

lifetechnologies社

## リアルタイムPCRセミナー

【セミナー資料】

2013年5月24日（金）

- 資料の学内限定公開についてはlifetechnologies株式会社の許可を得ておりますが、資料および音声データの二次配布については固く禁止させていただきます
- 資料内部に記載されている消耗品価格は当時のものであり、現在は変更されている可能性がありますので、価格については各自でご確認下さい

# ◆◇リアルタイムPCRセミナー◇◆



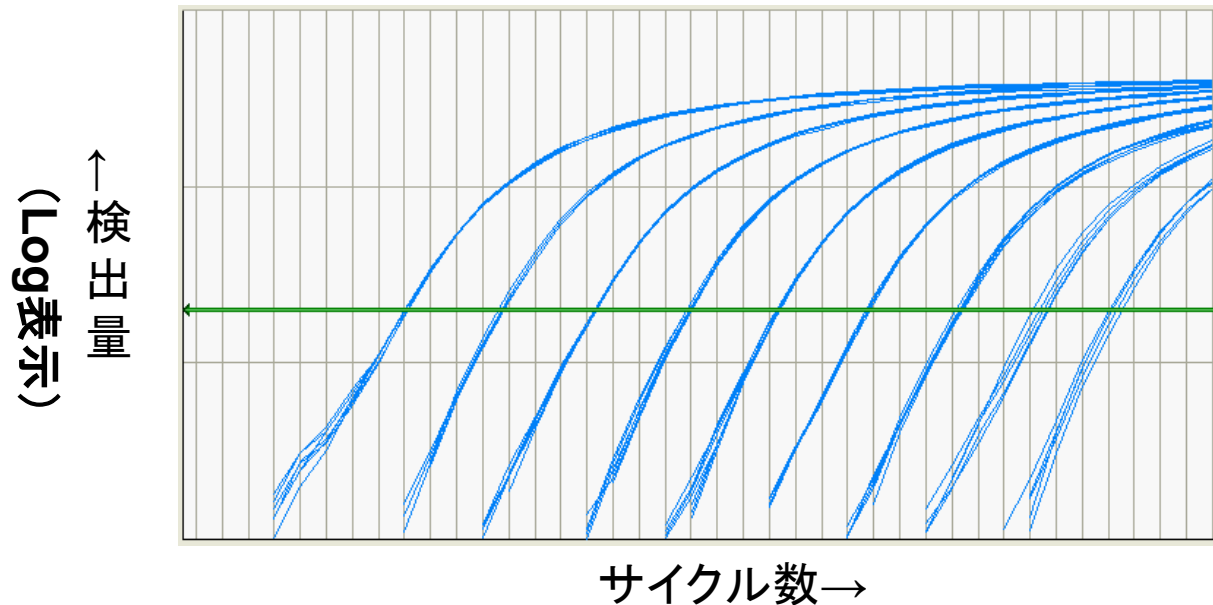
ライフテクノロジーズジャパン(株)  
テクニカルサポート部



# リアルタイムPCRシステムの利点

- 正確で再現性のある核酸の定量
- 広いダイナミックレンジ( $\sim 9 \log$ )
- サンプル使用量が少ない
- PCR後の操作が必要ない⇒**ハイスピード**

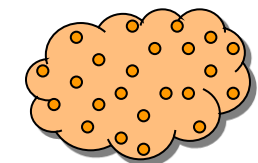
Standard: 120 min  
FAST: 40 min !!



リアルタイムPCRよりも前に.....



# 定量PCRの手順 ~抽出から解析までの流れ~

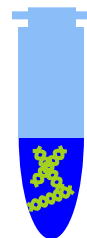


細胞や組織



抽出

30 min



トータルRNA



逆転写

30-60 min



cDNA

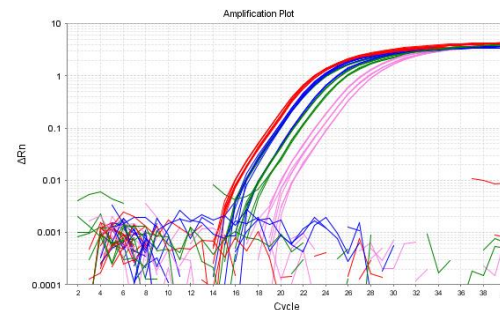
試薬調製



定量実験

Standard: 100 min

Fast: 40 min



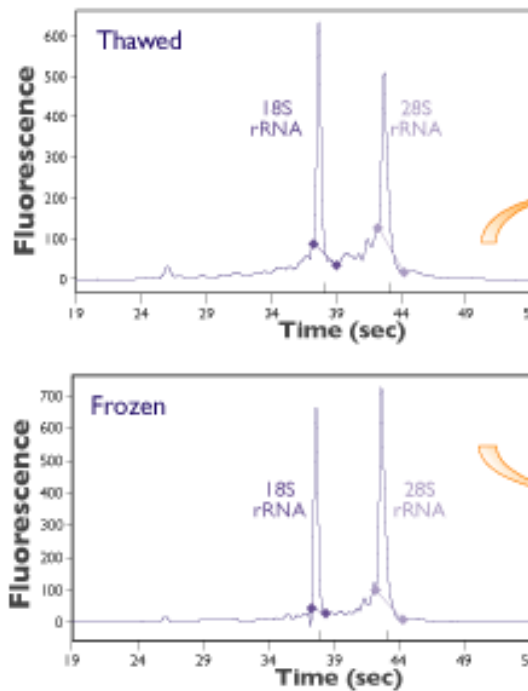
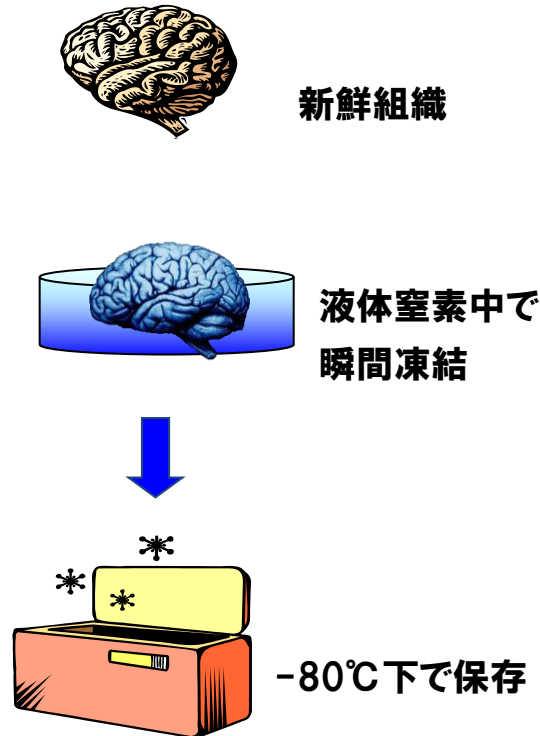
結果解析



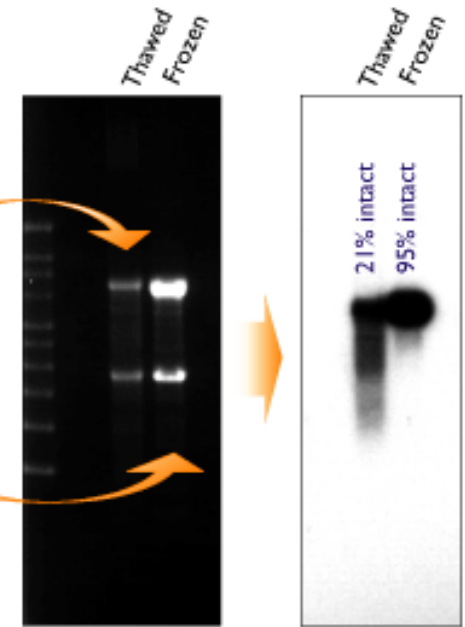
# 適切なサンプル保存：凍結保存

RNA分解なしで長期間の保存可能

注意！：1回の融解によって分解が大幅に進行！



A. Agilent 2100 bioanalyzer



B. EtBr Agarose  
(equal mass loading on gel)

C.  $\beta$ -actin Northern



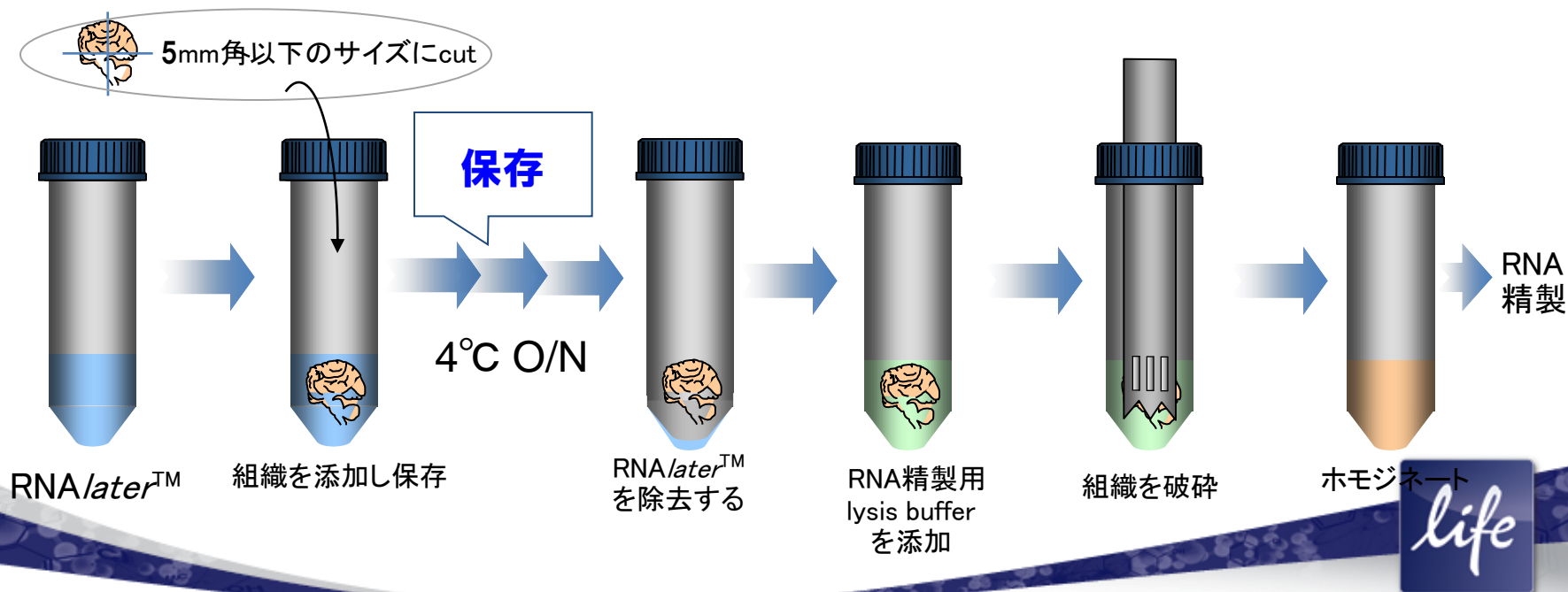
# RNAlater<sup>®</sup> Solution

## 組織保存とRNA Stabilization Solution

- 水性で無毒な組織保存液
- 組織保存と核酸精製に最適化
- 凍結・融解を繰り返してもRNAの分解なし
- RNaseを失活させることができる
- (DNaseも失活)

(対応可能なサンプル)

動物組織  
血液  
培養細胞  
植物  
酵母  
バクテリア



# 逆転写キットによる増幅の違い

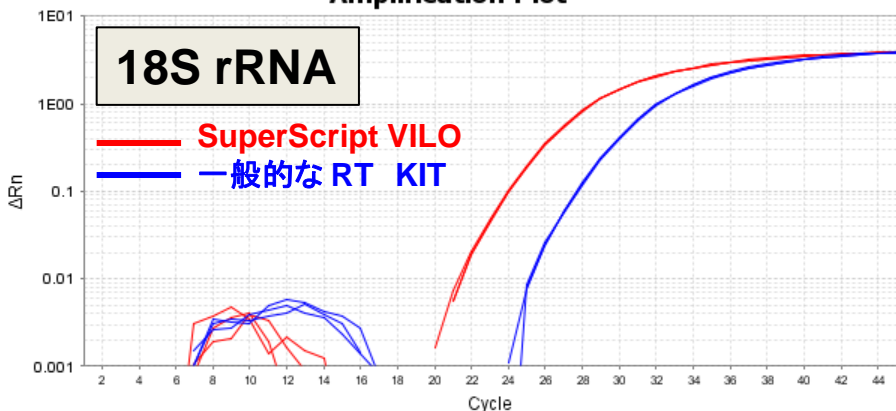
## SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit

- 熱安定性を付与した SuperScript® III を採用
- ヘルパータンパク質が逆転写を促進
- RNaseH 活性を低下させ収量を向上
- ランダムプライマーを採用

