

この電子化された添付文書をよく読んでから使用してください。

* 2024年7月改訂（第2版）
2020年11月作成（第1版）

体外診断用医薬品

製造販売承認番号： 30200EZ00048000

染色体構造変異解析キット

GenetiSure Dx Postnatal Assay 「アジレント」

型番 K1201-64100 / K1201-64200 / K1201-64300 / K1201-64400 / K1201A

警告

本品は出生前診断には用いないこと。

重要な基本的注意

本品による検査を実施する際には、関連学会が作成する最新のガイドライン等を参考にすること。

全般的な注意

- 本品は、体外診断用医薬品であり、使用目的以外では使用しないでください。
- 検体およびサンプルは感染性物質として、Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories および CLSI ドキュメント M29-A のガイドラインなどに従って取り扱いください。すべての作業面を、脱イオン水または蒸留水で新しく調製した 70% エタノール液で十分に清掃して殺菌してください。
- ラボの作業区域で飲食または喫煙しないでください。
- 本品の詳細な取扱説明書 (IFU) を提供しております。ご使用前に本電子添文をよくお読みください。本電子添文 および 取扱説明書 に記載された使用方法以外の使用については、結果の信頼性を保証できないので、必ず記載内容に従って使用してください。
- 本品は、臨床症状に基づき染色体検査を受検する患者の末梢全血から採取したゲノム DNA (gDNA) 中の copy number variations (CNV) および copy-neutral loss of heterozygosity (cnLOH) を出生後診断するための定性的アッセイです。
- 本品は、発育遅延、知的障害、先天異常、または外表形態異常等に関連する CNV および cnLOH の検出を目的としています。アッセイ結果は、医師の実地診療基準に従い、適宜、代替法による確認、親の評価、臨床遺伝的評価、カウンセリングなどから得られるその他の臨床所見および診断所見と組み合わせて使用してください。アッセイ結果の判定は、必ず、適切な判定を行える十分な経験を持った判定者が行ってください。
- このアッセイは、SureScan Dx Scanner 「アジレント」を使用し、CytoDx ソフトウェアで解析することを想定しています。使用する医療機器の電子添文や取扱説明書を良く読んでから使用してください。
- 本品は、本アッセイの訓練を受けた方の使用に限定されます。
- 本品は、単独での診断目的、着床前もしくは出生前の検査やスクリーニング、または集団スクリーニングでの使用を意図したものではなく、後天性または体細胞の aberration の検出またはスクリーニングでの使用を意図したものではありません。
- アッセイ結果は、必要に応じて、別の方法による確認、親の評価、臨床遺伝学的診察、およびカウンセリングを含む、専門家による標準的な診断に沿って、他の臨床所見および診断所見と組み合わせて使用することを意図しています。マイクロアレイの結果は qPCR、FISH、または他の方法を用いて確認することが推奨されます。
- 本品の構成試薬のうち Human Reference DNA Female、Human Reference DNA Male および Cot-1 Human DNA は、ヒト血液由来成分を含みます。これらの試薬は HBV、HCV、HIV (HIV-1 および HIV-2) の陰性が確認されていますが、感染性がないことを完全に保証する試験方法はないため、感染性のあるものとして取り扱ってください。

形状・構造等(キットの構成)

構成試薬	主成分	容量
GenetiSure Dx DNA Labeling Kit		
・Human Reference DNA Female	ヒト DNA (女性)	125 μ L \times 1 本
・Human Reference DNA Male	ヒト DNA (男性)	125 μ L \times 1 本
・10X Restriction Enzyme Buffer	トリス緩衝液	142 μ L \times 1 本
・BSA	ウシ血清アルブミン	15 μ L \times 1 本
・Alu I Restriction Enzyme	Alu I 制限酵素、グリセロール	28 μ L \times 1 本
・Rsa I Restriction Enzyme	Rsa I 制限酵素、グリセロール	28 μ L \times 1 本
・Nuclease Free Water	Nuclease フリー精製水	1500 μ L \times 1 本
・Exo (-) Klenow	Exo (-) Klenow 酵素、グリセロール	55 μ L \times 1 本
・5X gDNA Reaction Buffer	トリス緩衝液	550 μ L \times 1 本

・Cyanine 5-dUTP	Cyanine5 標識デオキシウリジン三リン酸	78 µL × 1 本
・Cyanine 3-dUTP	Cyanine3 標識デオキシウリジン三リン酸	78 µL × 1 本
・10X dNTP Mix	デオキシアデノシン三リン酸 (dATP) デオキシチミジン三リン酸 (dTTP) デオキシグアノシン三リン酸 (dGTP) デオキシシチジン三リン酸 (dCTP)	265 µL × 1 本
・Random Primers	オリゴヌクレオチド	265 µL × 1 本
(付属品) ・Purification columns ・2mL collection tubes	(精製カラム) (コレクションチューブ)	50 カラム × 1 袋 100 本 × 1 袋
GenetiSure Dx Hybridization Kit		
・2X CGH Hybridization Buffer	塩化リチウム	1400 µL × 5 本
・10X Oligo aCGH Blocking Agent	オリゴヌクレオチド	1 本 (凍結乾燥品)
GenetiSure Dx Wash Buffer 1		
・GenetiSure Dx Wash Buffer 1	EDTA、塩化ナトリウム	4 L × 2 箱
GenetiSure Dx Wash Buffer 2		
・GenetiSure Dx Wash Buffer 2	EDTA、塩化ナトリウム	4 L × 1 箱
GenetiSure Dx Cot-1 Human DNA		
・GenetiSure Dx Cot-1 Human DNA	ヒト DNA	625 µL × 1 本
GenetiSure Dx Postnatal Assay		
・GenetiSure Dx Postnatal Array	一本鎖 DNA	4 x 180K × 3 スライド × 2 箱
(付属品) ・GenetiSure Dx Gasket	(ガasketスライド)	4 x Array Slide 用 × 6 パック

使用目的

全血から抽出したゲノム DNA のコピー数変化 (CNV) 及びコピー数変化のないヘテロ接合性の喪失 (cnLOH) の検出 (先天性疾患疑いのある患者の染色体変異関連疾患の診断補助に用いる)

測定原理

原理

本品は、comparative genomic hybridization (CGH) の原理をマイクロアレイに応用したアレイ CGH (aCGH) により、gDNA の CNV および cnLOH を検出するキットです。主な反応ステップは次のとおり。

- 1 全血検体から抽出した gDNA 及び参照する gDNA を制限酵素である Alu I Restriction Enzyme 及び Rsa I Restriction Enzyme で断片化する。
- 2 断片化された gDNA にランダムプライマーを結合させた後、患者サンプル及び参照サンプルに対し、それぞれ異なる蛍光色素でラベル化を行う。ラベル化は、プライマーを起点に Cyanine 3-dUTP 又は Cyanine 5-dUTP、dATP、dTTP、dGTP、dCTP 及び Exo (-) Klenow により伸長反応が行われる際に Cyanine 3 又は Cyanine 5 が増幅される DNA に取り込まれることにより行われる。
- 3 GenetiSure Dx Postnatal Array のマイクロアレイスライド上には、DNA プローブ及び SNP プローブが搭載されている。ラベル化された患者サンプル及び参照サンプルを同時にこのアレイ上で競合的にハイブリダイズさせる。その後、両者の蛍光強度を専用機器で画像データとして読み取り、更に数値データに変換することにより gDNA の相対的存在量を解析する。この解析により、gDNA の CNV 及び cnLOH を検出する。

特徴

GenetiSure Dx Postnatal Assay 「アジレント」で使用する CGH+SNP マイクロアレイでは、CNV の検出に約 107,000 個のプローブが使用されます。これらのプローブの半分は、ISCA (the International Standards for Cytogenomic Arrays) により臨床的に重要であると指定されたターゲット領域に選択的にハイブリダイズするように選択されています。残り半分は、全ゲノムに渡り等間隔に位置する配列にハイブリダイズするように選択され、一般にバックボーンプローブと呼ばれます。これらのプローブはアレイ上に分散し、ゲノムの 94 % のターゲットには、400 kb あたり 5 個以上のコピー数解析用のプローブを配置し、分離能の中央値は約 150 kb となります。臨床的な意義を持つことが確認された領域は、プローブ密度を上げて標的にし、分解能の中央値は約 25 kb です。また、本品のマイクロアレイ上にその他に搭載された 59,647 個の SNP プローブから得られるアレルのデータにもとづいて、患者サンプル中の cnLOH も検出されます。cnLOH の領域は、ソフトウェアにより、ヘテロ接合体コールが統計的に有意に欠乏しているゲノム領域を特定することにより同定されます。まず、ソフトウェアのアルゴリズムでは、全コピー数とアレル固有のコピー数をもとに、ホモ接合体遺伝子型またはヘテロ接合体遺伝子型を持つ各 SNP 部位が同定されます。次に、二項確率分布を使用して、ホモ接合体 SNP の割合が異常に高い領域が報告されます。尚、GenetiSure Dx Postnatal Assay 「アジレント」には、本アッセイによる検査結果に基づく臨床的診断をサポートするソフトウェアは含まれていません。

操作上の注意

測定試料の性質、採取法

検体は必ず、全血から抽出した gDNA を使用してください。血液は、抗凝固剤として EDTA を用いて、試験管に採取されなければなりません。他の種類の検体についてのバリデーションは実施されていません。

このテストで使用する gDNA は、QIAGEN 社の QIAamp DNA Blood Mini Kit (型番 51104) を使用して患者の血液サンプルから単離します。QIAamp DNA Blood Mini kit は、抽出を行うために 200 μ L の血液を必要とし、gDNA は 100 μ L のバッファに溶出する必要があります。

患者サンプルのラベル化反応への gDNA 投入量は、参照サンプルのラベル化反応への投入量と同じである必要があります。DNA の不正確な定量は、ラベル化反応への gDNA 投入量が患者サンプルと参照サンプルで異なる原因となり、これによりアッセイのノイズ (DerivativeLR_Spread QC メトリックで測定) が増大する可能性があります。

アッセイは、0.5 μ g の gDNA 使用時についてバリデーションが実施されています。

吸光度を用いて DNA を定量しないでください。

検体の保管: 血液検体は、2~8 $^{\circ}$ C で最長 7 日間保管できます。

検体を輸送する場合、全血は、採取したものと同じチューブ内でウェットアイスに載せて輸送する必要があります。全血を輸送する際は、病原体の輸送に関する国および自治体の規制に従う必要があります。

妨害物質

本品は、患者全血から分離した gDNA を使用します。溶血、ビリルビン血症、または高脂血症に至る病態にある患者から検体が得られることがあります。

これらの病態による検査結果への影響を検討するために、gDNA 分離前にヘモグロビン、抱合型ビリルビン、非抱合型ビリルビン、およびトリグリセリド(トリオレイン)を全血に添加したときの影響を検討しました。添加対象の全血中の各干渉物質の濃度を下表に示します。

