



Application

## cfDNAの抽出及び抽出したDNAのリアルタイム定量の方法検討

製品名

High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit (40rx) (05114403001)

メーカー名

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

製品名

KAPA Human Genomic DNA Quantification and QC Kit (KK4963)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは、社会医療法人大雄会医科学研究所 菊池有純 様のご厚意により掲載させて頂きました。

### 背景

cfDNA (Circulating cell-free DNA : 血中遊離 DNA) は数百 bp のサイズに断片化されていることから、効率的に回収することが比較的難しいと推察されています。今回は、末梢血サンプルから血漿を分離し、市販の4種類の DNA 抽出キットを用いて cfDNA を抽出しました。

また、KAPA Human Genomic DNA Quantification kit を用い、リアルタイム定量 PCR により DNA を定量し、更に cfDNA の断片化 (デグラデーション) の状態を確認しました。

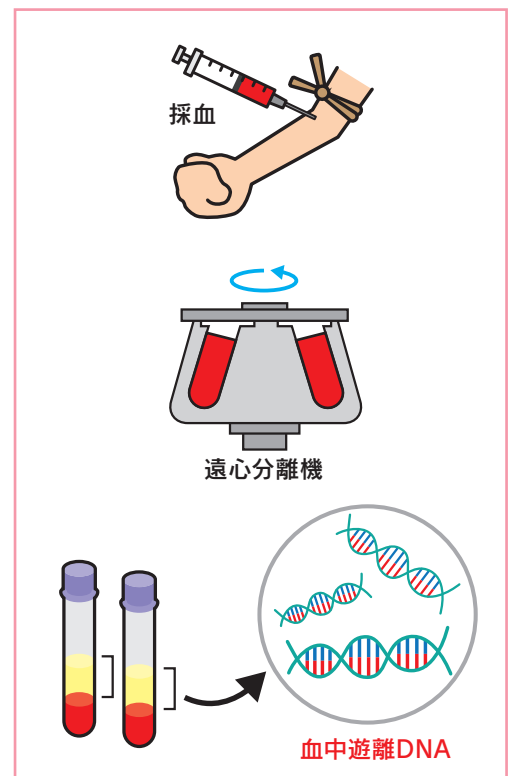
### 本実験のワークフロー

採血量 6 mL あたり血漿 2 mL

血漿 cfDNA の抽出	血漿サンプル量 (mL)	溶出バッファー量 (μL)
High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit	2.5	100
R 社カラム式 cfDNA 抽出キット	2.0	100
Q 社カラム式 cfDNA 抽出キット	2.0	100
T 社磁気ビーズ式 cfDNA 抽出キット	2.0	100

↓  
cfDNA の定量と断片化の状態の確認

KAPA Human Genomic DNA Quantification and QC Kit



## KAPA Human Genomic DNA Quantification and QC Kit について



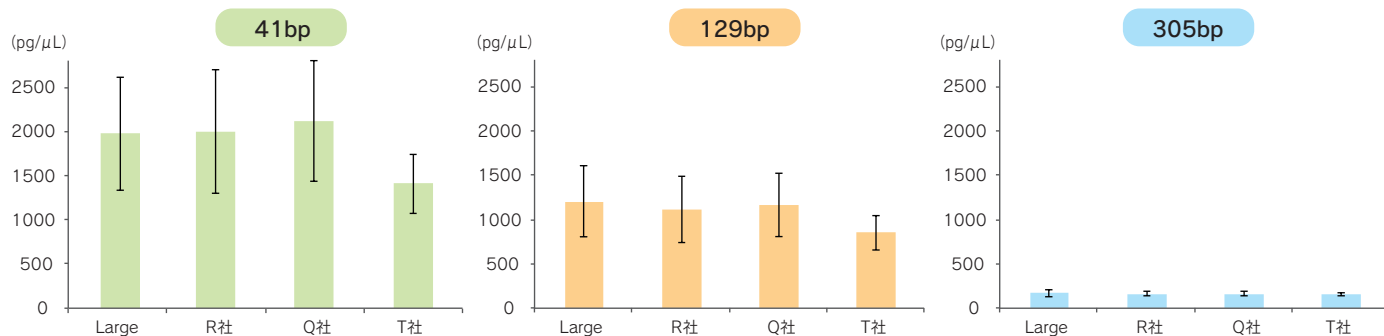
FFPE\*サンプルのように微量で品質にバラつきがあるヒトゲノムDNAサンプルについて「qPCRによる定量」と「品質 (デグラデーションの状態など) の推定」が可能なキットです。