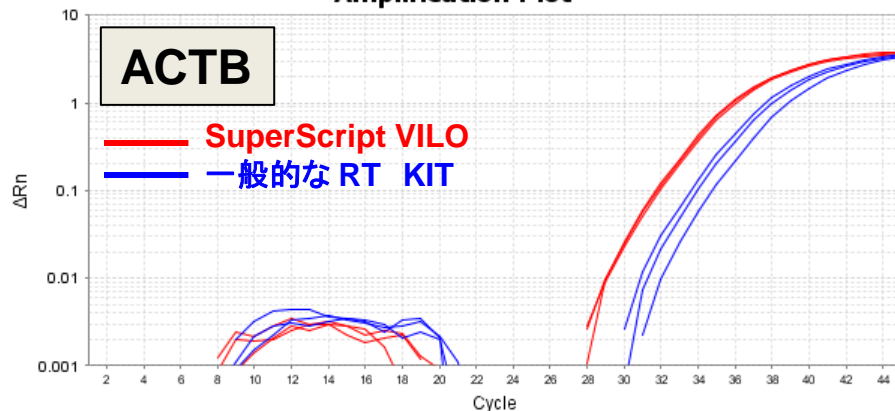
【商品番号11754050 50反応 ¥33,000円】



Amplification Plot



Amplification Plot



断片化が進んだ微量サンプルを使用した実験例  
(マウス腎臓 FFPE 切片を LCM で回収)





# 内部標準遺伝子選択の重要性



# 相対定量

1つのサンプルを基準にして相対比を算出

## 相対定量とは？

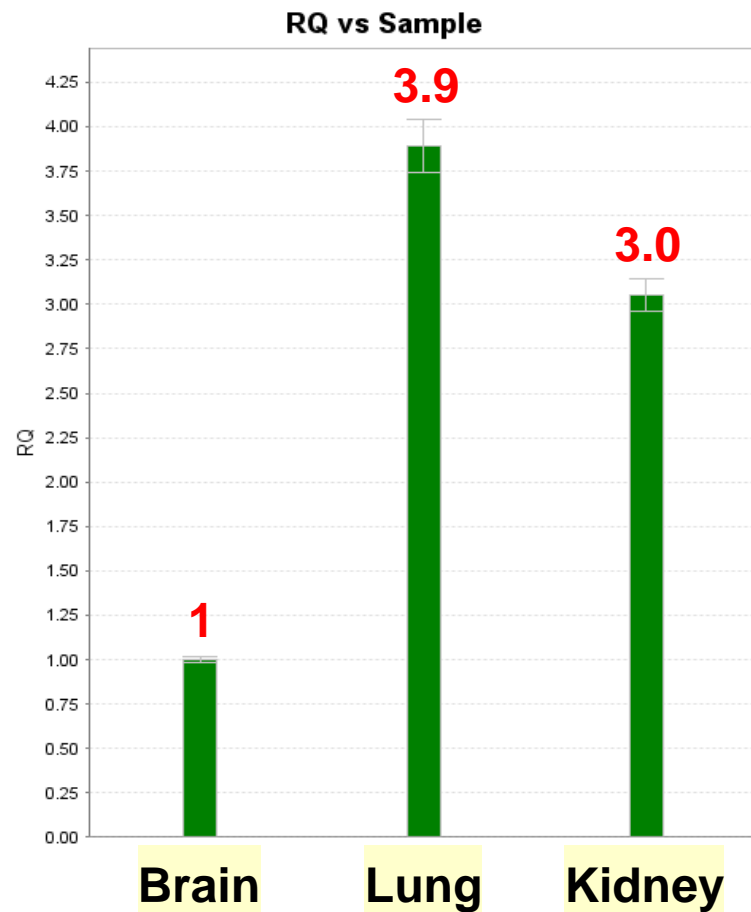
調べたい遺伝子(ターゲット遺伝子)の発現量を  
内在性コントロール遺伝子で補正し、サンプル  
ごとの遺伝子発現を比較

### ■ 検量線法

検量線を作成して PCR 効率を補正しながら定量

### ■ 比較 $C_T$ 法 ( $\Delta\Delta C_T$ 法)

検量線を使用せず、PCR 効率を 100% として定量



# 検量線法とComparative C<sub>T</sub>法( $\Delta\Delta C_T$ 法)

|    | 検量線法                        | $\Delta\Delta C_T$ 法  |
|----|-----------------------------|---|
| 特徴 | 検量線を作成し定量結果を算出              | 基準としたサンプルとのC <sub>T</sub> の差から相対的な濃度差を算出                          |
| 長所 | PCR効率を反映<br>高精度<br>絶対定量では必須 | 検量線作成用サンプルが必要ない<br>低コスト<br>多サンプル処理可能                              |
| 短所 | ラン毎に検量線が必要<br>処理サンプル数が少ない   | <b>PCRの反応効率が一定であることを前提とする</b><br>基準としたサンプルとの濃度差が大きくなるほど誤差も大きくなり易い |

# 内在性コントロールについて

## ● 内在性コントロールとは？

- 反応系へのcDNA 持込量やRT効率の差を補正

## ● 内在性コントロールの選抜基準

- サンプルが変わっても発現量の変化がほとんどない
- それぞれのサンプルで比較的発現量が高い

## 代表例

### ハウスキーピング遺伝子

一般的な細胞機能を与え、すべての細胞で恒常的に転写される遺伝子





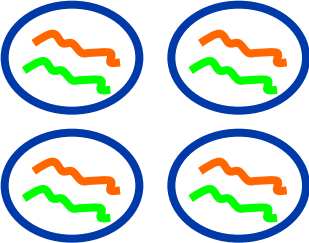
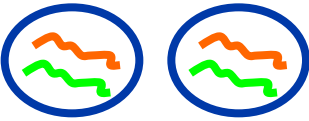
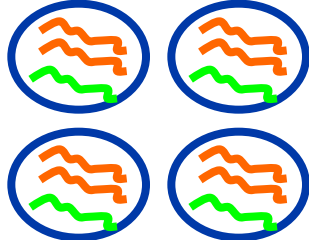
- Beta-actin [ $\beta$ -Actin]
- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [GAPDH]

### Ribosomal RNA

全RNAの80-85%の含有率から全RNAの代表値になる

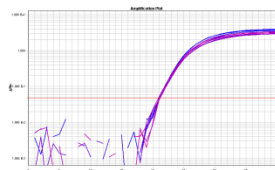
# 内部標準の必要性

～内在性コントロールによる標準化～

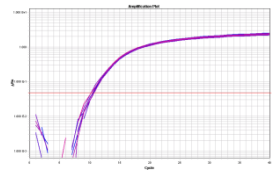
| サンプル   | 標的mRNA量<br> | 内在性コントロールRNA量<br> |  量 /  量 |
|--|--|--|---|
| A   | 4  | 4  | = 1   |
| B   | 2  | 2  | = 1   |
| C  | 8  | 4  | = 2   |

細胞当たりの標的mRNAの相対量を算出

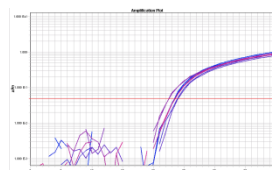
# 複数サンプルにおける内在性コントロールの比較例



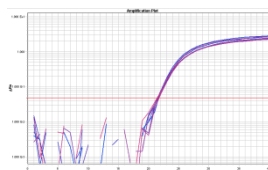
IPC (Positive Control)



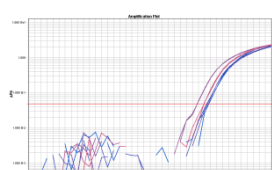
18S ribosomal RNA



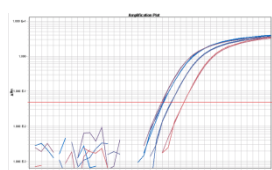
PO



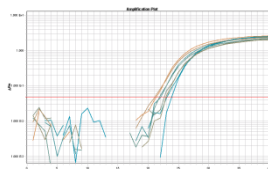
beta-actin



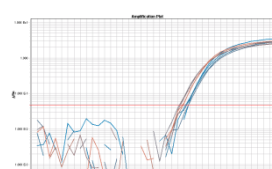
CYC



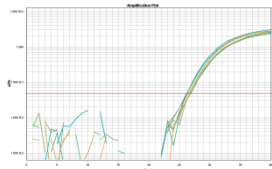
GAPDH



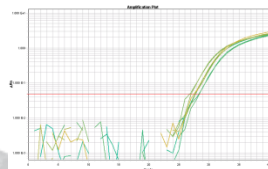
$\beta_2$ -Microglobulin



PGK



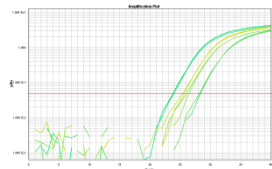
GUS



HPRT



TBP



TfR

測定サンプル(4組織)

- Spleen(脾臓)
- Thymus(胸腺)
- Lung(肺)
- Bone Marrow(骨髄)

今回の4種の組織では・・・

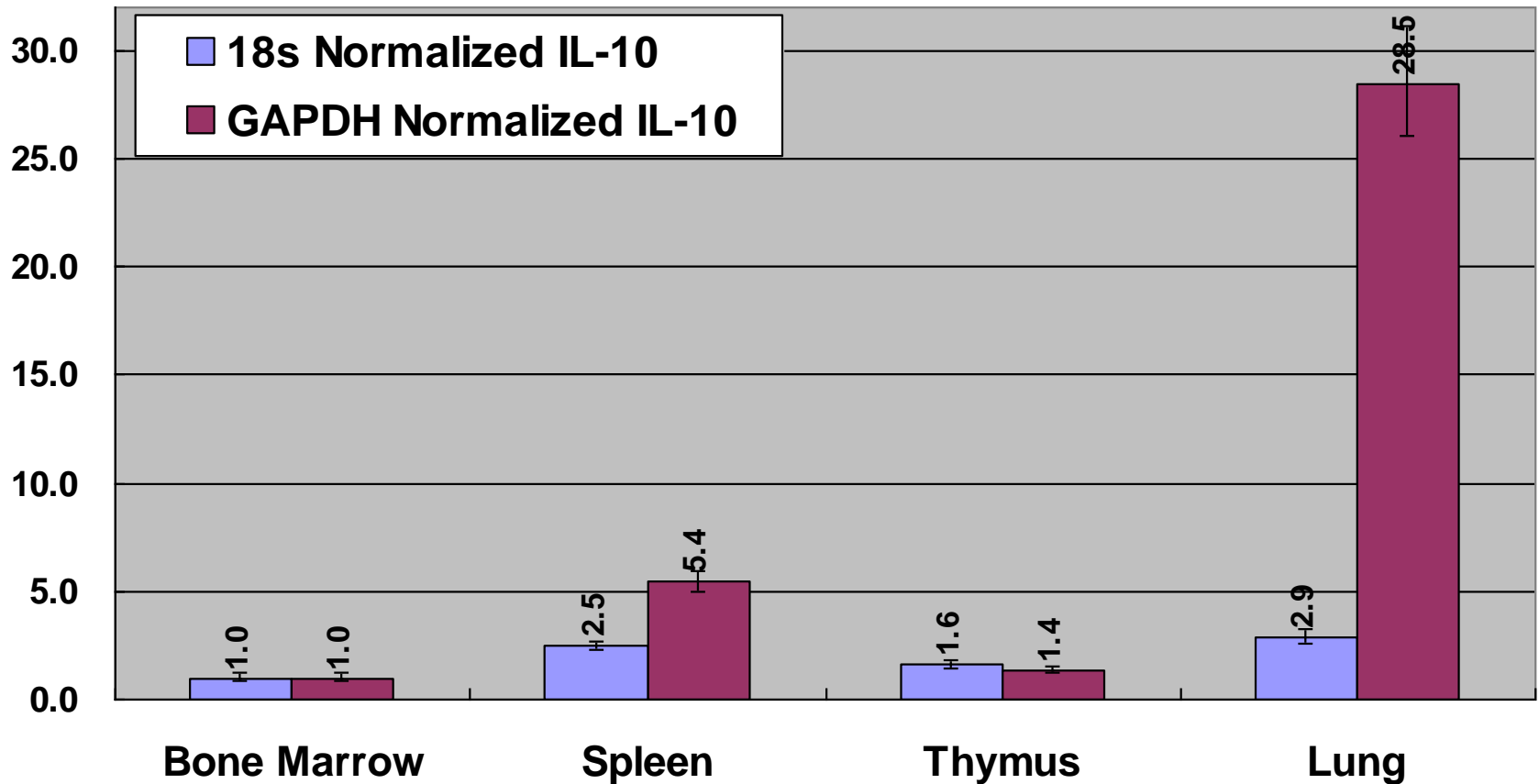
バラつき【大】  
GAPDH、TfR 等

バラつき【小】  
18S rRNA、 $\beta$ -Actin 等



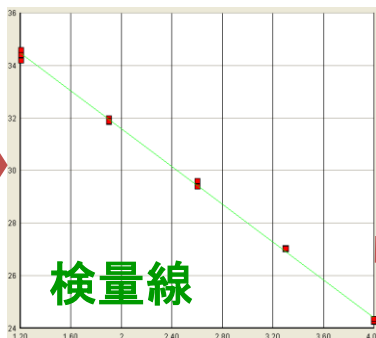
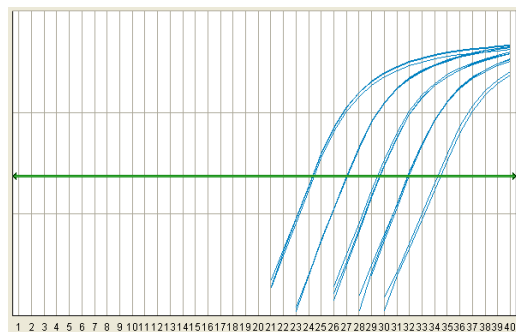
# 異なる内在性コントロール遺伝子を用いた 解析結果の比較