干渉物質	最終濃度
ヘモグロビン	添加前の条件での濃度の約 2 倍
抱合型ビリルビン	20 mg/dL
非抱合型ビリルビン	20 mg/dL
トリグリセリド(トリオレイン)	> 3000 mg/dL

表現型が正常である男性 12 名および表現型が正常である女性 12 名から採取した血液をこの試験で使用しました。

所定の干渉物質を含む各サンプルについての aberration の一覧が報告されており、同一サンプルを用いたときの「非添加の対照 (non-adulterated control)」の一覧と比較されました。小さい CNV (プローブ数が 5~20) の場合、検討した干渉物質のすべてについて検出率は 90 % を上回っていました。大きい CNV (プローブ数が > 20) の場合、検討した干渉物質のすべてについて検出率は 98 % を上回っていました。

以上の結果から、患者全血サンプルにおいて、ヘモグロビン、トリグリセリド (triolein)、またはビリルビン (抱合型および非抱合型) が上記の範囲内で過剰に存在しても、検査結果は影響されないことが示されています。

その他の注意事項

Cyanine 5 は、オゾンにより特に退色しやすいことが判明しています。マイクロアレイスライドの洗浄に使用するラボ区域のオゾン濃度が 5 ppb を超えていないことを確認してください。

ハイブリダイゼーション後にマイクロアレイを洗浄する際は、必ず各洗浄グループ (洗浄グループあたり最大 5 枚のスライド) には、新しい GenetiSure Dx Wash Buffer 1 および GenetiSure Dx Wash Buffer 2 を使用してください。

マイクロアレイ処理手順では、マイクロアレイスライドには、必ず 4 サンプルセットし、アッセイしてください。

洗浄手順では、指定された GenetiSure Dx アッセイ専用のガラス容器を必ず使用し、洗浄機器は、使用前および次の洗浄グループに移る前に高品質の超純水で十分に洗い流してください。

本電子添文で指定された反応時間および反応温度を順守してください。指定された以外の条件で操作を行った場合、試験結果の信頼性を保証できません。

本品は、SureScan Dx Scanner 「アジレント」 および CytoDx ソフトウェアを使用して測定・解析を行う専用試薬です。

用法・用量 (操作方法)

必要な器具・器材・試料等

別途用意する必要のあるその他の試薬および器具

試薬または器具	形態
1 x TE (pH 8.0)、分子生物学グレード (1 mM EDTA \cdot Na ₂ を含む 10 mM Tris-HCl)	試薬
エタノール、分子生物学グレード、200 テスト	試薬
QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN 社型番 51104)	試薬
dsDNA ベースの蛍光定量試薬	試薬
Nuclease Free Water (DEPC 非処理)	試薬
超純水 (比抵抗: 25 $^{\circ}$ C で 18.2 M Ω \cdot cm)	試薬/器具
DNase フリーのチューブストリップ、200 μ L、8 ストリップ または DNase フリーの 96 ウェルプレート、200 μ L、セミスカート または DNase フリーの PCR チューブ、200 μ L および DNase フリーのドーム型チューブキャップストリップ、8 ストリップ	器具
GenetiSure Dx Wash Buffer 2 予熱用使い捨てプラスチックボトル	器具
ヌクレアーゼフリーの 1.5 mL 遠心チューブ (98 $^{\circ}$ C の耐熱性)	器具
サーマルサイクラー用コンプレッションマット (必要な場合)	器具
200 μ L チューブまたはプレート用冷却ラック	器具
パウダーフリーグローブ	器具
滅菌済み、ヌクレアーゼフリーのエアロゾルバリアピペットチップ	器具

別途用意する必要のあるアジレントの装置および機器

装置または機器	形態
SureScan Dx Scanner「アジレント」(アジレント型番 G5761AA)	装置
ハイブリダイゼーションチャンバキット、ステンレス製	機器
マイクロアレイハイブリダイゼーションオープン	機器
ハイブリダイゼーションオープン回転ラック	機器
サーマルサイクラー	装置

注:仕様については、取扱説明書を参照してください。

別途用意する必要のあるその他の装置および機器

機器	形態
冷凍庫、-20 °C に設定	機器
冷蔵庫、4 °Cに設定	機器
1.5 L ガラス皿、パイレックスまたはそれと同等のもの	機器
容量 250 mL のガラススライド洗浄ガラス容器、スライドラック付き (3 個)	機器
ヒートブロック(オプション)	機器
清浄なピンセット	機器
アイスバケットまたは冷却ラック	機器
マグネチックスターラーバー、7.9 × 38.1 mm(2 個)	機器
マグネチックスターラープレート	機器
加熱機能付きマグネチックスターラープレート	機器
遠心機	機器
P10、P20、P200、および P1000 マイクロピペット	機器
マルチチャンネルピペット(10 μL、20 μL、および 200 μL)(オプション)	機器
恒温槽またはインキュベータ、37 °C に設定	機器
DNase フリーの使い捨て容器、50 mL(オプション)	機器
タイマー	機器
蛍光光度計	装置
UV-VIS 分光光度計	装置
スライド保管用減圧デシケータまたは N ₂ パージボックス	機器
ボルテックスミキサー	機器
真空濃縮遠心機	機器
ミニプレートスピナー遠心機	機器
96 ウェルプレートラック(必要な場合)	機器

別途用意する必要のあるソフトウェア

装置または機器	提供元
アジレント Microarray Scan Control プログラム、GenetiSure_Dx_Postnatal scan protocol を含む	SureScan Dx Scanner「アジレント」に付属 (GenetiSure_Dx_Postnatal scan protocol はダウンロード可能。 詳細については、取扱説明書を参照)
CytoDx ソフトウェア	https://genetisuredx.agilent.com/user-portal/cytodx-download から 無料でダウンロード可能
Adobe Reader またはその他の PDF 閲覧ソフトウェア	Adobe 他
Microsoft Excel またはその他のスプレッドシート/ テキスト編集ソフトウェア	Microsoft 他

試薬の調製方法

1 制限酵素処理のマスターミックスの調製

Nuclease Free Water: 10X Restriction Enzyme Buffer:BSA:Alu I Restriction Enzyme:Rsa I Restriction Enzyme を、2.2:2.6:0.2:0.5:0.5 の割合で混合します。詳細は、サンプルの断片化手順欄を参照してください。

2 ラベル化のマスターミックスの調製

5X gDNA Reaction Buffer: 10X dNTP Mix:Cyanine 3-dUTP または Cyanine 5-dUTP:Exo (-) Klenow を、10.0:5.0:3.0:1.0 の割合で混合します。詳細は、サンプルのラベル化手順欄を参照してください。

3 ハイブリダイゼーションのマスターミックスの調製

凍結乾燥品の 10X Oligo aCGH Blocking Agent は、1.35 mL の Nuclease Free Water を加え室内温度で 60 分間放置後、ボルテックスミキサーで混合して完全に再溶解します。この試液は、-25~-15 °C で最長 120 日間保管することができます。

GenetiSure Dx Cot-1 Human DNA: 10X Oligo aCGH Blocking Agent:2X CGH Hybridization Buffer を、5:11:55 の割合で混合します。詳細は、マイクロアレイの処理手順欄を参照してください。

4 その他の試薬

その他の試薬はそのまま使用してください。

操作方法

DNA の単離、定量および定性分析の手順

マイクロアレイベースの GenetiSure Dx Postnatal Assay「アジレント」では、患者と同じ性別の参照サンプルに対する患者サンプル中の gDNA CNV および cnLOH を評価するために、「2 色」プロセスを使用します。

gDNA の抽出と定量

gDNA の抽出:gDNA は、QIAGEN 社の QIAamp DNA Blood Mini Kit(型番 51104)を使用して、キットに付属の手順に従って 200 μ L の患者の全血から単離する必要があります。100 μ L の溶出量を使用します。ラベル化反応には、合計 0.5 μ g の gDNA が必要です。

gDNA の定量:gDNA の濃度は、二本鎖 DNA ベースの蛍光定量法を使用して確認する必要があります。gDNA 濃度の確認に吸光度ベースの測定法(Nanodrop など)を使用しないでください。

*注:不正確な定量は、精製したラベル化済みの gDNA が収量や色素取り込み率を計測する工程内の QC 測定で、予測される範囲を満たさない可能性があります。二本鎖 DNA ベースの蛍光定量法の製造業者が提供する手順に従い、蛍光光度計の校正状態が最新であることを確認してください。

gDNA 濃度を測定する前に、ピペットで吸引と吐出を繰り返して、溶液中の gDNA を完全に均質にします。ピペットで吸引と吐出を行っても gDNA サンプルが均質にならない場合は、再懸濁しやすくするために 37 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C で 25~30 分間保温します。サンプルの断片化に必要な容量を確保するには、gDNA サンプルの測定濃度が 25~250 ng/ μ L である必要があります。ラベル化反応には、合計 0.5 μ g の gDNA が必要です。

●gDNA サンプルの濃度が 25 ng/ μ L に満たない場合、真空遠心濃縮装置を使用して乾燥させ、サンプルを濃縮します。その後、gDNA を必要容量の TE (pH 8.0) に溶解して、25~250 ng/ μ L の濃度にしします。溶解後、再度 gDNA を定量し、濃度が目的範囲内にあることを確認します。

●gDNA サンプルの濃度が 250 ng/ μ L より高い場合、濃度が 25~250 ng/ μ L になるようにサンプルを TE (pH 8.0) で希釈します。その後、再度 gDNA を定量し、濃度が 25~250 ng/ μ L の目的範囲内にあることを確認します。

サンプルの保管:抽出した gDNA は、2~8 $^{\circ}$ C で最長 1 年間、-25~-15 $^{\circ}$ C で 1 年以上保管できます。

注:Human Reference DNA の濃度を正確に測定することも重要です。プロトコルを実施するたびに、二本鎖 DNA ベースの蛍光定量法を使用して Human Reference DNA の濃度を確認してください。手順については、「手順 1. サンプルの前処理」を参照してください。

サンプルの断片化手順

参照サンプルは、患者と同じ性別のものを使用する必要があります。患者の性別が不明な場合は、Male Human Reference DNA を使用してください。

必ず、GenetiSure Dx DNA Labeling Kit(型番 K1201-64100)に含まれている、指定されたアジレントの Reference DNA サンプルを使用してください。高品質のデータを得るには、患者/参照サンプルのペアに対してまったく同じ処理を実施することが不可欠です。

