めんどくさいので、使い捨てプレートの上などで、点滴用の針やメスなどで組織を突き崩した方が早い。もっと具体的には、切り刻んでジャム状にする。物理的に検体を小さくするほど後の反応が早い。
- 2) Buffer ATL 180 μl を加え、1.5ml のエッペンドルフチューブに移し、さらに Proteinase K 20 μl を加える。56°C で 1~3 時間インキュベート (overnight: O/N でもよい)。時折 vortexing しながら、組織片が完全に溶けるまで行う。
- 3) Buffer AL 200 μl を加え、15 秒間十分に vortexing したのち、72°C で 10 分間インキュベート。沈殿物は気にしない。
- 4) エタノール (96~100%) 200 μl をサンプルに添加し、15 秒間 vortexing する。数秒間 spin down する (フタなどに付いた溶液を卓上遠

心分離機などで振り落とす)。

- 5) 4) の溶液を (縁を汚さないよう) カラムにいれ、フタを閉めて 6000g (8000rpm) で 1 分間遠心分離する。
- 6) カラムを新しいチューブに移し、フタをあけて 500 $\mu$ l の Buffer AW1 を注入し、フタを閉めて 6000g (8000rpm) で 1 分間遠心分離する。
- 7) カラムを新しいチューブに移し、フタをあけて 500 $\mu$ l の Buffer AW2 を注入し、フタを閉めてフルスピード (20000g あるいは 14000rpm) で **3 分間**遠心分離する。
- 8) カラムを 1.5ml のエッペンドルフチューブに移し、マトリクス (カラムの底にある樹脂部分/フィルターのこ) に慎重に Buffer AE 200 $\mu$ l を注入する。室温で 5 分間インキュベート (静置) し、6000g (8000rpm) で 1 分間遠心分離する。

Nanodrop などの分光光度計(共用実験室にある)で DNA 濃度を計測。 **10ng~2 $\mu$ g** を次の実験に用いる (可能であれば **2 $\mu$ g** 使用)。 今回は **genomic DNA** であり **10ng** 使用。

補足) サンプルが貴重な場合には 8) をあと 2 回繰り返して DNA を回収。

## PCR

A :

プライマーの選定については、オリジナルの研究でなければ、徹底的に先行文献を調べて、流用する。先行研究でうまくいくことが検証されているため安全である場合が多い。自分で設定する場合には、Primer 3 などの web tool を用いて行う/目的とする DNA 配列の取得や、ターゲットの設定、T<sub>m</sub> 値の知識など、やや詳しく勉強する必要あり、ここでは省略。

B :

まずプライマー液の準備。プライマーとして使う DNA オリゴヌクレオチドは外注。今回は北海道システムサイエンス社/代理店テクノスズタ。ネット経由で注文すれば 2 営業日後には届く/医局に物品購入願提出すること。一番安いゲルろ過、一番小さいスケールで十分/1 本 1500 円前後、一セット 3000~4500 円前後。一応マイナス 20 $^{\circ}$ C 保存としているが、本当は buffer に溶かす前なら室温でも問題ない。届いたチューブをフルスピードで 5-10 分遠心分離し DNA (の粉) を底に落とす/ほとんど肉眼では見えないので、底にあるはずと信じて、これ以後の操作をする。静かに TE (pH 8.0) buffer を入れ、ピペッティング/pipetting して溶かす。TE の量は、業者が 100  $\mu$  M (=100pmol/ $\mu$ l) になるように注文書などに記載している。実際には 10  $\mu$  M で使うので、幾つかに分注し、TE で 10 倍に希

積する。なるべく本体は温存し、分注希釈したものを実験の時に繰り返し溶かすようにする/凍結溶解をするたびに、DNA が分解するため。

C :