Bone Marrow を基準とした IL-10 の相対定量結果

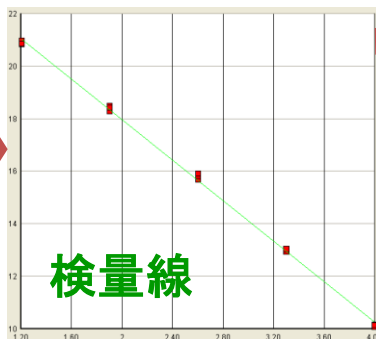
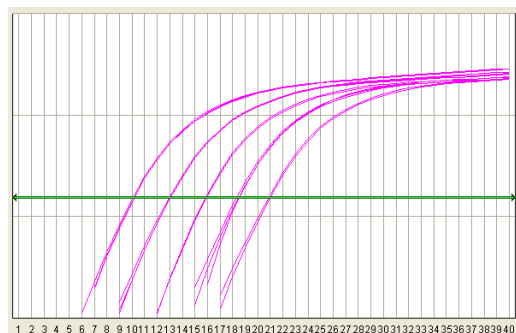


# 転写レベルでの遺伝子発現量の測定 検量線法

## 標的遺伝子



## 内在性コントロール遺伝子



## 定量結果

| Sample Name | Detector | Qty    | Mean Qty | StdDev Qty |
|-------------|----------|--------|----------|------------|
| Colon       | IL8      | 22.56  | 21.87    | 7.42e-001  |
| Colon       | IL8      | 21.96  | 21.87    | 7.42e-001  |
| Colon       | IL8      | 21.08  | 21.87    | 7.42e-001  |
| Spleen      | IL8      | 159.61 | 157.97   | 3.819      |
| Spleen      | IL8      | 160.69 | 157.97   | 3.819      |
| Spleen      | IL8      | 153.60 | 157.97   | 3.819      |
| Colon       | 18S rRNA | 913.57 | 926.31   | 26.073     |
| Colon       | 18S rRNA | 909.06 | 926.31   | 26.073     |
| Colon       | 18S rRNA | 956.30 | 926.31   | 26.073     |
| Spleen      | 18S rRNA | 788.21 | 777.35   | 14.126     |
| Spleen      | 18S rRNA | 761.38 | 777.35   | 14.126     |
| Spleen      | 18S rRNA | 782.45 | 777.35   | 14.126     |



定量結果算出  
(割り算)

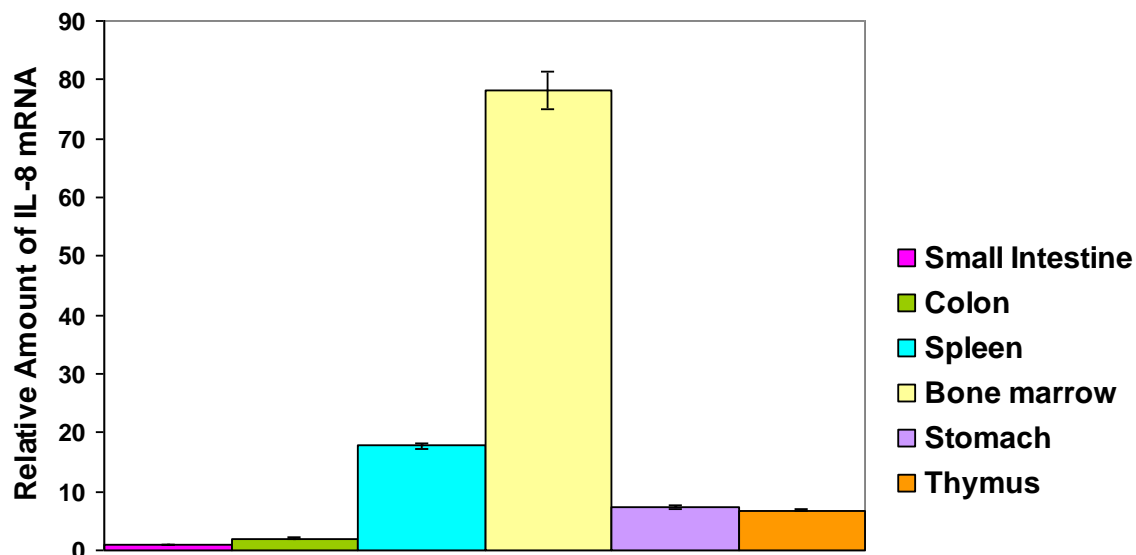




# 転写レベルでの遺伝子発現量の測定例

## 検量線法

| Tissue          | 標的遺伝子の<br>定量結果 | 内部標準遺伝子<br>の定量結果 | 内部標準で<br>ノーマライズ      | キャリブレーター<br>でノーマライズ         |
|-----------------|----------------|------------------|----------------------|-----------------------------|
|                 | IL-8           | 18S rRNA         | Norm. to<br>18s rRNA | Norm. to<br>Small Intestine |
| Small Intestine | 143            | 12482            | 0.0115               | 1.00                        |
| Colon           | 350            | 14821            | 0.0236               | 2.06                        |
| Spleen          | 2528           | 12438            | 0.2032               | 17.72                       |
| Bone marrow     | 10629          | 11855            | 0.8966               | 78.20                       |
| Stomach         | 827            | 9665             | 0.0856               | 7.46                        |
| Thymus          | 1124           | 14576            | 0.0771               | 6.73                        |



# 検量線を用いない「 $\Delta\Delta Ct$ 法」による解析

## $\Delta\Delta Ct$ 法: comparative Ct法、比較Ct

### $\Delta\Delta Ct$ 法の特徴

- 検量線を作成せずに比較定量する方法
- 1サイクルの違いで、2倍量の差であるという理論を活用する
- 検量線作成が不要なので、多サンプルを処理できる

相対比を算出する数式:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

### $\Delta\Delta Ct$ 法の成立する条件

- ターゲット遺伝子と内在性コントロール遺伝子のPCR効率がほぼ等しい
- PCR効率が共に「100%」に近い



# ΔΔCt法による解析

GAPDH遺伝子を内在性コントロール(内部標準)として用いて、  
Brainでのc-myc発現量を1とした場合の各臓器におけるc-myc発現量を比較

| 組織             | c-mycの<br>平均Ct値 | GAPDHの<br>平均Ct値 | ΔCt値<br>(c-myc) Ct値<br>-<br>(GAPDH) Ct値 | ΔΔCt<br>(各臓器のΔCt値)<br>-<br>(Brainの ΔCt値) | $2^{-\Delta\Delta Ct}$<br>乗数項に代入 | Brainを基準とした<br>c-mycの発現比較<br>(GAPDHで 補正) |
|----------------|-----------------|-----------------|---|--|----------------------------------|--|
|                | ターゲット遺伝子        | 内在性コントロール       | GAPDHで補正                                | Brainを基準                                 | 相対比                              | 相対比                                      |
| Brain<br>(脳)   | 30.49           | 23.63           | 30.49-23.63<br>=6.86                    | 6.86-6.86<br>=0                          | $2^{-(0)}=1$                     | 1  |
| Kidney<br>(腎臓) | 27.03           | 22.66           | 27.03-22.66<br>=4.37                    | 4.37-6.86<br>= -2.5                      | $2^{-(-2.5)}=5.6$                | 5.6                                      |
| Liver<br>(肝臓)  | 26.25           | 24.60           | 26.25-24.60<br>=1.60                    | 1.60-6.86<br>= -5.21                     | $2^{-(-5.21)}=37$                | 37                                       |
| Lung<br>(肺)    | 25.83           | 23.01           | 25.83-23.01<br>=2.81                    | 2.81-6.86<br>= -4.05                     | $2^{-(-4.05)}=16.5$              | 16.5                                     |

\* 指数の割り算は乗数項の引き算

$$2^{30.49} \div 2^{23.63} = 2^{30.49 - 23.63} = 2^{6.86}$$

# アッセイデザインのポイント



# プライマー・プローブ デザイン時の留意事項

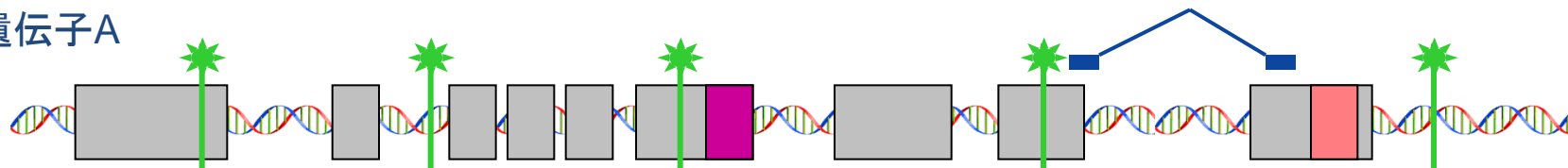
## 特異性

- ・Tm値
- ・SNPの排除
- ・相同配列の排除
- ・反復配列の排除
- ・exon-exon ジャンクションに設計  
(ゲノムDNAを検出しない)

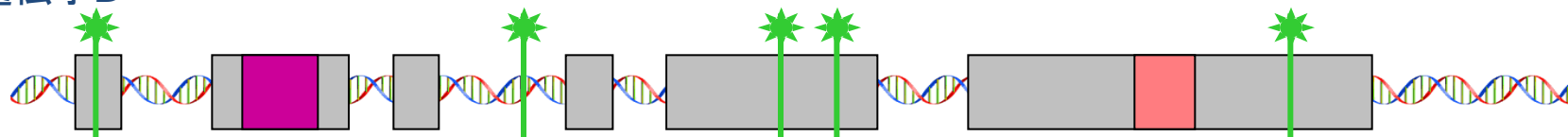
## PCR増幅効率

- ・増幅効率が低下するとデータ精度も低下する
- ・アンプリコンのサイズを短くすると反応効率が上昇する(50-150 bp)