手順 1. サンプルの前処理

サンプルペア(1 つの患者サンプルと 1 つの参照サンプルで構成)は、特定のマイクロアレイスライド上の 4 つのマイクロアレイすべてがハイブリダイズされるように、4 ペア 1 セットで処理する必要があります。処理するサンプルペアが 4 ペアより少ないか 4 の倍数でない場合、4 の倍数になるように 1 つ以上のコントロールペアを処理します。コントロールペアは、アジレントの Reference DNA Male サンプルおよびアジレントの Reference DNA Female サンプル各 1 個で構成します。また、処理するサンプルペアの数に関わらず、断片化手順およびラベル化手順に 1 つ以上のコントロールペアを含めると役立つ場合があります。例えば、ラベル化後にいずれかのサンプルペアが必要な収量または色素取り込み率を満たしていない場合、失敗したサンプルペアをラベル化済みのコントロールペアに置き換えて、引き続き残りのサンプルペアを処理することができます。

1 患者の性別にもとづいて、同じ性別の適切な参照サンプルを選択します。患者サンプルが女性の場合は Human Reference DNA Female を使用し、男性の場合は Human Reference DNA Male を使用します。

2 必要な gDNA 量および液量があることを確認します。必要量については、次の表を参照してください。

マイクロアレイあたり必要な gDNA の量および容量

gDNA タイプ	必要な gDNA 量 (μ g)	gDNA の液量 (μ L)
患者サンプル	0.5	20
参照サンプル	0.5	20

参照サンプルおよび患者サンプル中の gDNA の濃度は、二本鎖 DNA ベースの蛍光定量法により確認してください。詳細については、「gDNA の定量」を参照してください。

手順 2. GenetiSure Dx DNA Labeling Kit による制限酵素処理

注:各チューブまたはウェルに入っているサンプルを追跡できるように、チューブまたはウェルに耐水ペンでマークを付けてください。

1 10X Restriction Enzyme Buffer および BSA[GenetiSure Dx DNA Labeling Kit(型番 K1201-64100)に付属]を融解します。ポルテックスミキサーで短時間混合し、遠心にかけます。すべての試薬は、使用時に氷上または冷却ラック内で保持し、速やかに -25~-15 $^{\circ}$ C に戻してください。

2 それぞれの患者サンプルと参照サンプルについて、0.5 μ g のサンプル gDNA を、ラベルを付けたヌクレアーゼフリーのチューブ(200 μ L ストリップチューブまたは個別の 200 μ L PCR チューブ)または 96 ウェルプレートのウェルに入れます。Nuclease Free Water を加えて最終容量を 20.0 μ L にします。反応チューブを氷上または冷却ラック内に置きます。

3 必要な反応数にもとづいて次の表に示す試薬を表に記載された順序で混合し、制限酵素処理のマスターミックスを調製します。混合物は氷上で保持してください。

制限酵素処理のマスターミックスの調製

品目	反応あたりの容量 (μ L)	16 反応分 (μ L) (余剰分を含む)	32 反応分 (μ L) (余剰分を含む)	48 反応分 (μ L) (余剰分を含む)
Nuclease Free Water	2.2	37.4	74.8	110
10X Restriction Enzyme Buffer	2.6	44.2	88.4	130
BSA	0.2	3.4	6.8	10
Alu I Restriction Enzyme	0.5	8.5	17	25
Rsa I Restriction Enzyme	0.5	8.5	17	25
制限酵素処理のマスターミックスの最終容量	6.0	102	204	300

4 gDNA サンプルの入った各チューブまたはウェルに 6.0 μ L の制限酵素処理のマスターミックスを加え、合計容量を 26 μ L にします。

- 5 サンプル容器に適した手順に従ってサンプルを混合します。
ストリップチューブおよび 96 ウェルプレートの場合：
 - a) ドーム型キャップストリップ(8x ストリップ)でストリップチューブまたはプレートのウェルに蓋をします。
 - b) ボルテックスミキサーで、ストリップチューブまたはプレートを5 秒以上混合します。
 - c) プレートまたはストリップチューブを 10 秒間、またはキャップからすべての液体が落ちるまで遠心にかけます。サンプルを氷上または冷却ラックに戻します。
 個別の 200 μ L PCR チューブの場合：
 - a) チューブを閉め、ボルテックスミキサーで 5 秒以上混合します。
 - b) チューブを 10 秒以上遠心にかけます。サンプルを氷上または冷却ラックに戻します。
- 6 次のプログラムを実行するようにサーマルサイクラーを設定します。
37 °C で 2 時間
65 °C で 20 分間
4 °C で保持
- 7 プレートまたはチューブをサーマルサイクラーに移し、プログラムを開始します。反応液量の入力を求められたら、26 μ L と入力します。
- 8 サーマルサイクラープログラムが終了したら、サンプルをサーマルサイクラーから取り出し、10 秒以上遠心にかけて壁面および蓋に付着したサンプルを落とします。サンプルを氷上または冷却ラック内に置きます。この時点で、制限酵素処理済みの gDNA を -25~-15 °C で最長 1 か月間保管するか、次の「サンプルのラベル化手順」に進むことができます。

サンプルのラベル化手順

GenetiSure Dx DNA Labeling Kit(型番 K1201-64100)には、GenetiSure Dx Postnatal Assay に含まれる 4x180K マイクロアレイスライド 6 枚の反応に十分な量の 2 色ラベル化反応試薬、精製カラム、および Human Reference DNA が含まれています。

このラベル化キットは、Random Primers および Exo (-) Klenow 断片を使用して、蛍光ラベル化されたヌクレオチドで gDNA サンプルを特異的にラベル化します。患者サンプルは cyanine 5 でラベル化し、同じ性別の参照サンプルは cyanine 3 でラベル化します。

手順 1. gDNA の蛍光ラベル化

注: Cyanine 3-dUTP および Cyanine 5-dUTP は感光性であり、凍結融解の繰り返しにより退色する可能性があります。ラベル化手順を通して、光への暴露を最小限に抑えてください。

- 1 断片化した gDNA サンプルを 10 秒以上遠心にかけ、壁面および蓋に付着したサンプルを落とします。
 - 2 gDNA サンプルの入った各反応チューブまたはウェルに 5 μ L の Random Primers[GenetiSure Dx DNA Labeling Kit(型番 K1201-64100)に付属]を加え、合計容量を 31 μ L にします。
 - 3 サンプル容器に適した手順に従ってサンプルを混合します。
ストリップチューブおよび 96 ウェルプレートの場合：
 - a) ドーム型キャップストリップ(8x ストリップ)でストリップチューブまたはプレートのウェルに蓋をします。
 - b) ボルテックスミキサーで、ストリップチューブまたはプレートを5 秒以上混合します。
 - c) プレートまたはストリップチューブを 10 秒間、またはキャップからすべての液体が落ちるまで遠心にかけます。サンプルを氷上または冷却ラックに戻します。
 個別の 200 μ L PCR チューブの場合：
 - a) チューブを閉め、ボルテックスミキサーで 5 秒以上混合します。
 - b) チューブを 10 秒以上遠心にかけます。サンプルを氷上または冷却ラックに戻します。
 - 4 次のプログラムを実行するようにサーマルサイクラーを設定します。
98 °C で 3 分間
4 °C で 5 分間
4 °C で保持
 - 5 プレートまたはチューブをサーマルサイクラーに移し、プログラムを開始します。反応液量の入力を求められたら、31 μ L と入力します。
 - 6 サーマルサイクラープログラムが終了したら、サンプルをサーマルサイクラーから取り出し、10 秒以上遠心にかけて壁面および蓋に付着したサンプルを落とします。サンプルを氷上または冷却ラック内に置きます。
- 注: 光への長時間の暴露を防ぐため、Cyanine 3-dUTP および Cyanine 5-dUTP の入ったチューブおよびラベル化のマスターミックスの入ったチューブをホイルまたは暗色の蓋で覆ってください。

7 ラベル化のマスターミックスを調製し、サンプルに加えます。

- a) 次の表に示す試薬を表の順序で混合して、2 種類のラベル化のマスターミックスを調製します。患者サンプル用のラベル化のマスターミックスには Cyanine 5-dUTP を使用し、参照サンプル用のラベル化のマスターミックスには Cyanine 3-dUTP を使用します。調製する間、ラベル化のマスターミックスを氷上または冷却ラック内で保持してください。
- b) ラベル化のマスターミックスをボルテックスで十分に混合し、10 秒以上遠心にかけて壁面および蓋に付着したサンプルを落とします。
- c) 氷上または冷却ラック内で、gDNA サンプルの入った各チューブまたはウェルに 19 μ L の適切なラベル化のマスターミックス(cyanine 3 または cyanine 5)を加え、合計容量を 50 μ L にします。

ラベル化のマスターミックスの調製

品目	反応あたりの容量 (μ L)	8 反応分(μ L) (余剰分を含む)	16 反応分(μ L) (余剰分を含む)	24 反応分(μ L) (余剰分を含む)
5X gDNA Reaction Buffer	10.0	85	170	250
10X dNTP Mix	5.0	42.2	85	125
Cyanine 3-dUTP または Cyanine 5-dUTP	3.0	25.5	51	75
Exo (-) Klenow	1.0	8.5	17	25
ラベル化のマスターミックスの最終容量	19.0	161.5	323	475

- 8 サンプル容器に適した手順に従ってサンプルを混合します。
ストリップチューブおよび 96 ウェルプレートの場合：
 - a) ドーム型キャップストリップ(8x ストリップ)でストリップチューブまたはプレートのウェルに蓋をします。
 - b) ボルテックスミキサーで、ストリップチューブまたはプレートを5 秒以上混合します。
 - c) プレートまたはストリップチューブを 10 秒間、またはキャップからすべての液体が落ちるまで遠心にかけます。サンプルを氷上または冷却ラックに戻します。

個別の 200 μ L PCR チューブの場合:

- チューブを開め、ボルテックスミキサーで 5 秒以上混合します。
- チューブを 10 秒以上遠心にかけます。サンプルを氷上または冷却ラックに戻します。

9 次のプログラムを実行するようにサーマルサイクラーを設定します。

- 37 $^{\circ}$ C で 2 時間
- 65 $^{\circ}$ C で 10 分間
- 4 $^{\circ}$ C で保持

10 プレートまたはチューブをサーマルサイクラーに移し、プログラムを開始します。反応液量の入力を求められた場合は、50 μ L と入力します。

11 サーマルサイクラープログラムが終了したら、サンプルをサーマルサイクラーから取り出し、10 秒以上遠心にかけて壁面および蓋に付着したサンプルを落とします。サンプルを氷上または冷却ラック内に置きます。

この時点で、ラベル化済みの gDNA を -25~-15 $^{\circ}$ C で最長 1 か月間保管するか、次の「手順 2. ラベル化済みの gDNA の精製」に進むことができます。