\*FFPE : ホルマリン固定パラフィン包埋サンプル

- 高感度で信頼性の高い qPCR 法により、微量な DNA サンプルでも定量が可能です。また、「PCR が可能な品質の DNA 量」として定量できます。
- ロット間差を最小限に抑えたバリデーション済み DNA 定量スタンダードが希釈済みで添付されています。
- 同一部位の長さが異なる 41bp、129bp、305bp をそれぞれ定量することで、「PCR 可能な DNA 分子がどの位のサイズまで存在しているか (どの位デグラデーションが進んでいるか)」が推定できます。
- サンプルの DNA 量を定量するとともに、品質もチェックできるため、次世代ライブラリーに供するかどうかの判断や、得られるシーケンスデータの推測が可能となります。

## 結果

### KAPA Human Genomic DNA Quantification and QC Kitの結果



		Large	R社	Q社	T社
収量 mean (pg/μL)	41bp	1974	2000	2118	1406
	129bp	1203	1110	1163	851
	305bp	168	165	163	154
Q ratio	129bp/41bp	0.61	0.55	0.55	0.61
	305bp/41bp	0.08	0.08	0.08	0.11

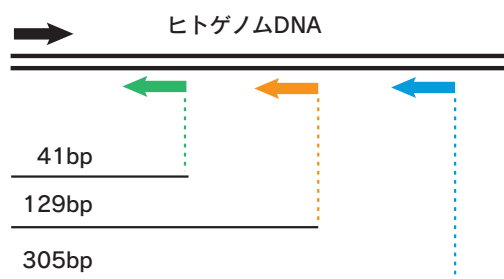
KAPA Human Genomic DNA Quantification kitでは、41bpのプライマーでDNA量を定量できます。(補足 1. 参照)  
今回の結果では、少しばらつきが見られましたが、概ね、ほぼ同等の収量が得られました。

次にQ ratioの比較では、どのキットもほぼ同様の数値が示されました。  
これにより、どのキットであっても回収されるcfDNAのサイズ分布に相違がないことが示唆されました。

なお、Q ratioの値としては、概ね一般的なcfDNAのサイズ分布(補足 2. 参照)に準ずる値と判断されました。

## 補足

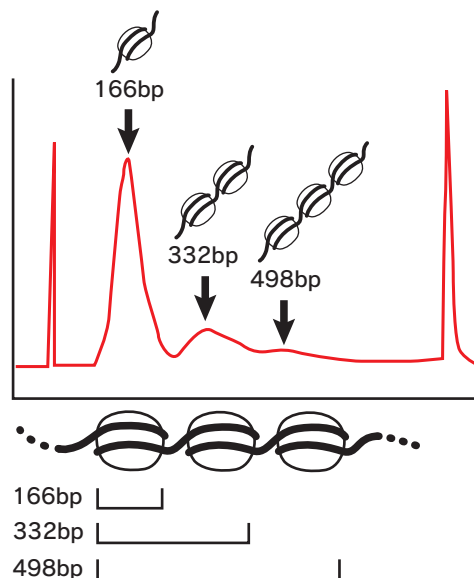
### 1. KAPA hgDNA Quantification and QC Kitの原理



本キットでは

- ① 41bpを用いてqPCRによるDNA量定量を行う
  - ② 129bp、305bpを用いて品質(デグラデーションの状態など)の推定を行う
- ※41bp、129bp、305bpが同程度に検出される→断片化していない  
41bp>129bp>305bpの順に検出される→断片化している

### 2. cfDNAのサイズ分布



#### お客様のコメント

リキッドバイオプシーの実施に向け、克服すべき課題のひとつに検査に使用可能な核酸を安定的に抽出することがあると思います。

今回の検討はそれに向けた予備的検討の一環です。当研究所ではHigh Pure Viral Large Volume Kitは以前、尿および透析液中の核酸抽出において使用経験があり、使いやすさと性能については評価済みでした。今回の検討より、他の市販キットと同等のQ値が得られたことから、cfDNAの抽出目的でも使用可能となりました。