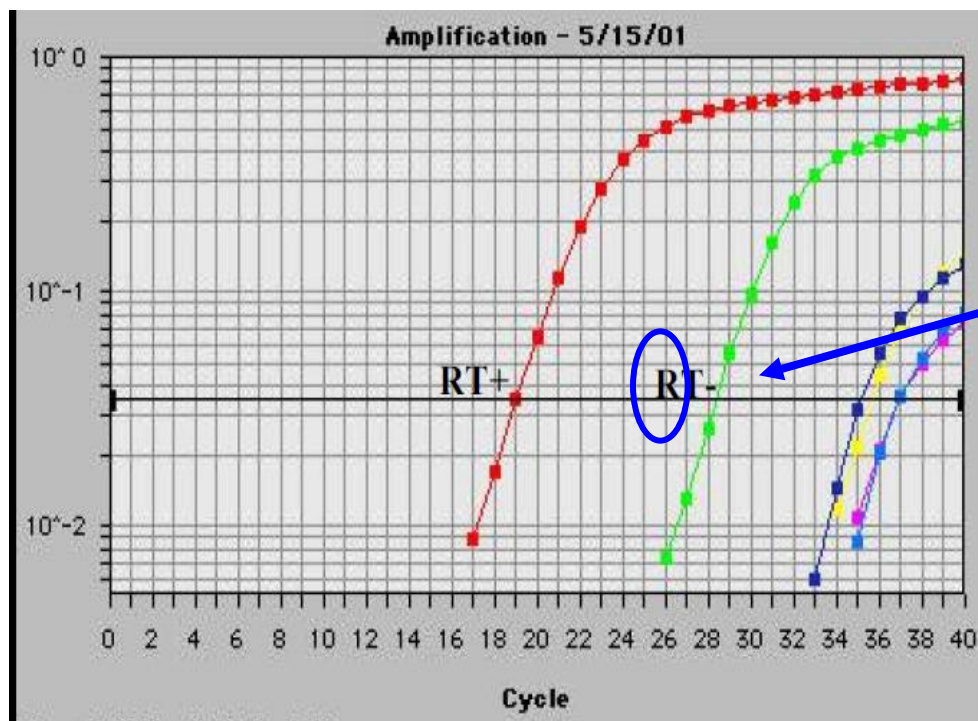
遺伝子A



遺伝子B



# ゲノム DNA のコンタミネーション



逆転写を行わないのに増幅する



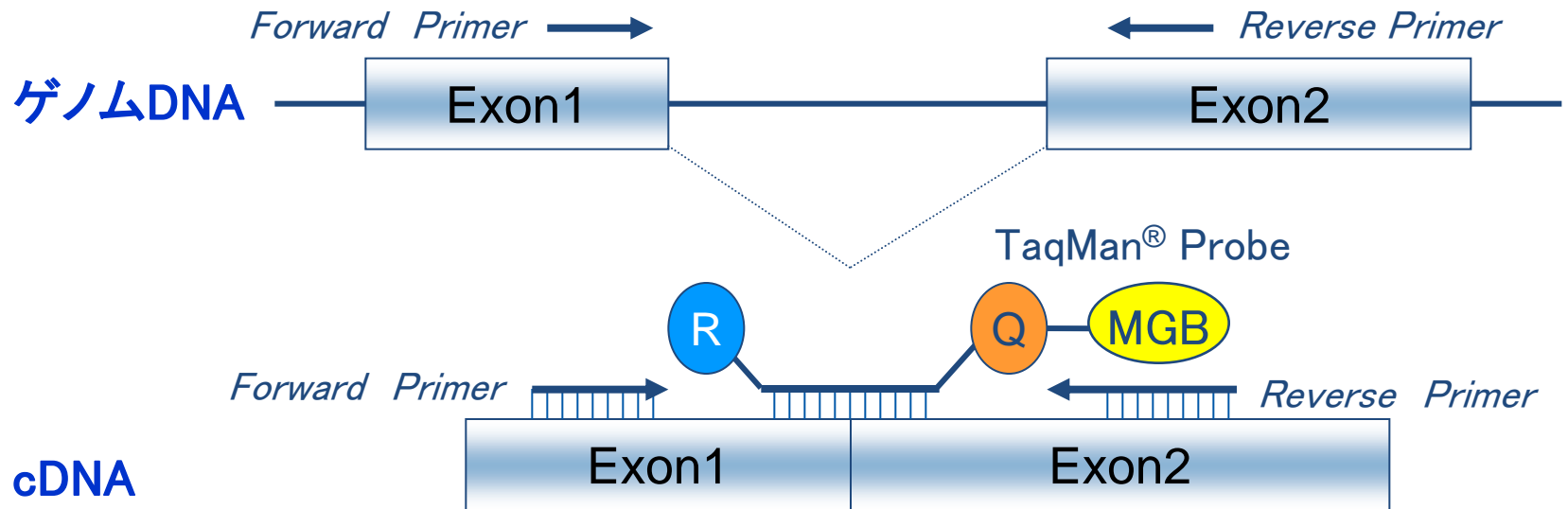
ゲノムDNAの  
コンタミネーションによる増幅

- RNA を抽出すると必ずゲノム DNA も共に抽出されてくる
- DNase 処理を行うと RNA をロスする可能性がある

# ゲノム DNA を検出しないための設計の工夫

ゲノムのコンタミを検出しないようにTaqMan<sup>®</sup>プローブとPrimerを設計する

Primerは可能であればIntronを挟み、異なるExon上にPrimerを設計。  
また、TaqMan<sup>®</sup> Probeをジャンクション部位に設計する。  
(ゲノムDNAの誤検出を防ぐため)



# TaqMan® Gene Expression Assaysについて

## 条件検討の要らないデザイン済みプライマー・プローブのミックス

Inventoried: 250反応 (20uL反応系) ¥29,800-

Made to Order: 360反応 (20uL反応系) ¥45,000-



デザイン済み  
プライマー・プローブを利用

ヒト・マウス・ラット  
シロイヌナズナ・ショウジョウバエ  
線虫・アカゲザル・イヌ など  
合計で 128万種 のアッセイを提供

TaqMan®  
Gene Expression Assays

| 生物種                              |          | Assay数  | 生物種                                  |               | Assay数 |
|----------------------------------|----------|---------|--------------------------------------|---------------|--------|
| <i>H. sapiens</i>                | ヒト       | 197,803 | <i>X. tropicalis (Frog)</i>          | カエル           | 56,764 |
| <i>M. musculus</i>               | マウス      | 174,400 | <i>D. rerio (Zebrafish)</i>          | ゼブラフィッシュ      | 63,712 |
| <i>R. norvegicus</i>             | ラット      | 151,309 | <i>C. elegans</i>                    | 線虫            | 92,687 |
| <i>M. mulatta (Rhesus)</i>       | アカゲザル    | 65,065  | <i>D. melanogaster</i>               | ショウジョウバエ      | 41,607 |
| <i>C. familiaris (Canine)</i>    | イヌ       | 54,960  | <i>S. pombe (Fission Yeast)</i>      | 分裂酵母          | 6,538  |
| <i>B. taurus (Cow)</i>           | ウシ       | 67,089  | <i>S. cerevisiae (Baker's yeast)</i> | 出芽酵母          | 5,525  |
| <i>G. gallus (Chicken)</i>       | ニワトリ     | 48,432  | <i>T. aestivum (Wheat)</i>           | 小麦            | 760    |
| <i>O. cuniculus (Rabbit)</i>     | ウサギ      | 4,076   | <i>A. thaliana</i>                   | シロイヌナズナ       | 97,879 |
| <i>S. scrofa (Pig)</i>           | ブタ       | 7,241   | <i>O. sativa (Rice)</i>              | コメ            | 99,822 |
| <i>C. porcellus (Guinea Pig)</i> | モルモット    | 2,037   | <i>G. max (Soybean)</i>              | 大豆            | 3,456  |
| <i>E. caballus (Horse)</i>       | ウマ       | 2,970   | <i>Z. mays (Corn)</i>                | トウモロコシ        | 38,446 |
| Pathogens                        | ウイルス等微生物 | 28      | <i>V. vinifera (Grape)</i>           | ブドウ           | 965    |
| Markers & Reporters              | GFPなど    | 4       | Artificial Control                   | ERCC control等 | 201    |

合計数

1,283,776種類



# TaqMan<sup>®</sup> Array Plate

## TaqMan<sup>®</sup> Array Plate

- プレート構成、アッセイ、配置、レプリケート数、コントロールをオンラインの構成ツールで選択
- 6枚から購入可能のため、小・中または大規模のプロジェクトに最適
- プライマー・プローブが乾燥状態で、96ウェルフォーマットで供給されるため、マスターミックスとサンプルを添加するだけ
- Fast / Standard plate両方に対応

## TaqMan<sup>®</sup> Array Gene Signature 96-Well Plate

(¥34,000- / 枚)

- Apoptosis, Diabetes, Inflammation などジャンルに応じた遺伝子セット(100種類以上)
- 1枚から購入可能
- プライマー・プローブが乾燥状態で、96ウェルフォーマットで供給されるため、マスターミックスとサンプルを添加するだけ
- Fast/Standard plate 両方に対応



life

# Human colorectal Cancer Metastasis Plate を用いた 大腸癌部、隣接非癌部の網羅的遺伝子発現解析

**【サンプル】**

FirstCoice® Colon Tumor/NAT Total RNA  
Caucasian Female (Age 70)

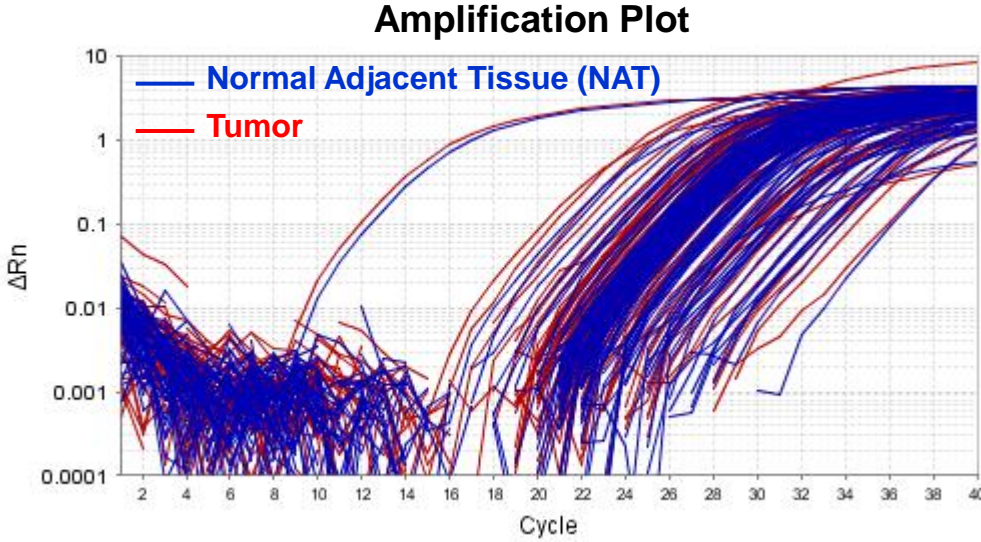
**【使用プレート】**

Human colorectal Cancer Metastasis Plate  
cDNA: 5ng/well

カタログ番号: 4418766  
定価: ¥34,000-/枚  
大腸癌関連遺伝子: 92  
内在性遺伝子: 4

**【使用機種】**

StepOnePlus™ リアルタイムPCRシステム



| Gene Symbol | 1      | 2      | 3      | 4       | 5      | 6      | 7        | 8      | 9      | 10    | 11     | 12     |
|-------------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|----------|--------|--------|-------|--------|--------|
| A           | 18S    | GAPDH  | HPRT1  | GUSB    | ADRBK1 | AKT1   | APC      | APPL1  | ARRB1  | AXIN2 | BAX    | BCL2L1 |
| B           | BIRC5  | BRAF   | CASP3  | CASP9   | CCND1  | CCND2  | CDH1     | CDKN1A | CTNNB1 | DCC   | DVL1   | E2F4   |
| C           | EGF    | EGFR   | FZD1   | GNAS    | GNB3   | GRB2   | GSK3B    | IFNG   | IFNGR1 | IL6   | IL6R   | JAK1   |
| D           | KRAS   | LEF1   | LRP5   | LRP6    | MAP2K1 | MAP2K2 | MAP2K4   | MAP2K6 | MAPK1  | MAPK3 | MLH1   | MMP1   |
| E           | MMP14  | MMP2   | MMP7   | MMP9    | MSH2   | MSH6   | MYC      | NFKB1  | NFKB2  | NOS2  | PIK3CA | PIK3CB |
| F           | PIK3R1 | PIK3R2 | PRKACA | PRKAR1A | PTGER2 | PTGER4 | PTGS2    | REL    | RELA   | RELB  | SMAD2  | SMAD3  |
| G           | SMAD4  | SOS1   | SRC    | STAT1   | STAT3  | TCF3   | TCF4     | TGFB1  | TGFB2  | TGFB3 | TGFBR1 | TGFBR2 |
| H           | TLR2   | TLR3   | TLR4   | TLR7    | TLR9   | TNF    | TNFRSF1A | TP53   | VEGFA  | WNT1  | WNT3A  | WNT5A  |