手順 2. ラベル化済みの gDNA の精製

注: この精製手順を通して、cyanine 3 および cyanine 5 でラベル化した gDNA サンプルが光に長時間暴露されないように保護してください。

- ラベル化済みの gDNA サンプルを 10 秒以上遠心にかけ、壁面および蓋に付着したサンプルを落とします。
 - 精製する各 gDNA サンプルについて、反応精製カラムを 2 mL コレクションチューブに入れ、スピнкаラムに適宜ラベルを付けます。
 - 各スピнкаラムに 330 μ L の 1 \times TE (pH 8.0) を加えます。
 - 各反応チューブまたはウェルに 100 μ L の 1 \times TE (pH 8.0) を加えます。ピペットで内容物の吸引と吐出を 5 回繰り返して混合します。
 - 各サンプルを、適切にラベルを付けたスピнкаラムに移します。ピペットで内容物の吸引と吐出を 10 回繰り返して混合します。
 - チューブの蓋を閉め、サンプルを室温で 10 分間、14,000 \times g で遠心にかけます。カラムを通り抜けた液を廃棄し、カラムを同じコレクションチューブに戻します。
- 注: カラムを通り抜けた液はすべて完全に廃棄してください。必要に応じて、コレクションチューブの縁を清潔なラボ用ワイプ (KimWipes ワイパーなど) で拭いて余分な液体を取り除きます。適切な方法を使用して、カラムにロードされた gDNA サンプルの汚染を防いでください。
- 各カラムに 480 μ L の 1 \times TE (pH 8.0) を加えます。室温で 10 分間、14,000 \times g で遠心にかけます。
 - 次の手順に従い、カラムを逆さにして、適切にラベルを付けた新しい 2 mL コレクションチューブに入れます。
 - この手順を通して、古いコレクションチューブは直立させたままにします。片手に新しいコレクションチューブを、もう一方の手に古いコレクションチューブを持ち、新しいコレクションチューブを逆さにしてピンセットの要領でカラムの縁をつかみます。古いコレクションチューブからカラムを引き抜きます。
 - カラムをつかんだまま、新しいコレクションチューブを逆さの状態から直立位置に反転させます。次に、つかんでいたカラムを放し、逆さの向きで新しいコレクションチューブ内にスライドさせます。カラムを通り抜けた液が入っている古いコレクションチューブを破棄します。
 - 逆さにしたカラムが入っているコレクションチューブを室温で 1 分間、約 1,000 \times g で遠心にかけ、精製されたサンプルを収集します。
- この時点で、ラベル化済みの gDNA サンプルを -25~-15 $^{\circ}$ C で一晩保管するか、次の「手順 3. 容量の確認/調整」に進むことができます。

手順 3. 容量の確認/調整

次のいずれかの方法で、各精製サンプルの容量を目的範囲内 (18~28 μ L) にします。

- 次の表の手順に従ってすべてのサンプルを濃縮してから、「手順 4. 収量および色素取り込み率の確認」に進みます。

または

- 各精製サンプルの容量を測定して記録し、次の操作を行います。
 - サンプルの容量が 18~28 μ L の場合、サンプルを濃縮せずに、そのまま「手順 4. 収量および色素取り込み率の確認」に進みます。
 - サンプルの容量が 28 μ L を超えている場合、次の表の手順に従ってサンプルを濃縮してから、「手順 4. 収量および色素取り込み率の確認」に進みます。
 - サンプルの容量が 18 μ L 未満の場合、1 \times TE (pH 8.0) を加えて容量を最大 21 μ L にしてから、「手順 4. 収量および色素取り込み率の確認」に進みます。

gDNA の濃縮手順

手順 1	gDNA サンプルを濃縮して乾燥させ、21 μ L の 1 \times TE (pH 8.0) 中に再懸濁します。gDNA を過度に乾燥させないでください。ペレットが再懸濁しにくくなります。
手順 2	ラベル化済みの gDNA サンプルの入っているチューブまたはプレートを氷上に 5 分間静置し、その後ピペットで溶液の吸引と吐出を 10 回繰り返してペレットを完全に再懸濁します。

手順 4. 収量および色素取り込み率の確認

注: この手順を通して、ラベル化済みの gDNA のサンプルを氷上で保持し、使用しないときは光が当たらないようにしてください。

UV-VIS 分光光度計を使用して、A260 nm、A550 nm (cyanine 3)、A650 nm (cyanine 5)、および色素の濃度 (pmol/ μ L) を測定し、収量と色素取り込み率を確認します。分光光度計のブランクには、1 \times TE (pH 8.0) を使用します。

1 1.5 μ L のラベル化済みの精製 gDNA を使用して定量します。260 nm (DNA)、550 nm (cyanine 3)、および 650 nm (cyanine 5) で吸光度を測定します。

2 ラベル化済みの gDNA の色素取り込み率を計算します。

$$\text{Specific Activity} * = \frac{\text{pmol per } \mu\text{L of dye}}{\mu\text{g per } \mu\text{L of genomic DNA}}$$

* gDNA 1 μ g あたりの色素の pmol 値

3 各サンプルの gDNA 濃度 (ng/ μ L) を記録します。次の式を使用して収量を計算します。

$$\text{Yield } (\mu\text{g}) = \frac{\text{DNA Concentration } \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}\right) \times \text{Sample Volume } (\mu\text{L})}{1000 \text{ ng}/\mu\text{g}}$$

高品質の gDNA から開始した場合にラベル化および精製後に予想されるラベル化済みの gDNA の収量と色素取り込み率については、次の表を参照してください。

*ラベル化および精製後に予想される収量と色素取り込み率

gDNA 投入量 (μ g)	収量 (μ g)	Cy3 でラベル化したサンプルの色素取り込み率 (pmole/ μ g)	Cy5 でラベル化したサンプルの色素取り込み率 (pmole/ μ g)
0.5	8~15	20~50	20~45

ラベル化後、cyanine 3 でラベル化したサンプルと cyanine 5 でラベル化したサンプルの収量は、ほぼ同じになります。同じでない場合は、取扱説明書の「Troubleshooting」セクションを参照してください。この時点で、ラベル化済みの gDNA を -25~-15 $^{\circ}$ C の暗所で最長 1 か月間保管するか、次の「マイクロアレイの処理手順」に進むことができます。または、最初に患者サンプルと参照サンプルを合わせてから（「手順 1. 患者サンプルと参照サンプルの混合」を参照）、-25~-15 $^{\circ}$ C の暗所で最長 1 か月間保管することもできます。

*注: 収量および色素取り込み率の計算は、マイクロアレイのハイブリダイゼーションに進むためには予測される値を満たしている必要がある工程内の QC 測定です。収量および色素取り込み率が、上の表にある予測される範囲を満たしていない場合は先に進めないでください。特定のマイクロアレイスライド上の 4 つのすべてのマイクロアレイは、収量および色素取り込み率の予測範囲内にあるラベル化済みの gDNA とハイブリダイズする必要があります。サンプルが収量または色素取り込み率の範囲を満たしていない場合は、再度ラベル化してから手順を進めてください。または、他のサンプルを至急処理する必要がある場合、失敗したサンプルを含むサンプルペアをラベル化済みのコントロールペアに置き換えてください (ラベル化済みのコントロールペアを利用できる場合)。

マイクロアレイの処理手順

製造業者の手順に従ってハイブリダイゼーションオープンを定期的に校正することを推奨します。

次の手順を実行するには、SureScan Dx Scanner「アジレント」のすべてのコンポーネントがセットアップされている必要があります。セットアップおよび準備の手順については、アジレントの『G5761A SureScan Dx Microarray Scanner System User Guide』を参照してください。

各マイクロアレイは、ガラススライドの、「Agilent」のラベル付きバーコードのある面に印刷されています。この面を「有効面」と言います。数字バーコードのある面は「非有効面」です。ハイブリダイゼーションサンプル混合物は、マイクロアレイスライドではなく、ガスケットスライドに直接アプライします。次に、マイクロアレイスライドの有効面をガスケットスライドに向けて載せ、ガスケットスライドとマイクロアレイスライドで「サンドイッチ状」にします。

マイクロアレイの損傷を防ぐため、必ず、ガラススライドは縁を持って慎重に取り扱ってください。パウダーフリーグローブを着用してください。絶対に、スライドの表面に触れないでください。ハイブリダイゼーション処理および洗浄手順中に、絶対にマイクロアレイの表面を乾燥させないでください。

手順 1 患者サンプルと参照サンプルの混合

1 各チューブまたはウェルにどのサンプルペアが入っているのかが分かるように、患者サンプルと参照サンプルを混合するチューブにラベルを付けます。

- 「手順 2. ラベル化済み gDNA のハイブリダイゼーションの準備」をサーマルサイクラーで実行する場合は、ストリップチューブまたは PCR チューブを使用します。ストリップチューブを使用する場合、最初にサーマルサイクラーでのインキュベーションの準備として、8x ストリップチューブを半分に切って 4x ストリップチューブにします。すべてのサンプルペアに十分な数の 4x ストリップチューブを用意してください。
- 「手順 2. ラベル化済み gDNA のハイブリダイゼーションの準備」をヒートブロックで実行する場合は、1.5 mL 遠心チューブを使用します。

2 適切にラベルを付けたチューブまたはウェル内で、cyanine 5 でラベル化したサンプルと cyanine 3 でラベル化したサンプルを使用して患者サンプルと参照サンプルと合わせます。両方のサンプルの全量を使用してください。混合物の合計容量は、約 39 μL （「手順 3. 容量の確認/調整」でサンプルを濃縮した場合）または 33 ~ 53 μL （「手順 3. 容量の確認/調整」でサンプルを濃縮しなかった場合）になります。合わせたサンプルは氷上または冷却ラック内で保持してください。

手順 2. ラベル化済み gDNA のハイブリダイゼーションの準備

特定のマイクロアレイスライド上のすべてのマイクロアレイをサンプルにハイブリダイズするために、ペアにした患者/参照サンプルを 4 サンプル 1 セットで処理します。4 サンプルに満たない状態でマイクロアレイスライドを処理しないでください。

1 10X Blocking Agent を調製します。

- a) 凍結乾燥された 10X Oligo aCGH Blocking Agent 入りのバイアル[GenetiSure Dx Hybridization Kit (型番 K1201-64200)に付属]に 1.35 mL の Nuclease Free Water を加えます。
- b) 使用または保管の前に、室温で 60 分間放置し、ボルテックスミキサーで混合してサンプルを再溶解します。10X Oligo aCGH Blocking Agent は、溶液に完全に溶解させてください。

注: 10X Oligo aCGH Blocking Agent を事前に調製し、-25~-15 $^{\circ}\text{C}$ で最長 120 日間保管することができます。室温で 3 時間以上放置しないでください。

2 必要数のチャンバベースとクランプ、ガスケットスライド、およびマイクロアレイスライドがあることを確認します。チャンバベース、チャンバカバー、およびクランプが清潔で、使用可能な状態にあることを確認します。

3 ハイブリダイゼーションオープンが 67 $^{\circ}\text{C}$ に設定されていることを確認します。

4 インキュベーションに 1.5 mL 遠心チューブを使用する場合、それぞれ 98 $^{\circ}\text{C}$ および 37 $^{\circ}\text{C}$ の 2 つのヒートブロックを準備します。