以下の操作は可能な限り氷上 (4°C) で行うこと。特に酵素は、直前まで冷蔵保存し、使用後はすぐに冷蔵庫に戻す/あるいは専用の保冷器を使用する。

1) 酵素や buffer を混和する。1 検体当たりのレシピは次のとおり/超節約レシピ。混ぜるのは安全な順 (水⇒バッファー⇒dNTP⇒プライマー⇒酵素あるいは template DNA)。酵素を混ぜたら、スピンドウンなど乱暴な操作をなるべく回避する。

5× GO buffer (電気泳動用の dye 入り)	2μl
Foward primer (10pmol/μl=10μM)	0.1μl
Reverse primer(10pmol/μl=10μM)	0.1μl
2.5mM dNTPs mixture	2.0μl
Prime Taq	0.1μl
ddH <sub>2</sub> O (ミリ Q 精製水を使用)	to 9μl

→ここまでの合計 9μl になるよう水の量を調整。

10ng/μl DNA 液 (template)                      1μl→合計 10μl

通常、上記のテンプレート DNA 以外(場合によってはテンプレート DNA と水以外)を必要検体分だけ混ぜて、マスターミックスを作り、その後に分注することが多い。その際、ピペッティングロスを起こすので、必要量の 1.1~1.2 倍を作る。

2) サーマルサイクラー(共用実験室にある/プログラム法は各機材で異なるので、その場で覚えるしかない。基本は同じ)を次のようにセットし、検体を incubate する。

Step1    94°C    2分 (02:00)

Step2    94°C    30秒(00:30)

          55°C    30秒(00:30)

          72°C    30秒(00:30)/ Prime Taq の性能が 1kbp/1min →この Step2 を

合計 N サイクル繰り返す (N は研究によって違うが 20 サイクル以上。ゲノム DNA からは最低 30 サイクル。今回は 35-45 サイクルと教わったが、増やし過ぎても、non specific な増幅が起こるだけでよろしくない。)

Step3 4°C 99:99 あるいは∞ (古い機種では 99:99 は永久という意味に認識する。機械を止めるまでこの温度を保ち続ける) /ここで overnight としてもよい。

### PCR で増幅した DNA の精製

ExoSAP-IT という試薬で、dNTP やプライマーをを一気に分解してしまう方法 (ただし、試薬は高額/約 18000 円)。

1. ExoSAP-IT(100x)を氷上にて脱イオン水で 20 倍に希釈し、5x 酵素溶液を調整。
2. PCR 反応液に 5x 酵素溶液を 1/4 量加えて、最終濃度が 1x になるようピペットティングで混ぜる。
3. 37°C で 30 分間反応させる。 <プライマー、dNTP の分解>
4. 80°C で 20 分間反応させる。 <ExoSAP-IT 酵素の失活>
5. 4°C または -20°C で保存。シーケンス操作へ。

### サンガーシーケンス

ABI PRISM 3130xL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) などの機材が必要 /遺伝子実験施設。試薬には BigDye® Terminator V3.1 (24 検体分/約 14 万円だが、極限まで節約して使う)。精製はエタノール沈殿。

1. チューブ 1 本当たり、下記組成になるようシーケンス反応液を調整する。ここでいうプライマーとは、F プライマーあるいはシーケンス専用のプライマーのこと。

鋳型 DNA (精製後の PCR 反応液)	2.1 $\mu$ l
BigDye terminator ver 3.1	0.2 $\mu$ l
プライマー(10 pmol/ $\mu$ l)	0.3 $\mu$ l
5x バッファー	1.9 $\mu$ l
ddH2O	5.5 $\mu$ l / total 10 $\mu$ l

2. 以下のサイクルシーケンス条件で PCR を行う。

Step1 96°C 1 分 (01:00)

Step2 96°C 10 秒(00:10)

50°C 5 秒(00:05)

60°C 4 分(04:00)/ 30 サイクル

Step3 4°C 99:99(∞。保存。)