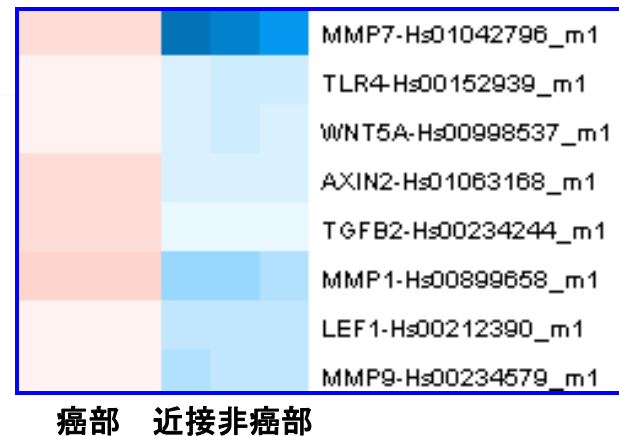
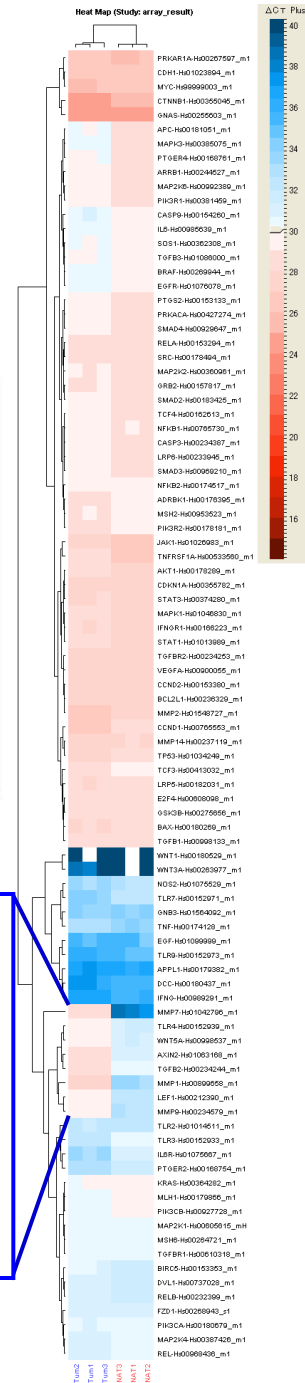
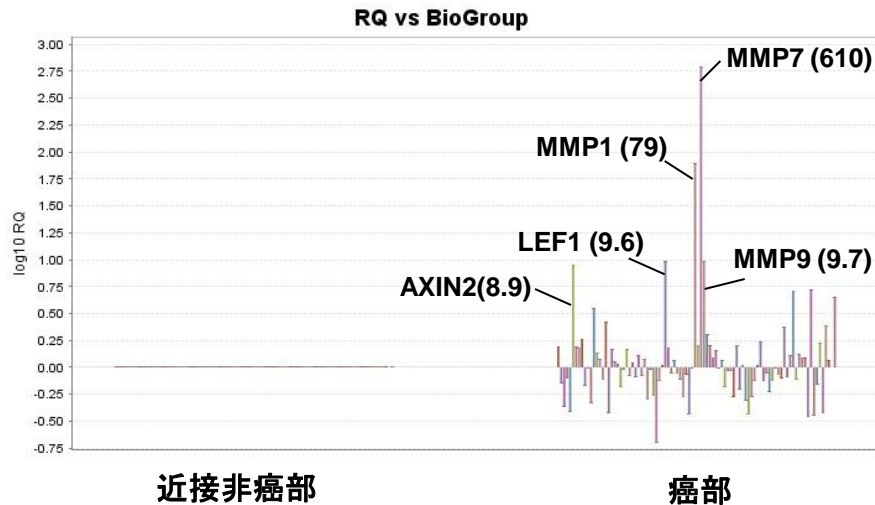
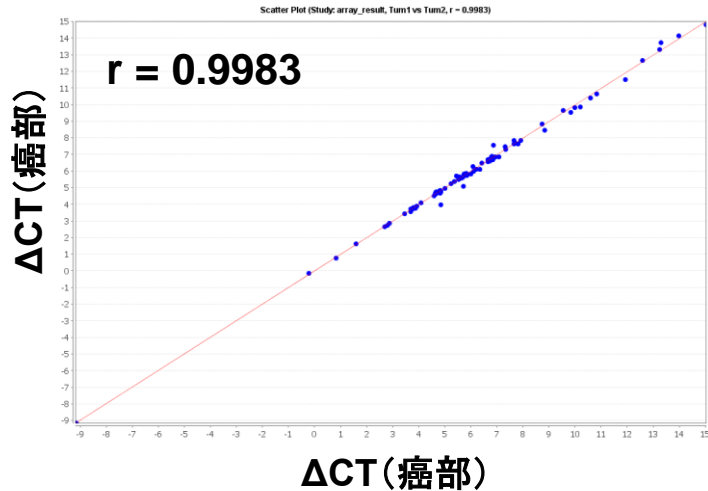
# DataAssist™ software を用いたデータ解析

[http://marketing.appliedbiosystems.com/mk/get/DATAASSIST\\_SOFTWARE\\_LOGIN](http://marketing.appliedbiosystems.com/mk/get/DATAASSIST_SOFTWARE_LOGIN)

基準サンプル: 近接非癌部

内在性コントロール: 複合 (18S, GAPDH, HPRT1, GUSB)

テクニカルレプリケート数: n=3

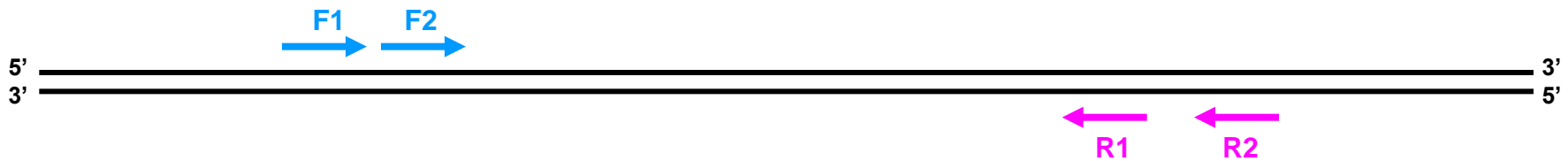


- 癌部のサンプルでは MMPs が高く発現
- 癌細胞は MMPs を多量に産生し、細胞外基質を分解することにより、浸潤転移を促している可能性

# SYBR<sup>®</sup> Green アッセイのワークフロー

## 1. Primer の設計

- 新規で設計では Primer Express software を用いた設計がオススメ
- 時間が無い場合は Forward と Reverse で複数設計し、最適な組み合わせを検討する



## 2. Primer の最適条件の検討

- プライマー濃度の最適化
  - 複数プライマーを同一プレートで反応できるのでオススメ
- 反応温度の最適化
  - Primer ごとに最適温度が異なると、同一プレート上で反応させることが難しくなる

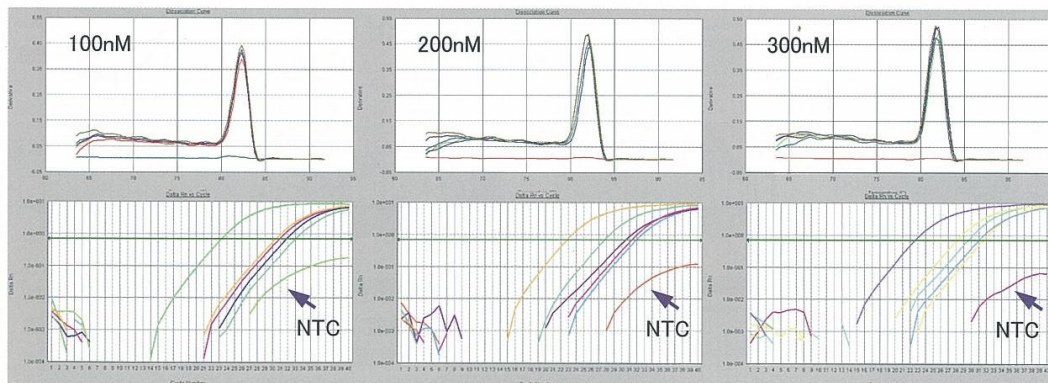
# Primer の最適化 - Primer Optimization Matrix -

- プライマーの濃度を調節することにより、アニーリング温度を調節すると同様の効果を得る

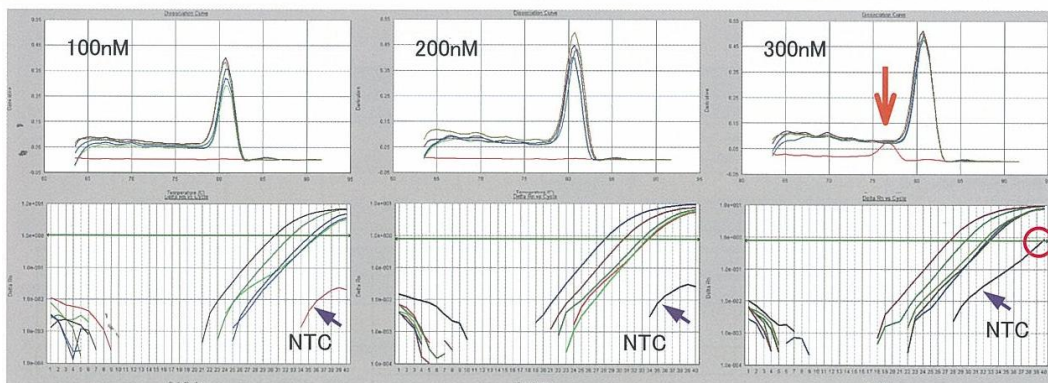
| Reverse Primer (nM) | Forward Primer (nM) |         |         |
|---------------------|---------------------|---------|---------|
|                     | 100                 | 200     | 300     |
| 100                 | 100/100             | 100/200 | 100/300 |
| 200                 | 200/100             | 200/200 | 200/300 |
| 300                 | 300/100             | 300/200 | 300/300 |

- プライマーダイマーができない組合せを採用
- 立ち上がりが早く、増幅産物量の多い組合せを採用

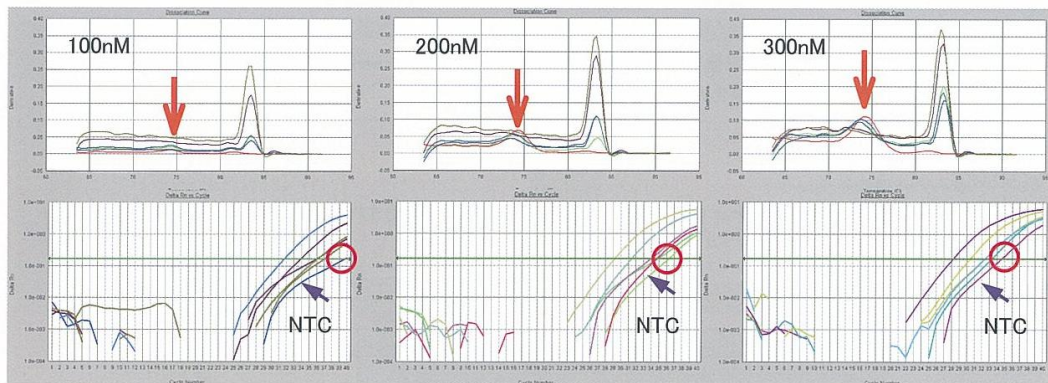
# SYBR® Green Primer 条件検討例



プライマーセットA  
どの濃度でも使用可能



プライマーセットB  
条件次第で使用可能

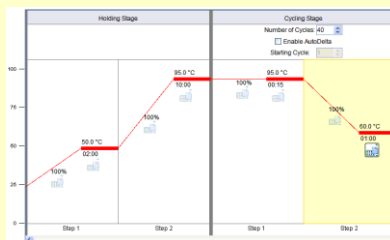


プライマーセットC  
再設計が必要

|          | TaqMan® アッセイ  | SYBR® Green アッセイ   |
|----------|---|--|
| 蛍光検出     | TaqMan®プローブ分解による<br>蛍光シグナル検出                                  | 2本鎖DNAに結合する<br>SYBR® Green I dye の蛍光シグナル検出               |
| 標準偏差     | 小   | 大  |
| 使用オリゴ    | 3種<br>ノンラベルプライマー × 2<br>TaqMan®プローブ                           | 2種<br>ノンラベルプライマー × 2                                     |
| 特異性      | 高<br>3種のオリゴで検出<br>ターゲット特異的<br>プライマーダイマーを検出しない<br>非特異的産物を検出しない | 低<br>2種のオリゴで検出<br>2本鎖DNA特異的<br>プライマーダイマーを検出<br>非特異的産物を検出 |
| マルチプレックス | 可能<br>異なる蛍光で標識したプローブを使用                                       | 不可能  |
| 検出時間     | 短時間   | 長時間<br>2次産物の有無を確認する為定量ステップ<br>終了後、融解曲線作成が必須              |
| 反応条件検討   | 不要  | 必要<br>プライマー濃度の最適化<br>プライマーを再合成する場合有り                     |
| 既製キット    | 有り<br>TaqMan® Gene Expression Assays<br>多様な生物種 対象に合計120万種以上   | 無し   |
| 特徴       | 簡単・高精度<br>スピーディーな<br>TaqMan®アッセイ                              | 予備検討が必須な<br>SYBR®Green アッセイ<br>予備検討済みなら低価格               |