5 サンプルをハイブリダイズする準備をします。

- a) 次の表に示す成分を室温で混合して、ハイブリダイゼーションのマスターミックスを調製します。ハイブリダイゼーションのマスターミックスをボルテックスミキサーで短時間静かに混合してから、遠心に短時間かけます。

ハイブリダイゼーションのマスターミックスの調製

品目	反応あたりの容量 (μL)	8 反応分 (μL) (余剰分を含む)	16 反応分 (μL) (余剰分を含む)	24 反応分 (μL) (余剰分を含む)
GenetiSure Dx Cot-1 Human DNA	5	45	87.5	130
10X Oligo aCGH Blocking Agent	11	99	192.5	286
2X CGH Hybridization Buffer	55	495	962.5	1430
ハイブリダイゼーションのマスターミックスの最終容量	71	639	1242.5	1846

注: 2X CGH Hybridization Buffer は粘性のある溶液です。容量を正確に計量するために、このバッファはゆっくりピペティングしてください。

b) 合わせた各サンプルに 71 μL のハイブリダイゼーションのマスターミックスを加え、合計容量を約 110 μL にします。

c) ピペットで吸引と吐出を繰り返してサンプルを混合してから遠心に短時間かけ、サンプルをチューブまたはウェルの底に集めます。

d) サンプルを 95~98 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間、その後 37 $^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ で 30 分間以上（ただし 75 分間を超えないこと）反応させます。

- サーマルサイクラーを使用する場合、4x ストリップチューブまたは PCR チューブをサーマルサイクラーに移します。次のプログラムを実行するようにサーマルサイクラーを設定します。

98 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間

37 $^{\circ}\text{C}$ で 75 分間

反応液量の入力を求められたら、100 μL と入力します。

- ヒートブロックを使用する場合、1.5 mL 遠心チューブを 95~98 $^{\circ}\text{C}$ のヒートブロックに移して 3 分間反応させ、その後 37 $^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ のヒートブロックに移して 30 分間以上（ただし 75 分間を超えないこと）反応させます。

サンプルを反応させている間、30 分間で「手順 3. チャンバアセンブリの準備」(次の手順)を実行します。

手順 3. チャンバアセンブリの準備

この手順は、サンプルを 37 $^{\circ}\text{C}$ で反応させている間に実行します。

1 作業区域が平らで清潔であり、汚染物質がないことを確認します。

2 サンプルを処理するための、ラベルを付けたチャンバアセンブリとガスケットスライドを必要数用意します。必要に応じてチャンバを分解し、チャンバベースとチャンバクランプを並べておきます。

3 サンプルをロードするためのピペットとチップを用意します。

4 サンプルを確実に追跡するために、チャンバベースと、クランプの両側面に黒の耐水マーカーでマークを付けます。クランプの両側面にマークを付けておくと、ハイブリダイゼーションオープンに入れた状態でチャンバアセンブリのマークを確認できます。

手順 4. マイクロアレイのハイブリダイゼーション

この手順は、37 $^{\circ}\text{C}$ のインキュベーションから取り出して処理する最初の 4 サンプルのセットに対して実行します。その後、残りの 4 サンプルのセットに対してこの手順を繰り返します。どのサンプルも 37 $^{\circ}\text{C}$ での反応時間が 75 分間を超えないようにしてください。

注: 必ず、ラベル化済みの DNA を特定のマイクロアレイスライド上の 4 つのすべてのマイクロアレイにハイブリダイズしてください。そうしないと、アッセイが失敗し、CytoDx によりレポートが生成されません。

1 ガスケットスライドを包装から取り出します。

- a) ピンセットで透明のプラスチックカバーの隅を慎重に持ち上げ、保護フィルムをゆっくり剥がします。

注: 使用準備が整うまで、ガスケットスライドを保護ケースから取り出さないでください。ガスケットスライドの保護フィルムや保護ケースをスライスしたり切り開いたりしないでください。ガスケットスライドは、必ず縁を持って取り扱ってください。使用前に、ガスケットスライドに目に見える割れ目やガスケットを貫通する傷がないか、ハイブリダイゼーション領域に残屑がないか点検します。このような欠陥があると、安定した結果が得られません。これらの欠陥のあるガスケットスライドは使用しないでください。

b) 清浄なパウダーフリーグローブを着用した指で、ガスケットスライドを保護ケースから取り出します。スライドは、必ず縁を持って取り扱ってください。周囲の表面材料により汚染される可能性を防ぐため、次の手順に従って、ガスケットスライドを直ちにチャンバベースに挿入します。

2 ガスケットスライドをチャンバに挿入します。

- バーコードラベルを上に向けてガスケットスライドを持ちます。スライドのこの面がガスケット面です。
- チャンバベースの 4 つのチャンバベースガイドポストと長方形のバーコードガイドの位置を確認します。
- チャンバベースの長方形のバーコードガイド上にバーコードラベル部を載せ、4 つのチャンバベースガイドポストの間にガスケットスライドを合わせます。
- ガスケットスライドをチャンバベースにゆっくりセットします。
- ガスケットスライドがチャンバベースにぴったり収まっていることを確認します。必要に応じて、チャンバベースにぴったり収まるように位置を調整します。

3 サーマルサイクラーまたはヒートブロックから 4 サンプルのセットを取り出します。

- サンプルを 37 °C で 30 分以上反応させた後、4 つのサンプル(1 枚のマイクロアレイスライドに十分な数)を 37 °C のサーマルサイクラーまたはヒートブロックから取り出します。
 - 4x ストリップチューブまたは個別の PCR チューブを使用している場合、サーマルサイクラーを開け(プログラムを一時停止せずに)、1 つの 4x ストリップチューブまたは 4 つの PCR チューブを一度に取り出します。残りのストリップチューブに水滴が形成されないように、速やかにサーマルサイクラーの蓋を閉めます。取り出したチューブを 10 秒以上遠心にかけ、サンプルをチューブの底に集めます。すぐにサンプルのロード(次の手順 4)に進みます。
 - 1.5 mL 遠心チューブを使用している場合、4 つのサンプルをヒートブロックから一度に取り出します。サンプルを 10 秒以上遠心にかけ、サンプルをチューブの底に集めます。すぐにサンプルのロード(次の手順 4)に進みます。
- 注: サンプルは、マイクロアレイにロードするまで 37 °C に保つ必要があります(ただし 75 分間を超えないこと)。次の手順に進む前に、遠心にかけたサンプルを 5 分以上室温に放置しないでください。

4 サンプルをロードします。

- 100 µL の ハイブリダイゼーションサンプル混合物を「ドラッグディスペンス」法でガスケットスライドのウェルにゆっくり分注します。分注は、バーコードに一番近いウェルから開始します。「ドラッグディスペンス」法を使用することで、ウェルの表面全体に均等にサンプルを分散させ、サンプルがガスケットの縁からあふれるのを防ぐことができます。ウェルの上端に近い位置からピペットチップをスタートさせます。ピペットチップでガスケットまたはガラスに直接触れないでください。次に、ピペットチップをウェルの反対側まで移動させながらサンプルを分注し、サンプルをウェルのスペース全体に分散させます。混合物を分注するときは、大きな気泡を作らないようにしてください。あふれる原因になります。
- 新しいピペットチップを使用して、次のハイブリダイゼーションサンプル混合物 100 µL を、前述の「ドラッグディスペンス」法で次のガスケットウェルにロードします。残りのハイブリダイゼーションサンプル混合物について、この操作を繰り返します。必ず、各マイクロアレイスライド上の 4 つのすべてのガスケットウェルにロードしてください。

注: サンプルを正確に追跡するために、各ガスケットウェルにアプライしたサンプルをメモしてください。バーコードに一番近いガスケットウェルにロードしたサンプルは、マイクロアレイスライド上のマイクロアレイ 1 にハイブリダイズされます。サンプルの追跡を容易にするために、マイクロアレイ 1 から開始してマイクロアレイ 4 で終了するように、順番にガスケットウェルにサンプルをロードすることを推奨します。

5 マイクロアレイスライドを載せます。

- グローブを着用し、数字バーコードを上向き、アジレントのラベルを下向きにして、親指と人差し指でマイクロアレイスライドをはさんでスライド保管ボックスから取り出します。
- チャンバベースの 4 つのチャンバベースガイドポストと長方形のバーコードガイドを使用してマイクロアレイスライドの位置を合わせ、ガスケットスライドから高さ 3 mm (1/8 インチ)になるまでマイクロアレイスライドを下ろし、ガスケットスライドに対してマイクロアレイスライドが傾いていないことを確認します。ガスケットスライドとマイクロアレイスライドのバーコード側の端がチャンバベースの隅で揃っている必要があります。位置を合わせたら、下側のガスケットスライドにマイクロアレイスライドをゆっくり載せます。

注: ガスケットスライド上にマイクロアレイスライドを落とさないでください。ガスケットウェル間でサンプルが混合される可能性が高くなります。マイクロアレイスライドを載せたら、チャンバおよびサンドイッチ状のスライドを動かさないでください。ハイブリダイゼーション溶液が漏れる可能性があります。

6 チャンバを組み立てます。

- 「サンドイッチ状」のスライドが入っているチャンバベースに、正しい面を上に向けてチャンバカバーを載せます。
 - チャンバベースの丸みのある角からチャンバベースとカバーにクランプをはめ、ベースとカバーの中央でしっかりと止まるまでスライドさせます。ハイブリダイゼーション溶液がこぼれないようにするため、チャンバアセンブリは、ラボベンチ上で水平に保ってください。
 - つまみネジをきつく締めます。手締めによってスライドが損傷することはありません。つまみネジを完全に締めないと、ハイブリダイゼーション中にハイブリダイゼーション溶液が漏れる可能性があります。
- 注: つまみネジを工具で締めないでください。プライヤなどの工具を使用すると、部品が損傷する可能性があり、保証が無効になります。
- 組み立てた最終的なチャンバを垂直方向に時計回りに 2~3 回転させ、ガスケットを湿らせます。これにより、インキュベーション処理中にマイクロアレイの表面全体がハイブリダイゼーション溶液で覆われます。
 - 良好な気泡が形成されているか調べます。チャンバを垂直に保ち、遊離気泡やチャンバを回転しても動かない小気泡がないか点検します。このような気泡が見つかった場合は、チャンバを回転させ、大きな混合気泡で小さな遊離気泡や移動しない気泡を取り除きます。それでも小さな遊離気泡や移動しない気泡が消えない場合は、組み立てたチャンバを軽くたたきます。側面をたたきながらチャンバを回転させます。再度気泡を調べ、小さな遊離気泡や移動しない気泡がなくなるまでこの操作を繰り返します。