3. 上記 PCR product に、室温で、2  $\mu$ l 3M NaOAc を分注、その後に 30  $\mu$ l 100% EtOH を加え、軽く混和し 10 分間静置。
4. 15000rpm, 4°C, 20 分遠心
5. 上清をピペットで除去/ペレットを吸わないように。
6. ペレットに 70% EtOH 60  $\mu$ l を加える。
7. 15000rpm, 4°C, 15 分遠心
8. ペレットに 12  $\mu$ l の formamide を加え、十分にピペッティング/ここで十分に溶解せず、ペレットを失う失敗が多いとのこと。十分注意。
9. 96 穴プレートに検体を移し、乾燥防止にキャップで密閉。
10. 95°C、2 分間 incubate
11. すぐに on ice とする。長期保存するなら -20°C へ。

以後、遺伝子実験施設で ABI PRISM にかける/全自動の工程、試薬の追加なども不要/おそらく慣れるまで使い方が難しく、操作ミスで壊すと高額 of 修理代請求が届く/慣れるまで必ず指導者と一緒に。結果をイントラネットでダウンロード、あるいは CD、DVD に焼いて保存 (USB メモリ厳禁)。結果はパソコンの解析ソフト (フリーウェアを使う予定) で解析。

#### 実験環境考察：医局でやるか、研究棟までいかなければならないか

「基本原則：医局実験室でできるなら、DNA 実験であり途中中断できるプロセスが多いため、片手間で空き時間を見つけて DNA 抽出までは比較的簡単にできる (ハズ)。無理なもの (具体的には、DNA 濃度測定や、PCR、電気泳動、シーケンス) は、予約やアポイントを取り、途中中断されない時間を数時間単位で作る必要がある。ドライ解析は、イントラネット経由でデータを落とし。自前のパソコンで可能 (なハズ)。」

- ・パラフィン切り出し用のマイクロトームは病理診断科にお願いして使わせてもらったほうが良い (現時点で、Dr.梅野が施行可能)。
- ・未染の切り出しは、検体多数になるなら正式に病理診断科に委託の形で費用を払ってやってもらう必要がある。手間によって異なるとおもわれるが、Dr. 梅野コメントでは 500 円/1 例程度。
- ・現実、buffer の調整などが医局で困難なことも多いが、買うか分けてもらえば

クリア可能。すでに Milli Q、pH メーター、秤などはあるから、やろうと思えば自前でもできる（正確に言うと、オートクレーブが必要/安くて 18 万円台から/むしろ設置場所が問題）。手間、時間、やる気などのバランスをとって考える。

・DNA 抽出までは、温度調節機能つき遠心分離機（安くて 25 万円程度から）があれば、医局実験室でできる。多少暴論であるが、温度調節なしの遠心分離機で妥協するなら 14 万円台で在る。冷蔵庫はある。ドラフトはある、ピペットエイドなどもそろえれば大丈夫（5 万円弱+フィルター、使い捨てピペットなどの消耗品）。マイクロピペット（ピペットマン）はある。恒温槽も 2 台ある（できればヒートブロックのインキュベーターがほしい、安くて 25 万円程度/ただし必須ではない。本当は安くていいから製氷機がほしい/10 万弱から）。

・フェノール、クロロホルムの廃棄方法を学内ルールに基づいて整備する必要あり。Lab を使うなら、医局職員さんに労災が起きないように配慮が必須。

・PCR までなら、プライマーは 1 セット（F, R。場合によっては sequencing 用）3000~4500 円前後で、数百回の実験に使える。酵素も Prime Taq でよければ 200 反応 4500 円。超高額というわけではない。

・Nanodrop(分光光度計、160 万円台から)、サーマルサイクラー（安くて 60 万円台から）はさすがに高額になるので、遺伝子実験施設/あるいは基礎棟共用実験室に行ったほうが現実的。