# リアルタイム PCR はバランスが命

## 温度条件



## Master Mix



## Primer & Probe



バランスが崩れると実験が上手くいかなくなります

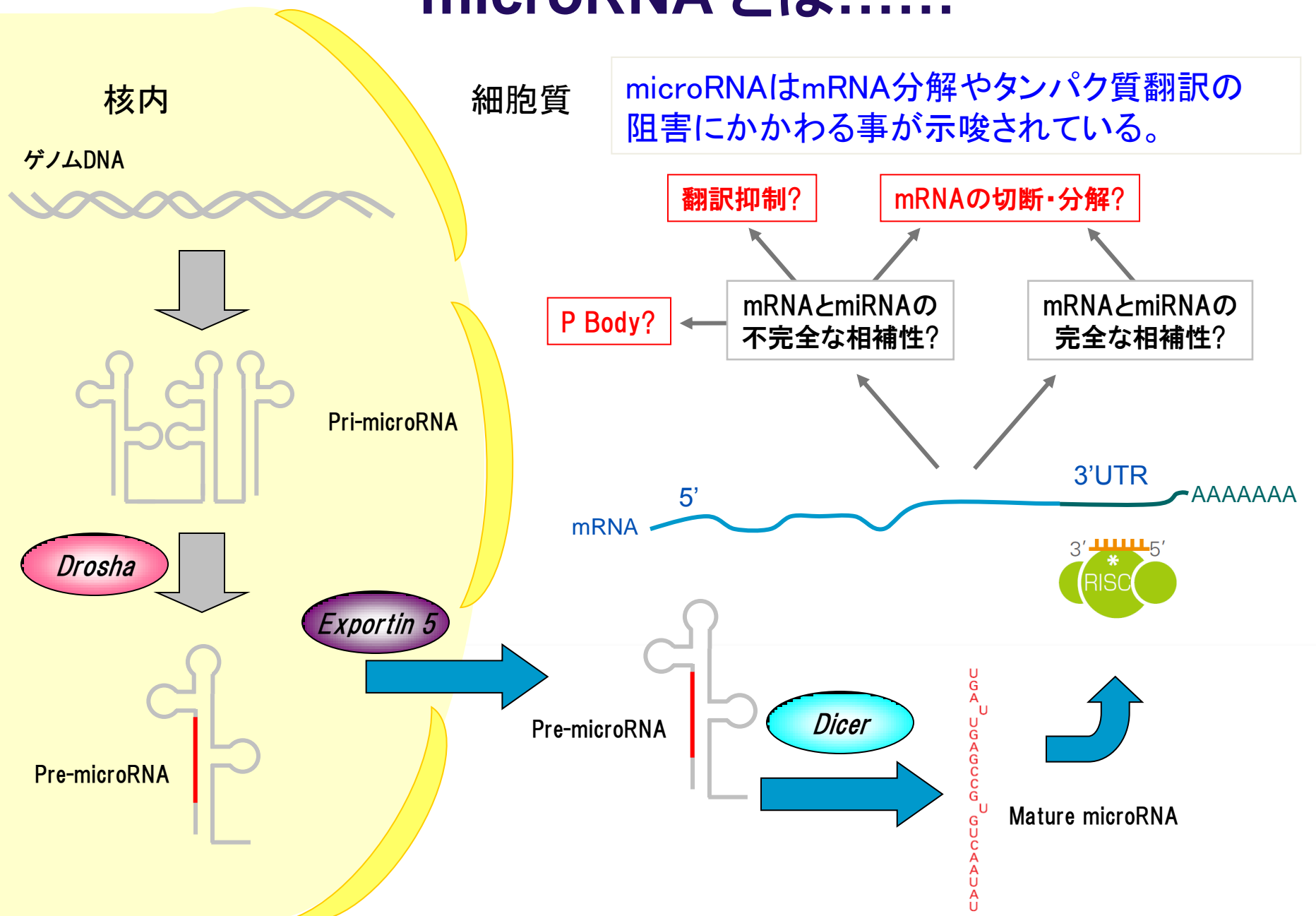
life



# アプリケーション



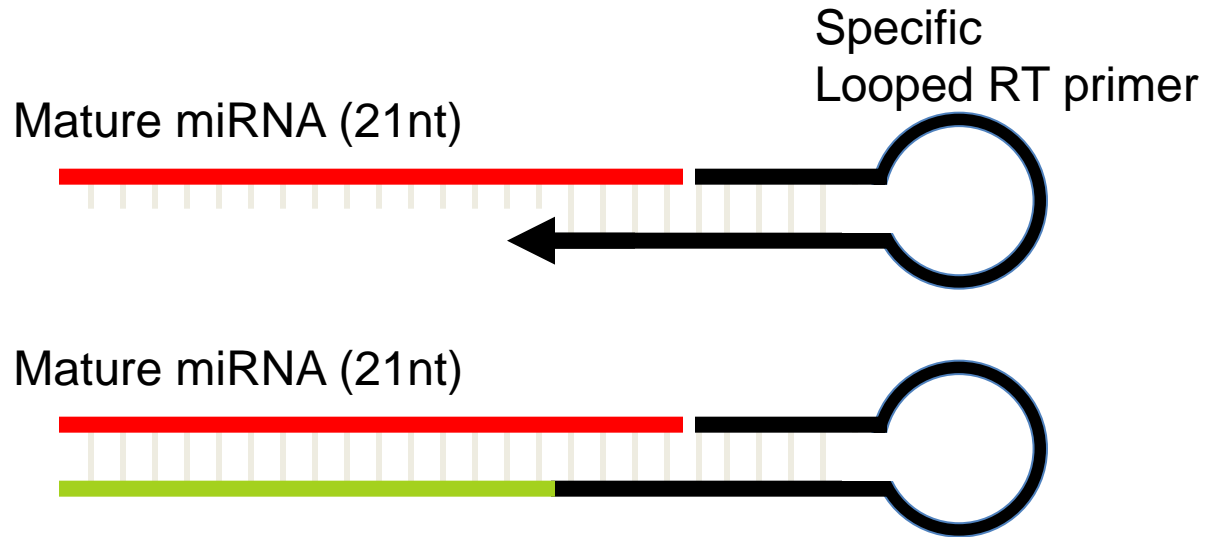
# microRNA とは.....



# MicroRNAをリアルタイムPCRで定量できる 新しいメカニズム

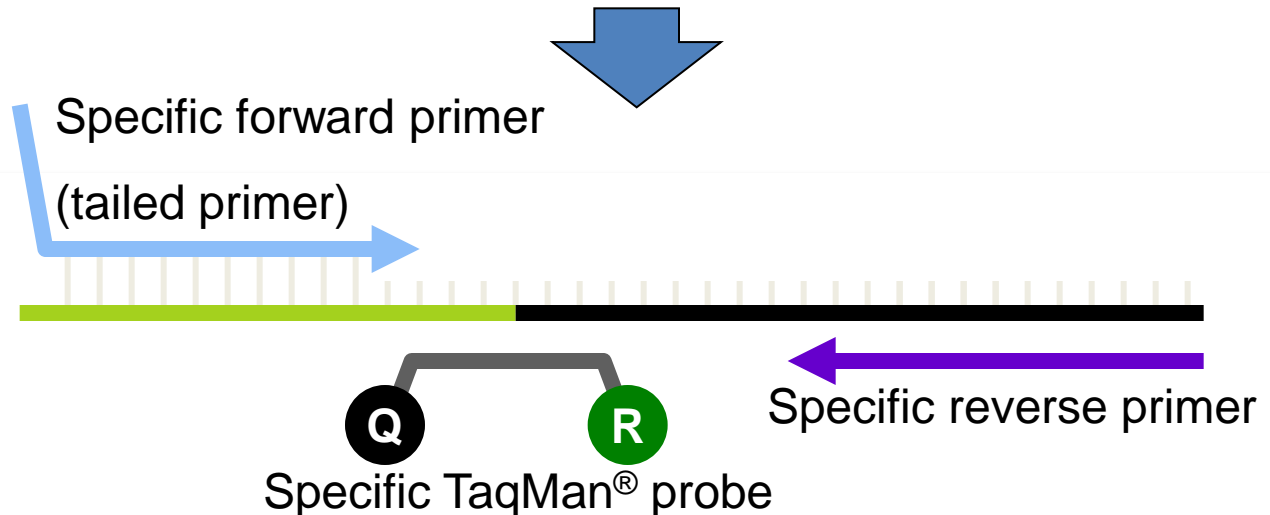
Step1: 逆転写  
アニーリングと伸張反応

Oligo  
Specific RT primer



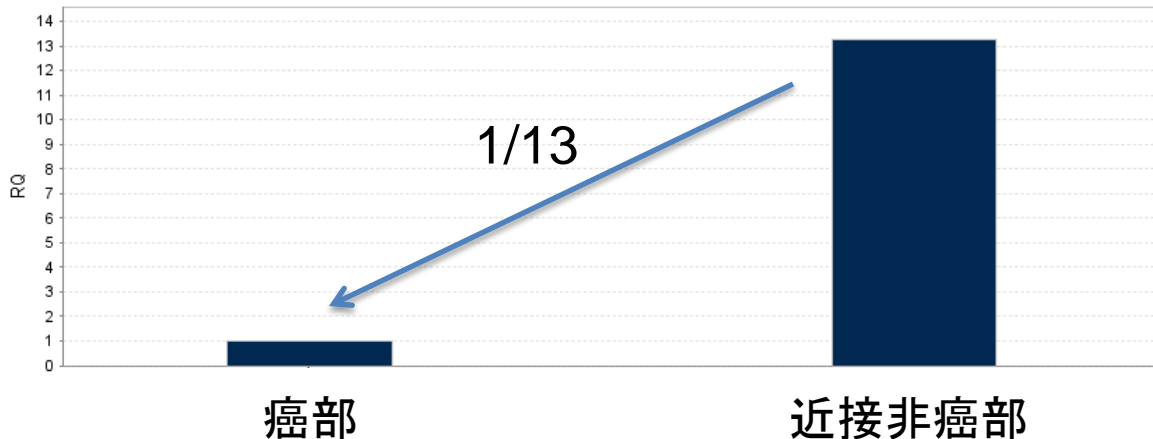
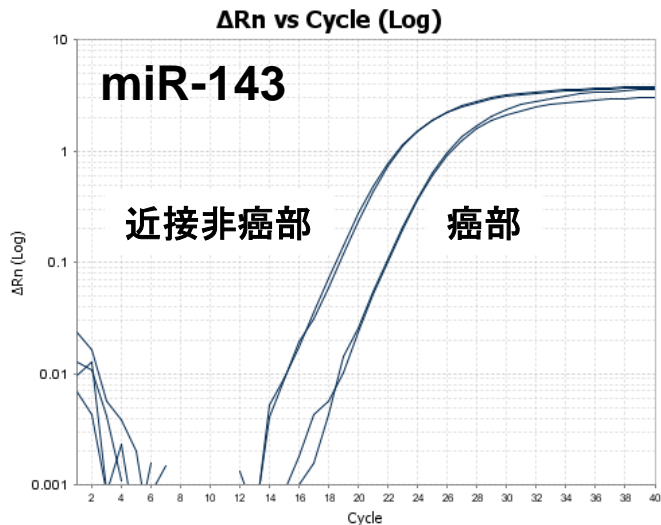
Step2: リアルタイムPCR

Oligo  
Specific forward primer  
Specific reverse primer  
Specific TaqMan<sup>®</sup> probe



# miRNA Assay を用いた実験例

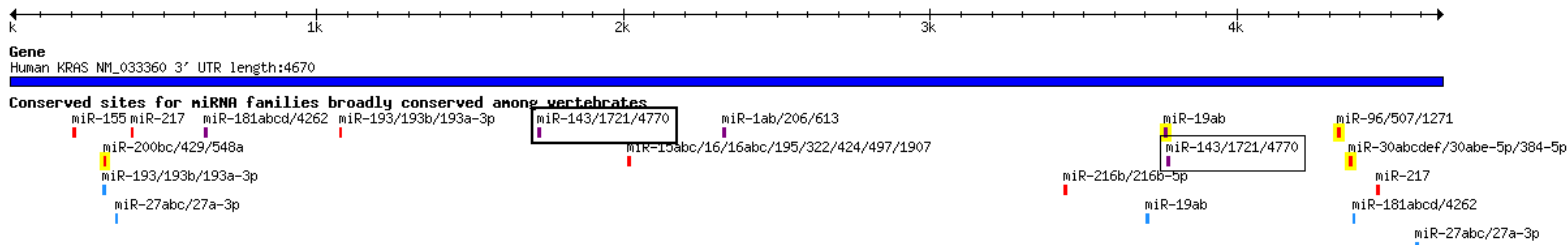
## 大腸癌サンプルを用いた miR-143 の発現



Release 6.1: March 2012

[http://www.targetscan.org/vert\\_61/](http://www.targetscan.org/vert_61/)

### Human KRAS 3' UTR



癌化すると miR-143 が減り、KRAS の翻訳が促進される？

Chen X, et al.

Oncogene. 2009 Mar 12;28(10):1385-92.

Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis.