7 組み立てたチャンバをハイブリダイゼーションオープンにセットします。

- ハイブリダイゼーションオープンが 67 °C ± 2 °C になっていることを確認します。
- 組み立てたチャンバをオープンの回転ラックにセットします。セットするときは、ラックの中央(左から数えて 3 番目または 4 番目の位置)から開始します。
- ドアを閉め、回転速度を 20 rpm に設定します。
- この時点で、次の 4 サンプルのセットに対して「手順 4. マイクロアレイのハイブリダイゼーション」を繰り返し、すべてのサンプルを処理してから、ハイブリダイゼーションオープンにセットすることができます。
- すべてのサンプルを 67 °C ± 2 °C で 24 時間(± 30 分間)ハイブリダイズします。ハイブリダイゼーションは、67 °C ± 2 °C で 24 時間(± 30 分間)行う必要があります。行わない場合、データ品質が損なわれます。

8 GenetiSure Dx Wash Buffer 2 を予熱します(一晚)。最適な洗浄性能を得るには、GenetiSure Dx Wash Buffer 2 の温度を 37 °C ± 1 °C にする必要があります。組み立てたチャンバをハイブリダイゼーションオープンにセットした日と同じ日にパuffaの予熱を開始します。すべてのグループに十分な量の GenetiSure Dx Wash Buffer 2 を予熱します(グループあたり約 250 mL)。洗浄するマイクロアレイスライドは、グループあたり 5 枚以下にすることを推奨します。

- 必要量のパuffaを使い捨てプラスチックボトルに入れ、37 °C に設定したインキュベータまたは恒温槽で一晩加熱します。
- 37 °C に設定したインキュベータに、清浄な蓋付きのスライド洗浄ガラス容器、1.5 L ガラス皿、および 1~2 L の超純水を入れ、一晩加熱します。その後、次の「手順 5. 機器のクリーニング」に進みます。

手順 5. 機器のクリーニング

洗浄手順では、必ず指定された GenetiSure Dx アッセイ専用のガラス容器を使用してください。Wash Buffer 1 または Wash Buffer 2 で使用するガラス容器、マグネチックスターラーバー、およびスライドラックを決め、決められたパuffaでのみ使用してください。洗浄機器は、使用前および次の洗浄グループに移る前に高品質の超純水で十分に洗い流してください。

1 スライド洗浄ガラス容器、スライドラック、およびスターラーバーを大量の超純水で洗い流します。

2 洗浄ガラス容器に超純水をためてから空にする作業を 5 回以上繰り返します。

注: ガラス容器の洗浄に洗剤を使用しないでください。洗剤によっては、ガラス容器上に蛍光性の残渣が残ることがあります。

手順 6. マイクロアレイの洗浄

洗浄手順を開始する前に、SureScan Dx Scanner「アジレント」および関連するコンピュータ機器の電源を入れ、Microarray Scan Control ソフトウェアを起動してください。
注: Cyanine 5 は、オゾンにより特に退色しやすいことが判明しています。マイクロアレイスライドの洗浄に使用するラボ区域のオゾン濃度が 5 ppb を超えていないことを確認してください。

必ず、各洗浄グループ(洗浄グループあたり最大 5 枚のスライド)には、新しい GenetiSure Dx Wash Buffer 1 および GenetiSure Dx Wash Buffer 2 を使用してください。
1 スライド洗浄ガラス容器 1 に室温の GenetiSure Dx Wash Buffer 1 をガラス容器の3/4 以上まで入れます。
2 スライド洗浄ガラス容器 2 にスライドラックを入れます。マグネチックスターラーバーを加えます。スライド洗浄ガラス容器 2 に室温の GenetiSure Dx Wash Buffer 1 をスライドラックが覆われるまで入れます。このガラス容器をマグネチックスターラープレートに載せます。
3 予熱した 1.5 L ガラス皿を加熱機能付きのマグネチックスターラープレートに載せます。1.5 L ガラス皿にスライド洗浄ガラス容器 3 を入れます。1.5 L ガラス皿に、37 °C ±1 °C に予熱した超純水を入れます。スライド洗浄ガラス容器 3 の約 3/4 まで GenetiSure Dx Wash Buffer 2(37 °C ±1 °C に加熱)を入れます。マグネチックスターラーバーを加えます。加熱機能の電源を入れ、GenetiSure Dx Wash Buffer 2 の温度を 37 °C ±1 °C に保ちます。温度計を使用して温度を監視します。
注: ハイブリダイゼーションチャンバは高温になっています。ハイブリダイゼーションオープンからチャンバを取り出すとき、およびチャンバを分解するときには、注意してください。

4 ハイブリダイゼーションオープンからハイブリダイゼーションチャンバを 1 つ取り出し、他のチャンバの回転を再開します。ハイブリダイゼーションオープンが 67 °C ±2 °C に保たれていることを確認します。

5 取り出したハイブリダイゼーションチャンバを調べます。ハイブリダイゼーション中に形成されたすべての気泡が自由に回転することを確認します。また、ハイブリダイゼーション溶液の容量が減っていないことも確認します。静止気泡があったり、ハイブリダイゼーション溶液の容量が減っている場合は、そのサンプルをメモしておきます。CytoDx ソフトウェアで生成される QC レポートには、これらの問題による失敗を測定するためのマトリクスが含まれています。取扱説明書の「トラブルシューティング」セクションを参照してください。

6 ハイブリダイゼーションチャンバアセンブリからクランプを取り外します。
a) ハイブリダイゼーションチャンバアセンブリを平らな面に置き、つまみネジを反時計回りに回して緩めます。
b) クランプをスライドさせて外し、チャンバカバーを取り外します。

7 サンドイッチ状のマイクロアレイとガスケットを、一方の端を持ち上げて短い辺の中央をつかみ、チャンバベースから取り出します。マイクロアレイスライドの数字バーコードを上に向けたまま、サンドイッチ状のスライドを、GenetiSure Dx Wash Buffer 1 の入ったスライド洗浄ガラス容器 1 にすばやく移します。スライドを放さないように、サンドイッチ状のマイクロアレイとガスケットをスライド洗浄ガラス容器 1 に浸漬します。

8 サンドイッチ状のスライドを GenetiSure Dx Wash Buffer 1 に完全に浸した状態で、必ずバーコード側からサンドイッチ状のスライドを開きます。これを行うには、ピンセットの尖っていない一方の先端をスライドの間に差し込み、ピンセットをゆっくりひねってスライドを分離させます。ガスケットスライドをガラス容器の底に落とします。マイクロアレイスライドを取り出し、上方角部を親指と人差し指でつかみ、室温の GenetiSure Dx Wash Buffer 1 の入ったスライド洗浄ガラス容器 2 内のスライドラックにすばやく入れます。

注: 空気へのスライドの暴露を最小限に抑えてください。また、マイクロアレイスライドのバーコード部または縁にのみ触れてください。

9 グループ内の最大 4 枚の追加スライドに対して手順4~8を繰り返します。均等に洗浄するために、洗浄するマイクロアレイスライドはグループあたり 5 枚以下にしてください。

10 グループ内のすべてのスライドをスライド染色皿 2 内のスライドラックに入れたら、350 rpm で 5 分間(許容差 ±1 分間)攪拌します。マイクロアレイスライドに悪影響をおよぼすことなく完全に混合されるように設定を調整します。5 分間の間に、マグネチックスターラーを作動させてスライド洗浄ガラス容器 3 の準備をしておきます。

11 スライドラックを、37 °C(許容差 ±1 °C)の GenetiSure Dx Wash Buffer 2 の入ったスライド洗浄ガラス容器 3 にすばやく移します。マイクロアレイスライドを 1 分間以上(ただし 2 分間を超えないこと)洗浄します。マイクロアレイスライドに悪影響をおよぼすことなく完全に混合されるように設定を調整します。

12 スライド上の小滴を最小限にしながら、スライドラックをゆっくり取り出します。スライドラックを取り出すときは、5~10 秒かけてください。

13 次のグループに対して手順 1~12を繰返す前に、各洗浄グループについてすぐに「手順 7. マイクロアレイスライドのスキヤン」の準備に進みます。グループごとに、新しい GenetiSure Dx Wash Buffer 1 と 37 °C ±1 °C に予熱した新しい GenetiSure Dx Wash Buffer 2 を使用し、ガラス容器は再度使用する前に超純水で洗い流してください。

手順 7. マイクロアレイスライドのスキヤン

SureScan Dx Scanner「アジレント」の電子添文 および 取扱説明書に記載の方法に従って、マイクロアレイスライドをスキヤンします。スキヤンが完了すると、CytoDx ソフトウェアへのマイクロアレイのTIF画像のロードを利用できます。以下の、「マイクロアレイの画像解析」に進んでください。

手順 8. マイクロアレイの画像解析

スキヤンによって作成されたマイクロアレイのTIF画像は、CytoDx ソフトウェアによって解析され、feature extraction、CNV および cnLOH の同定、ならびに報告が行われます。

また、データの品質評価に役立てるため、CytoDx では QC マトリクスが測定されます。QC マトリクスのうち 9 つが actionable に分類されています。actionable QC マトリクスは、アッセイ評価の最も重要な指標となっているものです。これらの 9 つの actionable QC マトリクスが基準に達していない場合、CytoDx によって当該マトリクスのステータスは Fail として設定され、このマイクロアレイについてのサンプル結果に対して承認署名することはできません。actionable 以外の QC マトリクスは informational に分類されています。informational QC マトリクスが基準以下の場合、CytoDx によってステータスが Evaluate に設定されます。Evaluate のカテゴリにあるマトリクスについては、サンプル結果に対する承認署名を許可していません。しかし、ある一つのサンプルに対して複数の informational QC マトリクスが Evaluate と評価されている場合、次に進む前にデータの品質を検査してください。

CytoDx ソフトウェアによる解析方法、actionable QC マトリクスおよび informational QC マトリクスの一覧については、取扱説明書 または CytoDx ヘルプシステムを参照してください。

測定結果の判定法

結果の解釈

CytoDx アルゴリズムによって同定された患者サンプル中の aberration は、CytoDx ソフトウェアの Triage View スクリーンから閲覧できます。aberration の結果についての臨床上的解釈は、CytoDx ソフトウェアの aberration の分類(例えば、Pathogenic、Likely Pathogenic、VOUS(意義不明の変異)、Likely Benign、Benign)の段階で行われます。臨床上的解釈は、遺伝医学に関する専門的な知識を有する者で、かつ臨床上的関連性のある CNV および cnLOH 間隔の同定、臨床上的重要性の判断、ならびにこれらの所見/結果の報告について訓練を受けた臨床遺伝専門医によって実施されます。適切な分類項目の選択をするには、医師は、それまでの知見、トラックまたは他のサンプルとの比較、その aberration によって影響を受ける遺伝子の機能と疾病関連性の記述がある遺伝子オントロジーデータベースを利用することができます。分類の割り当ては、Classifications セクションの Cyto レポートに記載されます(Cyto レポートの例については、取扱説明書の Results セクションを参照してください)。