・DNA の電気泳動は 1x TAE buffer などのバッファーが常備できるか、という問題や、エチジウムブロマイド (EtBr。DNA を染める色素。発がん物質) の管理、廃棄の問題があり、どうせトランスイルミネーターや写真撮影装置が必要でそれなりに高額（たぶん 100 万円を軽く超える）。生化学教室など Lab のものを使わせていただく必要あり、医局では無理。もちろんアガロースの購入や、電気装置、ゲルの型や comb、メスシリンダー、フラスコ、ゲル加熱用の電子レンジ（発がん物質扱うため専用のもの）も必要。

・シーケンサーは遺伝子実験施設まで行く必要あり。長期的には BigDye terminator (145,605 円税込み)、ExoSAP-IT (17,500 円税抜き) などの高額試薬を自前で負担する必要あり。利用権（有料）は現時点で氏福が保有。シーケンサーの利用料（ABI PRISM 3130xL では年間使用量 3000 円+消耗品代 1 run 2000 円/16 検体分）も将来的には払う必要あり。

・パソコンはとりあえず自前、フリーソフトで OK。データベース構築や個人情報保護の問題がでたときには考慮する。

・実験自体を遺伝子実験施設に委託することもできる。ただし、プライマーの準備と検体からの DNA 抽出、PCR までは各教室でやるのが原則。実験系を確立し、委託料（1100 円/1 検体）を支払うことが条件/遺伝子実験施設ホームページ参照。

＜まとめ＞今後、IDH1/2 mutation の検討など、遺伝子検査の恒常化をめざすなら、まず医局で検体 DNA を調整できるようになることが望ましい。

実験ノートはできるだけ詳細に記載しています。見たい人は、氏福にお申しつけください。

＜参考：使用した IDH1/2 関連プライマーの根拠となる資料＞  
脳神経外科の本命の IDH で、よりオリジナルの論文に近いもの

IDH1 [3]	PCR-forward	5'-AATGAGCTCTATATGCCATCA CTG-3'
	PCR-reverse	5'-TTCATACCTTGCTTAATGGGTGT-3'
	sequencing	5'-GCCATCACTGCAGTTGTAGGTTA-3'
IDH2 [9]	PCR-forward	5'-TTGTTGCTTGGGGTTCAAAT-3'
	PCR-reverse	5'-TGTGGCCTTGTACTGCAGAG-3'

#### References

- 3 Bleeker FE, Lamba S, Leenstra S, Troost D, Hulsebos T, Vandertop WP, Frattini M, Molinari F, Knowles M, Cerrato A, Rodolfo M, Scarpa A, Felicioni L, Buttitta F, Malatesta S, Marchetti A, Bardelli A. IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. Hum. Mutat. 2009;30:7-11.
- 9 Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. N. Engl. J. Med. 2009;360:765-73.

国立がん研究センターの論文:A combination of TERT promoter mutation and MGMT methylation status predicts clinically relevant subgroups of newly diagnosed glioblastomas. Acta Neuropathol Commun. 2016 Aug 8;4(1):79.

上記 IDH1 のプライマーが患者 DNA で機能しなかった⇒変更したプライマー

5'-CGGTCTTCAGAGAAGCCATT-3' (sense) and 5'-CACATTATTGCCAACATGAC-3'



これなら増幅される配列はの 122bp になり、機能した。引用元は IARC の論文 ([Am J Pathol.](#) 2009 Apr;174(4):1149-53)。原著では SSCP と sequencing を行ったとある。

<今後の研究課題> 2014 年 Acta Neuropathologia の *H3F3A* のプライマー  
Primers for *H3F3A* Sanger sequencing: AATTTCCAGATTTGGGGAGG および  
GCAAAAAGTTTTCTGTTATCCA

Primers for M13 sequencing tails:  
GTAAAACGACGGCCAGTAATTTCCAGATTTGGGGAGG および  
CAGGAAACAGCTATGACCGCAAAAAGTTTTCTGTTATCCA

参考文献: Brain Pathol. 2013 Sep;23(5):558-64. doi: 10.1111/bpa.12042.