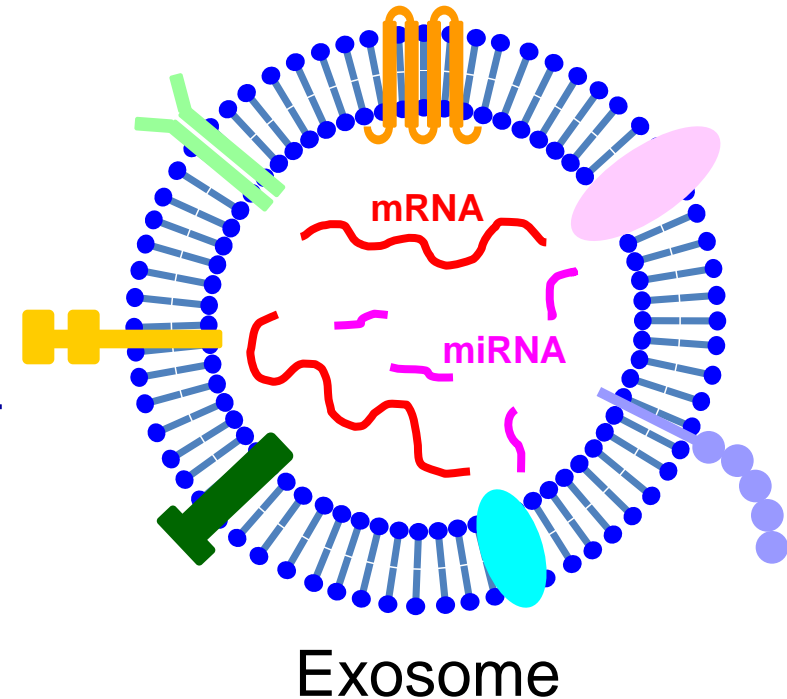
# バイオマーカーとしてのmicroRNA

## ■ 体液中の miRNA の検出

- 血漿中のmiR-141による前立腺がんマーカー
  - > [Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jul 29;105\(30\):10513-8.](#)
- 尿中miR-126 と miR-182 による膀胱がんマーカー
  - > [Urol Oncol. 2010 Nov-Dec;28\(6\):655-61.](#)
- 唾液中miR-125a と miR-200aによる口腔がんマーカー
  - > [Clin Cancer Res. 2009 Sep 1;15\(17\):5473-7.](#)
- 母乳中のmiRNA
  - > [Silence. 2010 Mar 1;1\(1\):7.](#)

## ■ Exosome 関連

- Exosomeを介したmRNA, miRNAの交換
  - > [Nat Cell Biol. 2007 Jun;9\(6\):654-9.](#)
- Exosomeを介したmiRNAの分泌メカニズムについて
  - > [J Biol Chem. 2010 Jun 4;285\(23\):17442-52.](#)

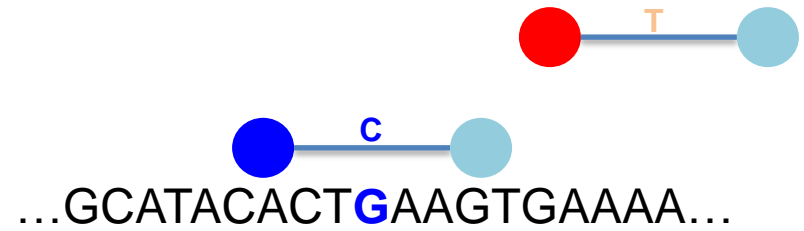
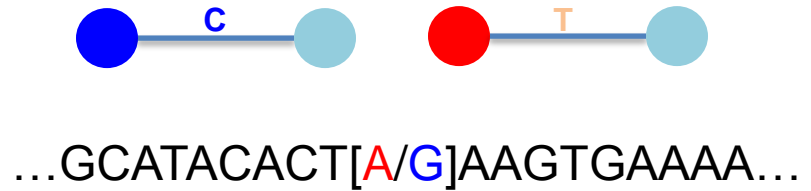
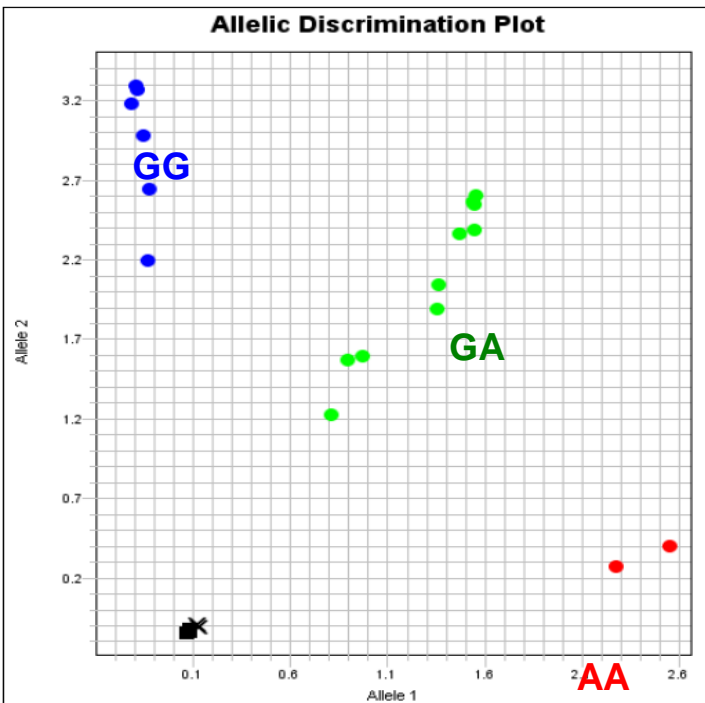


- 直径 30～100nm の細胞顆粒
- 血液、尿、唾液等の体液中に存在
- タンパク質、mRNA、miRNA を内包
- 細胞間を移動する

# TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assay

アルデヒド脱水素酵素  
ALDH2

Allelic Discrimination Plot



SNPは先天的なものなので、それぞれのアレルについて100%か50%か0%になる。

[VIC]



# TaqMan® SNP Genotyping Assay

全血 / FTAカード塗布血液 / 細胞 / 組織 / 口腔細胞  
Rat・Mouse の尾 / 葉 / 種子 / FFPE組織切片

## ■アッセイの種類

- ・総数450万 assay コレクション
- ・cSNP assay: 7万種類
- ・頻度解析済みassay: 16万種類
- ・薬物代謝関連: 約2500
- ・マウス用アッセイ10,000種類以上

1時間で結果が出ます！



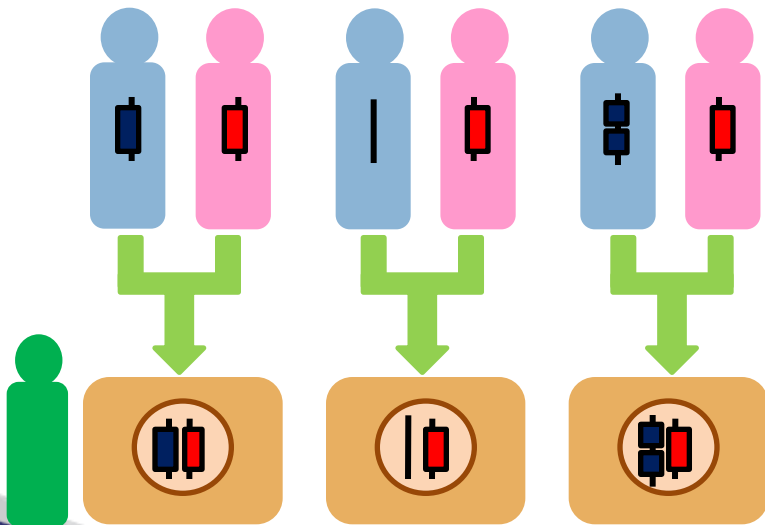
TaqMan® Sample to SNP Kit



# CNV (Copy Number Variation) とは？

- ヒトゲノムの1割以上で数Kbp～数Mbpの長さの大きな領域で多くの変異があることが明らかになり、遺伝子コピー数自体の差が疾患感受性、薬剤感受性などを含めヒトの形質差に広く関与している可能性があることが示された。
  - Global variation in copy number in the human genome

[http://www.lsbm.org/news/2006/pdf/CNV\\_nature.pdf](http://www.lsbm.org/news/2006/pdf/CNV_nature.pdf)



**Database of Genomic Variants**  
A curated catalogue of structural variation in the human genome

Hosted by:  
The Centre for  
Applied  
Genomics

About The Project | Genome Browser | Download | Links | Data Submissions | Email us

Please select genome assembly:

**View Data by Chromosome**  
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 X Y All

**View Data by Genome**

**Keyword Search**  
  
Search  
Exact Match?  Yes  No  
Examples: clone name, accession number, cytoband, gene

**BLAT Search**  
Enter sequence in FASTA format here:  
  
BLAT Search

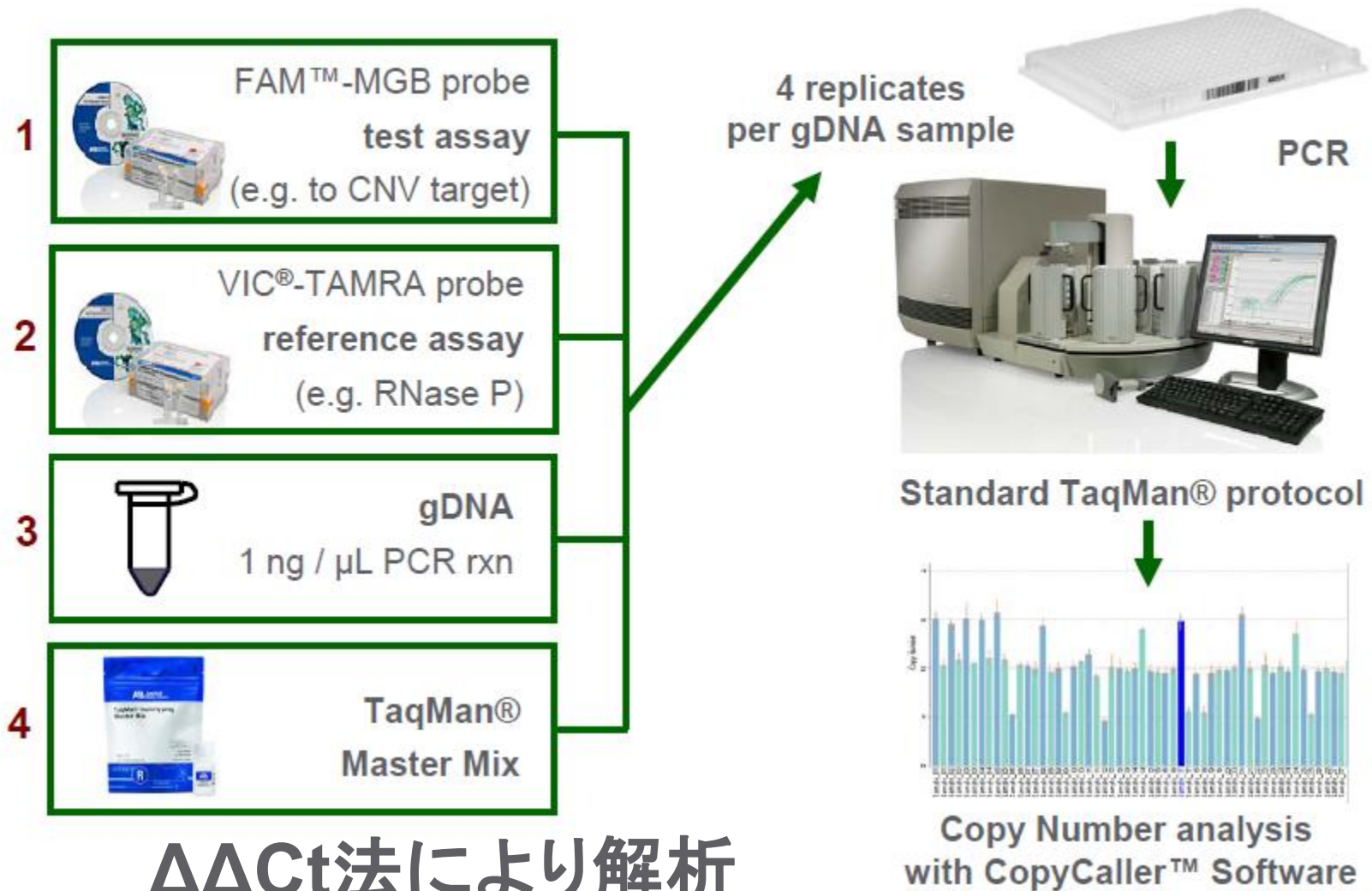
**Summary Statistics**  
Total entries: 31615 (hg18)  
CNVs: 19792  
Inversions: 487  
InDels (100bp-1Kb): 11336  
Total CNV loci: 6225  
Articles cited: 28  
Last updated: Nov 10, 2008  
Join our mailing list

<http://projects.tcag.ca/variation/>





# TaqMan® Copy Number Assays Workflow



ΔΔCt法により解析



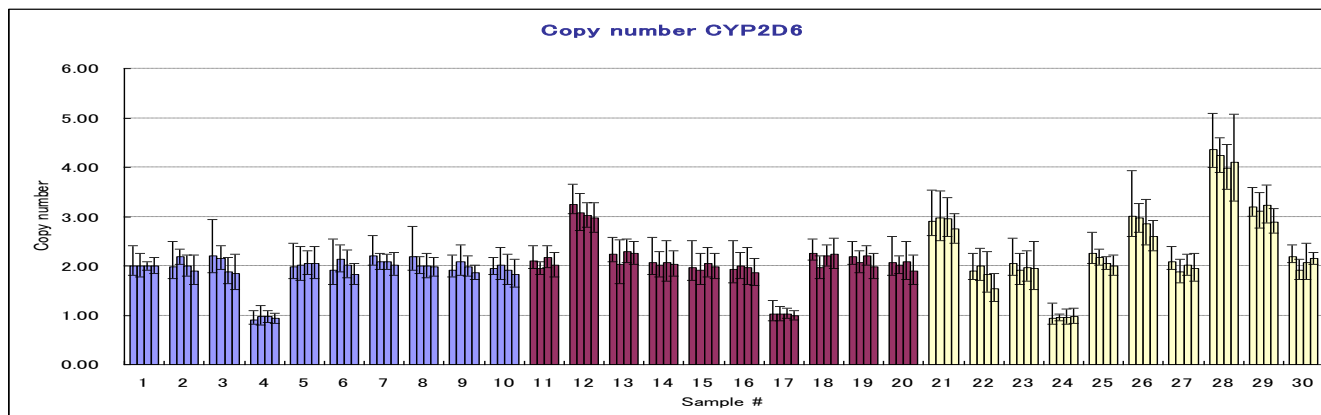
# ΔΔC<sub>T</sub>法によるコピー数算出

■ 各サンプルのコピー数 =  $2^{-\Delta\Delta C_T}$

- ΔC<sub>T</sub> = CYP2D6遺伝子のC<sub>T</sub>値 - RNaseP遺伝子のC<sub>T</sub>値

- ΔΔC<sub>T</sub> = 各サンプルのΔC<sub>T</sub>値 - 正常2コピーサンプルのΔC<sub>T</sub>値

| Gene   | Avg ΔCt | SD    | ΔΔCt   | RQ   | Copy # | min  | max  |
|--------|---------|-------|--------|------|--------|------|------|
| CYP2D6 | -0.966  | 0.016 | 0      | 1.00 | 2.00   | 1.92 | 2.09 |
| CYP2D6 | -0.962  | 0.042 | 0.004  | 1.00 | 1.99   | 1.79 | 2.22 |
| CYP2D6 | 0.084   | 0.047 | 1.05   | 0.48 | 0.97   | 0.86 | 1.09 |
| CYP2D6 | -1.005  | 0.046 | -0.038 | 1.03 | 2.05   | 1.82 | 2.31 |
| CYP2D  | -1.086  | 0.04  | -0.12  | 1.09 | 2.17   | 1.96 | 2.41 |
| CYP2D6 | -1.565  | 0.032 | -0.598 | 1.51 | 3.03   | 2.79 | 3.29 |
| CYP2D6 | -0.014  | 0.04  | 0.952  | 0.52 | 1.03   | 0.93 | 1.14 |
| CYP2D6 | -1.106  | 0.039 | -0.139 | 1.10 | 2.20   | 1.99 | 2.43 |