判定上の注意

1) CytoDx ソフトウェアでは、Y 染色体の偽常染色体領域(pseudoautosomal regions; PAR) の aberration を検出できません。PAR 配列は X 染色体上と Y 染色体上で同一であるため、男性のサンプルでは、X 染色体上の PAR の aberration であるのか、Y 染色体上の PAR aberration であるのかを、CytoDx では区別できません。結果として、PAR で同定された aberration は X 染色体に割り当てられます。男性患者のサンプル(または男性の標準サンプルとペアになっている患者サンプル)の場合、PAR 領域の Y 染色体のプロープは、可視化の目的でのみ、CytoDx ソフトウェアの Triage View ディスプレイに含まれます。Y 染色体の異常を含む患者サンプルにおいて、Y 染色体の短腕および長腕の末端の領域である、PAR1 および PAR2 における異常は、X 染色体上でのみ表示されます。女性患者のサンプル(または女性の標準サンプルとペア

アになっている患者サンプル)の場合、Y 染色体のプローブは、可視化の目的でのみ、CytoDx ソフトウェアの Triage View ディスプレイに含まれますが、そのサンプルについては Y 染色体異常は分析されません。

2) アッセイは、認可された臨床検査室で実施する必要があります。

3) コピー数のモザイク現象 50 %未満のものについては正確に検出できないことがあります。

4) 本品 では、均衡型の染色体再編成(例えば、転位または逆位)を同定することはできません。

5) ソフトウェアによって報告される最小領域は、ゲインについては 20 kb および 5 プローブ、ロスについては 10 kb および 5 プローブです。この大きさの範囲では、20 ~ 50 kb 間のコピー数ゲインの再現性は 82 %、10~50 kb 間のコピー数ロスの再現性は約 76 % です(取扱説明書の C0 版の表 25 の分析性能を参照してください)。報告対象として、大きさおよびマーカー数が以上の条件を下回る CNV については、本アッセイの性能を評価しておりません。

6) ソフトウェアによって報告される cnLOH の最小領域は 5 Mb および 100 SNP です。

7) 外部データベースとの連結については、アジレントは評価および監督していません。

8) プローブカバレッジ (probe coverage) が低い領域 (CytoDx 分析中にプローブがマスクされていた領域も含む) に存在する CNV は検出されない可能性があります。参照サンプルが CNV を含む領域および変異が高度である一部の領域にあるプローブは、CytoDx ソフトウェアによってマスクされます。予めロードされているトラックである Agilent Female CNV Reference および Agilent Male CNV Reference では、それぞれ女性および男性の参照サンプルについてマスクされた間隔が含まれます。これらのトラックは、CytoDx ソフトウェアの Configure Settings > Tracks から閲覧できます。

臨床的意義

本品は、発育遅延、知的障害、先天異常、または外表面態異常等に関連する CNV および cnLOH の検出を目的とした体外診断用医薬品です。

臨床性能試験では、病原性の染色体異常の疑いのある 795 の gDNA サンプルが、染色体異常の検出のための出生後アレイ検査を実施している 3 つの地理的に異なる臨床施設から集積されました。これらの検体に対して、本品およびそれぞれの臨床施設で導入されている検査方法で検出された染色体異常を細胞遺伝学者が「Benign」、「Likely Benign」、「Pathogenic」、「Likely Pathogenic」、「VOUS(意義不明の変異)」のいずれかに分類しました。「Pathogenic」または「Likely Pathogenic」と解釈された検体が、すべての検体に占める割合を算定したところ、コピー数異常のみを考慮した場合は、本品と臨床施設の検査方法で共に 14%でした。コピー数異常と cnLOH の両方を考慮した場合は、本品が 20%、臨床施設の検査方法で 14%でした。

また、「Pathogenic」または「Likely Pathogenic」と解釈された検体を「Pathogenic」とし、「VOUS」、「Benign」、「Likely Benign」に分類された検体を「Non-Pathogenic」として、本品と臨床施設の検査方法の一致率を算定しました。コピー数異常の染色体のみを考慮した場合、Pathogenic の一致率は 76.6%、Non-Pathogenic の一致率は 95.8%でした。コピー数異常および cnLOH の両方を考慮した場合は、Pathogenic の一致率は 76.5%、Non-Pathogenic の一致率は 90.0%でした。臨床施設の検査方法により Pathogenic または Likely Pathogenic のコピー数異常があると判定された検体のうち、本品にて Non-Pathogenic と報告されたのは 26 検体でした。この 26 検体のうち、20 検体は同じ染色体異常を検出しましたが、解釈が異なったため、不一致結果となりました。残りの 6 検体は、本品による染色体異常は検出されませんでした。解釈が異なった 20 検体は、VOUS と解釈されたものが 10 検体、Likely Benign と解釈されたものが 9 検体、Benign と解釈されたものが 1 検体でした。本品により染色体異常が検出されなかった 6 検体のうち、5 検体については、本品の解像限界未満または解像限界付近でした。残りの 1 検体には、臨床施設の検査方法で Pathogenic と報告された染色体異常が 2 件ありましたが、本品では検出されませんでした。

上記の試験に加えて、本品で Pathogenic または Likely Pathogenic として報告された 143 件 (114 検体) の重複または欠失の染色体異常について、qPCR、核型検査、FISH、マイクロアレイのいずれかの方法で検出されるかの検討が行われました。その結果、125 件 (87%) で、これら他の方法によっても染色体異常が検出されました。6 件 (4%) については、他法による評価ができませんでした。qPCR 法により染色体異常が検出できなかった 12 件のうち、10 件は臨床施設の検査方法では、検出されていました。また、臨床施設の検査方法で報告された染色体異常が本品でも検出できるかを確認する試験が行われました。報告された染色体異常は、330 件あり、うち 270 件 (81.8%) が本品でも検出されました。不一致となった主な原因は、本品の解像限界未満 (43 件、2 件は cnLOH) および解像限界付近 (14 件) によるものでした。

性能

品質管理の方法

Human Reference DNA Female および Human Reference DNA Male を用いて「用法・用量(操作方法)」欄に記載の操作方法に従い 4 回試験を行ったときに得られる QC メトリックの平均値が、下記の規格に適合します。

QC メトリック	規格
ROC Area	≥ 0.90
Median Difference	≥ 0.80
DLRSpread	< 0.3
Green Reproducibility	< 0.2
Green Background Noise	< 20.0
Green Signal To Noise	> 25.0
Green Signal Intensity	> 50.0
Red Reproducibility	< 0.2
Red Background Noise	< 20.0
Red Signal To Noise	> 30.0
Red Signal Intensity	> 50.0
Restriction Control	> 0.8
SNP Call Rate	> 0.6
Call Ambiguity	< 0.07
Call Accuracy	> 0.96

最小ゲノム DNA 量

検体濃度を規定量以下にして検査を実施した場合に、どの濃度まで許容可能な結果が得られるかを明らかにする試験が実施されました。その結果、本品を用いて試験を行う際に必要とされる最小ゲノム DNA 量は CNV の検出には 0.25µg、cnLOH の検出には 0.375µg であることを示すデータが得られました。

本品の性能は、規定の検体濃度である 0.5 µg で堅牢性があります。

解像度の限界

本品の解像度の限界(すなわち、検出可能な aberration の最小の大きさ)は、CytoDx の analysis method において使用された閾値によって設定されています。これらの閾値は aberration の種類によって異なります。

ゲインについては、20 kb 以上であり、5 以上の CGH プローブが含まれている必要があります。ロスについては、10 kb 以上であり、5 以上の CGH プローブが含まれている必要があります。LOH 間隔については、5 Mb 以上であり、100 以上の SNP プローブが含まれている必要があります。

モザイクサンプルの場合、CNV の検出感度は低下し、特にプローブ数が 100 以下の CNV で低下しますが、サンプル細胞の 50 % 以上に aberration が存在するモザイクサンプルでは、100 以上のプローブを含む CNV は高い信頼性で検出できます。

使用上又は取扱い上の注意

取扱い上(危険防止)の注意

- 1 ラボでの作業時または検体およびサンプルやテスト試薬の取り扱い時には、使い捨てグローブ、ラボコート、保護眼鏡など、適切な個人用保護具(PPE)を着用してください。
- 2 ピペティングを口で行わないでください。
- 3 検体およびサンプルやテスト試薬は、感染性のおそれがあるものとして取り扱ってください。
- 4 検体およびサンプルやテスト試薬の取り扱い後は、手を十分に洗ってください。これらの物質が皮膚、目、または粘膜に触れないようにしてください。接触した場合は、速やかに大量の水で洗ってください。テスト試薬に含有の成分によりそのまま放置すると、やけどする可能性があります。
- 5 これらの試薬がこぼれた場合は、水で希釈してから拭き取ってください。
- 6 ヌクレアーゼによる試薬の汚染を防ぐため、必ずパウダーフリーグローブを着用し、専用の溶液と、ヌクレアーゼフリーのエアロゾルバリアチップを装着したピペットを使用してください。

使用上の注意

ソフトウェアのセキュリティ

GenetiSure Dx Postnatal Assay「アジレント」では、CytoDx ソフトウェアを使用します。

CytoDx ソフトウェアは、システムに保存された電子記録の内容を管理するスタッフによりシステムへのアクセスが制御される環境で使用することを想定しています。

CytoDx ソフトウェアのインストール先コンピュータシステムのシステムセキュリティは、CytoDx 権限所有者の責任で管理してください。

CytoDx ソフトウェアは、EPHI(Electronic Protected Health Information: 保護されるべき電子医療情報)の関連するすべてのセキュリティ要件を満たしたコンピュータおよびネットワークでの使用に適した臨床ラボアプリケーションです。CytoDx アプリケーションをインストールして使用する前に、適切な管理上、物理的、および技術的な保護措置を実施してください。

- コンピュータシステムを物理的および電子的に保護すること
- システムへのアクセス権限所有者を予め明確にしておくこと
- ウイルスやスパイウェアからの保護、プロアクティブ脅威防御、およびネットワーク脅威防御機能を備えたエンドポイントセキュリティソリューションをこれらのシステムにインストールすること
- 一定期間操作が行われない場合に自動的にシステムを保護するようにシステムを設定すること
- システムおよびアプリケーションのセキュリティログと監査証跡を監視し、潜在的な脅威がないか評価すること

環境条件

GenetiSure Dx Postnatal Assay「アジレント」は、環境条件が管理された臨床ラボで使用するよう設計されています。

使用温度: 15~30 °C、使用湿度: 15~85 % RH (30 °C)

アッセイ用に別途用意する必要のある機器、装置、およびその他の器具について、環境条件が、製造業者から提供される仕様範囲内であることを確認してください。

ハイブリダイズしたマイクロアレイスライドは、オゾンにより色素の退色が誘発されます。大気オゾンによる色素への影響は、洗浄およびスキャン時に最も大きくなります。大気オゾン濃度が 5 ppb を超える場合、マイクロアレイスライドのラベル化、ハイブリダイゼーション、洗浄、およびスキャンに使用するラボ区域には、炭素系媒体を使用した気相ろ過など、積極的なオゾン低減措置が必要になります。

cyanine 5(赤)および cyanine 3(緑)は、大気オゾンにより退色する可能性があります。アッセイで使用するこの 2 つの色素は退色速度が異なり、オゾンへの暴露は、最初に赤(cyanine 5) のシグナル強度に関連する QC メトリクスに影響します。これらのメトリクスには、rRepro、rSignalIntensity、および rSignal2Noise があります。高濃度のオゾンへの暴露は、gRepro、gSignalIntensity、gSignal2Noise など、緑(cyanine 3) のシグナル強度に関連する QC メトリクスにも影響する可能性があります。マイクロアレイのデータにオゾンが大きく影響した場合、前述の 1 つ以上のメトリクス指標が、そのデータの信頼性が損なわれている可能性があることを示す評価範囲に入ります。1 つ以上の QC メトリクスが「Evaluate」となり、マイクロアレイスライドの洗浄およびスキャン中にオゾン濃度が上昇した可能性がある場合、結果の信頼性が損なわれているため、アッセイを繰り返す必要があります。

オゾンに加え、次亜塩素酸ナトリウムなどその他の酸化剤も、色素の退色を促進する可能性があります。マイクロアレイスライドの処理に使用するラボ区域では、次亜塩素酸ナトリウムを使用しないでください。

保管および取り扱い

製品の包装および保管

本品を受領後、製品の包装箱に目に見える損傷の痕跡がないか注意深く点検してください。包装箱を開いた後、マイクロアレイスライドの箱が入っているホイルパウチを注意深く点検し、ホイルパウチが完全に密閉されていることを確認してください。製品の包装箱に損傷が検出された場合、またはホイルパウチの真空シールが損なわれている場合は、アジレントのテクニカルサポートにご連絡ください(本電子添文の「問い合わせ先」欄を参照)。

マイクロアレイおよびガスケットスライドを含むキット(GenetiSure Dx Postnatal Assay) をそのまま保管する場合は、室温(15~30 °C)で保管してください。マイクロアレイのホイルパウチの開封後は、マイクロアレイスライドをオゾンおよび湿気から保護された環境(減圧デシケータまたは N₂ パージボックスなど)で室温の暗所に保管することにより、使用期限まで使用できます。ホイルパウチの開封後にマイクロアレイスライドを外気中で保管しないでください。

使用期限を過ぎたマイクロアレイまたはガスケットスライドは使用しないでください。

アッセイ実施時の取り扱い

- 1 試薬ボトルから試薬を分注するときは、試薬が微生物およびヌクレアーゼで汚染されないようにしてください。
- 2 滅菌済みのヌクレアーゼフリーのピペットおよびピペットチップを使用することを推奨します。
- 3 異なるロットの試薬または同じロットの異なるボトルの試薬をまとめないでください。
- 4 使用期限を過ぎたアッセイの試薬や器具を使用しないでください。
- 5 ラボのワークフローは、gDNA の単離に使用する区域から開始し、ハイブリダイゼーションに使用する区域に移動するというように、一方向に進めてください。
- 6 アッセイを通して、各マイクロアレイにハイブリダイズする検体およびサンプルの追跡手順などは、所属機関の手順または一般的な方法に従ってください。
- 7 DNA の単離に使用する消耗品および機器はこの作業に専用のものとし、他の作業に使用したり区域間で移動したりしないでください。
- 8 各区域ではパウダーフリーグローブを着用し、その区域を離れる前に交換してください。
- 9 試薬の調製に使用する機器および消耗品を検体の前処理や、増幅済み DNA またはその他のソースのターゲット DNA のピペティングや処理に使用しないでください。
- 10 消耗品および機器は、常にそれぞれの区域内に保持してください。
- 11 gDNA または酵素を含む溶液の凍結融解の繰り返しは避けてください。
- 12 gDNA や酵素を含まない凍結試薬の原液を調製するときは、次の手順に従います。
 - a) 室温を超えないように、できる限りすばやく試薬を融解します。
 - b) ボルテックスミキサーで短時間混合してから、遠心に 5~10 秒かけて壁面および蓋から内容物を落とします。
 - c) 使用するまで、氷上または冷却ラック内で保管します。
- 13 96 ウェルプレートまたは 8x ストリップチューブをサーマルサイクラーに入れる準備として、ドーム型キャップストリップ(8x ストリップ)でストリップチューブまたはプレートのウェルに蓋をします。
注: キャップストリップの代わりにシーリングテープを使用してプレートのウェルを密閉する必要がある場合は、サーマルサイクラー内でテープが溶解するのを防ぐため、コンプレッションマットを使用してください。

14 ストリップチューブまたは 96 ウェルプレート内の試薬を混合するときは、次の手順に従います。

a) ボルテックスミキサーで、ストリップチューブまたはプレートを 5 秒以上混合します。

b) プレートまたはストリップチューブを 10 秒間、またはキャップから液体がすべて落ちるまで遠心にかけます。

15 サーマルサイクラーでは、96 ウェルプレートまたは 8x ストリップチューブの代わりに、滅菌済みの 200 μ L PCR チューブを使用できます。

16 手順に記載されているすべての容量は、標準的なマイクロピペットの許容誤差範囲内で指定のとおりを使用することを想定しています。すべてのピペットが校正され、製造業者の仕様内で動作していることを確認してください。

17 マイクロアレイスライドは、絶対に再利用しないでください。

廃棄上の注意

未使用の試薬、廃棄物、検体およびサンプルは、廃棄物処理及び清掃に関する法律等の規制に従って廃棄してください。

貯蔵方法、有効期間

1. 包装単位毎の貯蔵方法及び有効期間

GenetiSure Dx DNA Labeling Kit: $-25\sim-15^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

GenetiSure Dx Hybridization Kit: $15\sim30^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

GenetiSure Dx Wash Buffer 1: $15\sim30^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

GenetiSure Dx Wash Buffer 2: $15\sim30^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

GenetiSure Dx Cot-1 Human DNA: $-25\sim-15^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

GenetiSure Dx Postnatal Assay: $15\sim30^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

2. 各構成試薬の貯蔵方法及び有効期間

Human Reference DNA Female: $2\sim8^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

Human Reference DNA Male: $2\sim8^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

10X Restriction Enzyme Buffer: $-25\sim-15^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

BSA: $-25\sim-15^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

Alu I Restriction Enzyme: $-25\sim-15^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

Rsa I Restriction Enzyme: $-25\sim-15^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

Nuclease Free Water: $-25\sim-15^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

Exo (-) Klenow: $-25\sim-15^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

5X gDNA Reaction Buffer: $-25\sim-15^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

Cyanine 5-dUTP: $-25\sim-15^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

Cyanine 3-dUTP: $-25\sim-15^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

10X dNTP Mix: $-25\sim-15^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

Random Primers: $-25\sim-15^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

2X CGH Hybridization Buffer: $15\sim30^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

10X Oligo aCGH Blocking Agent: 溶解前 $15\sim30^{\circ}\text{C}$ 保存、溶解後 $-25\sim-15^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月 (溶解前)

GenetiSure Dx Wash Buffer 1: $15\sim30^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

GenetiSure Dx Wash Buffer 2: $15\sim30^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

GenetiSure Dx Cot-1 Human DNA: $-25\sim-15^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

GenetiSure Dx Postnatal Array: $15\sim30^{\circ}\text{C}$ 保存 18 か月

包装単位

販売名	アジレント型番	包装単位
GenetiSure Dx DNA Labeling Kit	K1201-64100	検体および参照それぞれの 24 反応分 ・GenetiSure Dx DNA Labeling Kit (型番:K1201-64105) ・GenetiSure Dx Labeling Kit Purification Columns (型番:K1201-64110)
GenetiSure Dx Hybridization Kit	K1201-64200	ハイブリダイゼーションスライド 24 枚分
GenetiSure Dx Wash Buffer 1 GenetiSure Dx Wash Buffer 2	K1201-64300	・GenetiSure Dx Wash Buffer 1 (型番:K1201-64305): 4 L \times 2 箱 ・GenetiSure Dx Wash Buffer 2 (型番:K1201-64310): 4 L \times 1 箱
GenetiSure Dx Cot-1 Human DNA	K1201-64400	625 μ L
GenetiSure Dx Postnatal Assay	K1201A	4x180K マイクロアレイスライド および ガasketスライド 各 6 枚、スライドあたり 4 テスト ・GenetiSure Dx Postnatal Array (型番:K1201-64500) ・GenetiSure Dx Gasket (型番:K1201-64600)

主要文献

- Melanie Manning, MD, MS FACMG and Louanne Hudgins, MD, FACMG, for the Professional Practice and Guidelines Committee, "Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities," *Genetics in Medicine* 2010;12(11):742-5.
- David T. Miller, Margaret P. Adam, Swaroop Aradhya, Leslie G. Biesecker, Arthur R. Brothman, Nigel P. Carter, Deanna M. Church, John A. Crolla, Evan E. Eichler, Charles J. Epstein, W. Andrew Faucett, Lars Feuk, Jan M. Friedman, Ada Hamosh, Laird Jackson, Erin B. Kaminsky, Klaas Kok, Ian D. Krantz, Robert M. Kuhn, Charles Lee, James M. Ostell, Carla Rosenberg, Stephen W. Scherer, Nancy B. Spinner, Dimitri J. Stavropoulos, James H. Tepperberg, Erik C. Thorland, Joris R. Vermeesch, Darrel J. Waggoner, Michael S. Watson, Christa Lese Martin, and David H. Ledbetter, "Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies," *The American Journal of Human Genetics* 2010;86:749-64.

3. Hutton M. Kearney, PhD, Erik C. Thorland, PhD, Kerry K. Brown, PhD, Fabiola Quintero-Rivera, MD, and Sarah T. South, PhD, A Working Group of the American College of Medical Genetics (ACMG) Laboratory Quality Assurance Committee, "American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants," *Genetics in Medicine* 2011;13(7):680-5.

4. Hutton M. Kearney, PhD, Sarah T. South, PhD, Daynna J. Wolff, PhD, Allen Lamb, PhD, Ada Hamosh, MD, and Kathleen W. Rao, PhD, A Working Group of the American College of Medical Genetics (ACMG) Laboratory Quality Assurance Committee, "American College of Medical Genetics recommendations for the design and performance expectations for clinical genomic copy number microarrays intended for use in the postnatal setting for detection of constitutional abnormalities," *Genetics in Medicine* 2011;13(7):676-9.

問い合わせ先

アジレント・テクノロジー株式会社 カスタマーサポート

TEL 0800-800-8910 (03-5232-9968)

メール email_japan@agilent.com

製造販売業者の名称および住所

アジレント・テクノロジー株式会社

〒108-0023 東京都港区芝浦四丁目 16 番 36 号住友芝浦ビル

TEL 03-5232-9970