# マウス用 Copy Number Assays

## ■ Reference

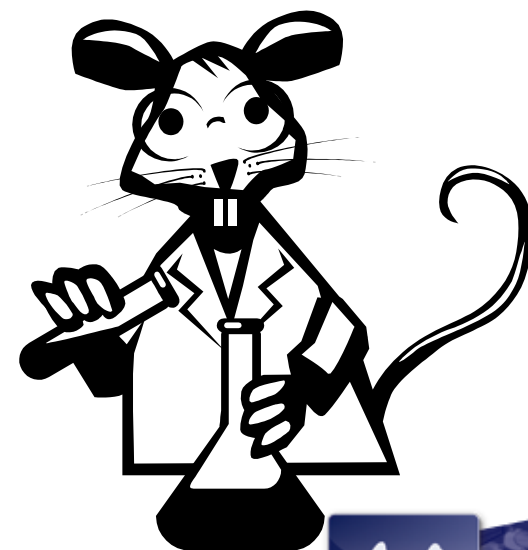
- Tfrc (transferrin receptor)
- Tert (telomerase reverse transcriptase)

## ■ Marker & Reporter

- Enhanced Green fluorescent protein (EGFP)
- Beta-galactosidase (LacZ)
- Ampicillin Resistance (AmpR)
- Hygromycin Resistance (HygR)
- Neomycin Resistance (NeoR)
- Cre recombinase, bacteriophage P1 (Cre)



組み換えマウスの  
確認にもどうぞ！



life

# トラブルシューティング

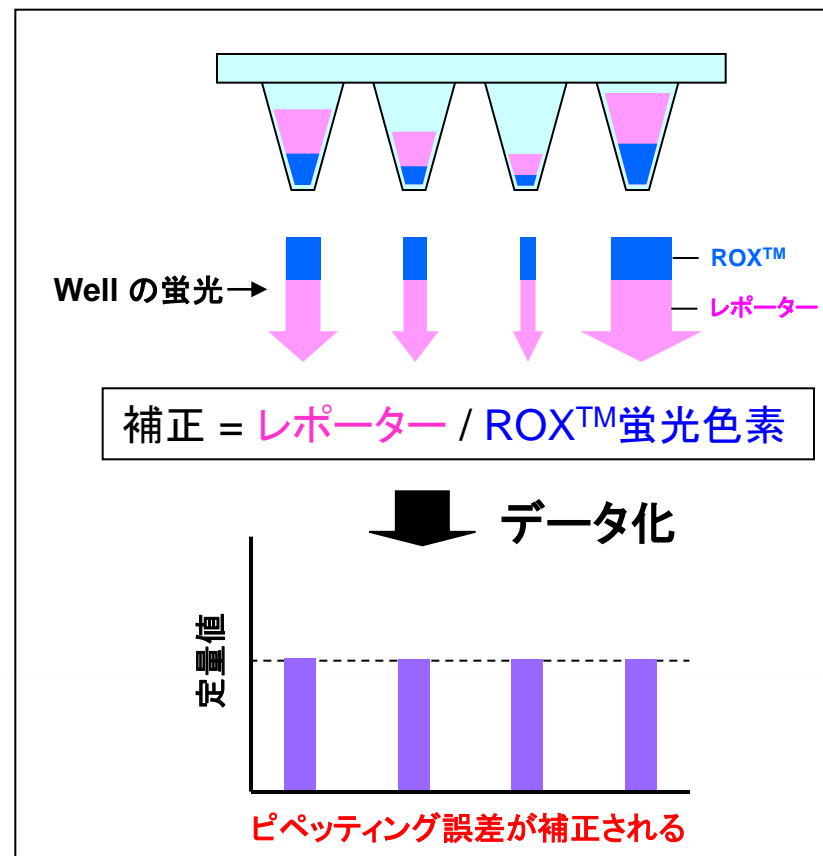
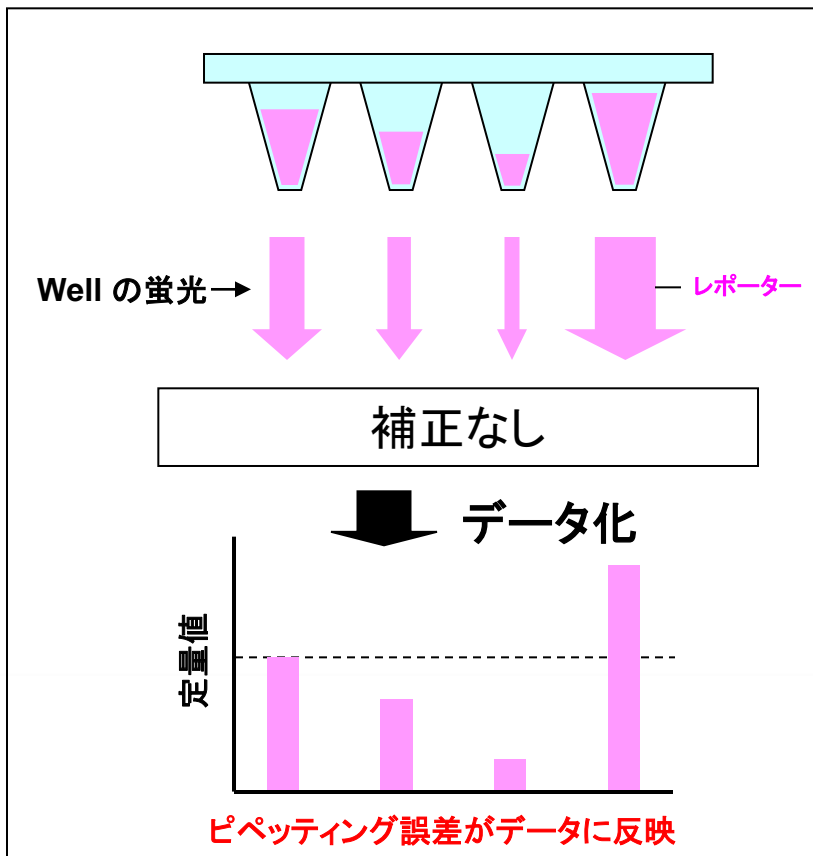


# ROX™ 蛍光色素補正の仕組みについて

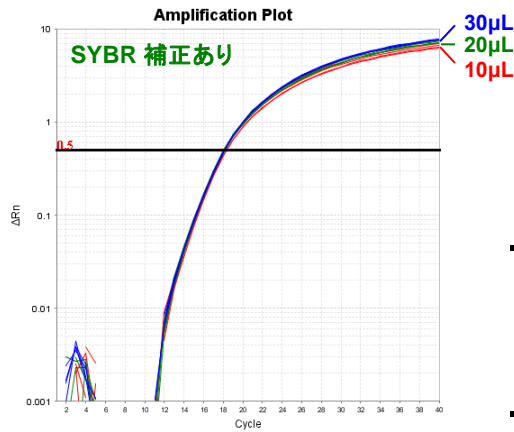
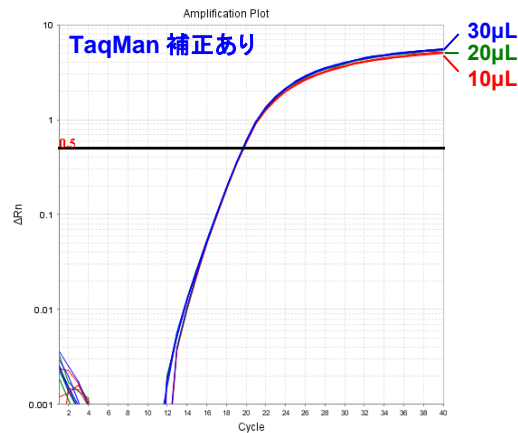
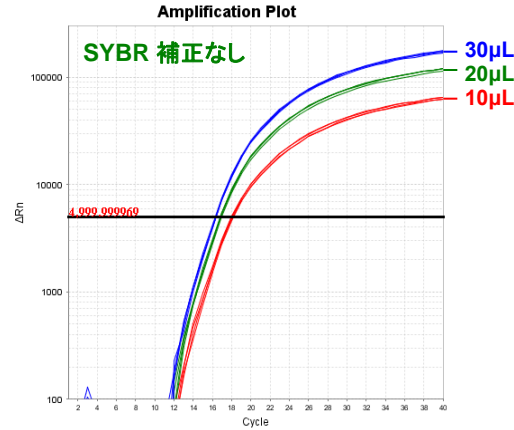
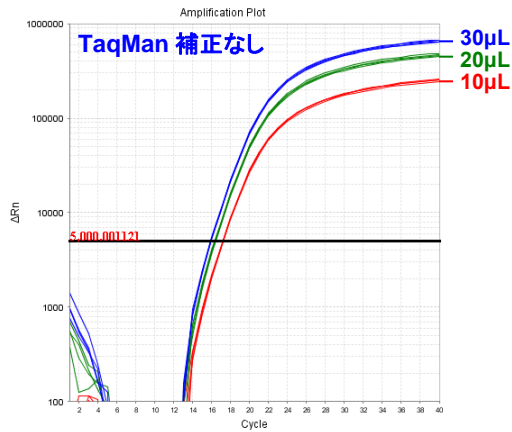
同一サンプルを4 well で測定する際に  
ピペッティング誤差が生じた場合

ROX™ 蛍光色素を含まない反応液

ROX™ 蛍光色素を含む反応液



# ROX™ 蛍光色素補正の実際



| Passive ref. | TaqMan |       | SYBR  |       |
|--------------|--------|-------|-------|-------|
|              | -      | +     | -     | +     |
| Ave          | 16.53  | 19.62 | 17.08 | 18.10 |
| SD           | 0.54   | 0.03  | 0.77  | 0.10  |
| MAX          | 17.24  | 19.69 | 18.15 | 18.29 |
| MIN          | 15.91  | 19.58 | 16.24 | 17.99 |
| MAX-MIN      | 1.33   | 0.11  | 1.90  | 0.31  |

AB のリアルタイム PCR Master Mix には必ず ROX™ 蛍光色素 が含まれています

life

# リアルタイム PCR の分注方法

## ③ Premix

反復分の反応液をまとめて調整後  
別々のウェルに分注

### ① サンプルが先

先にDNA サンプルを分注し  
その後にそれ以外の反応液を分注



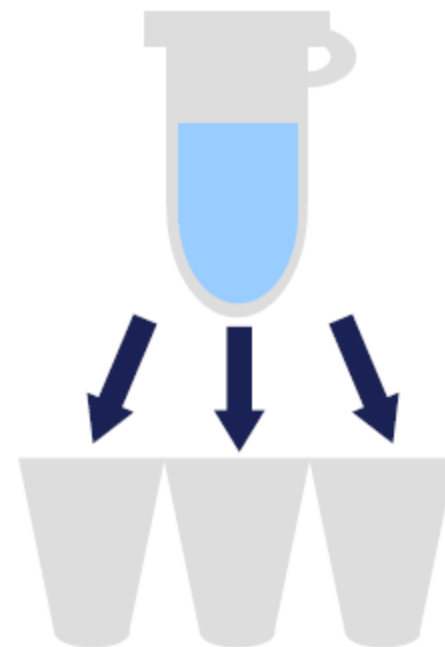
少ない

### ② サンプルが後

先にDNA以外の反応液を分注し  
DNAを後から分注



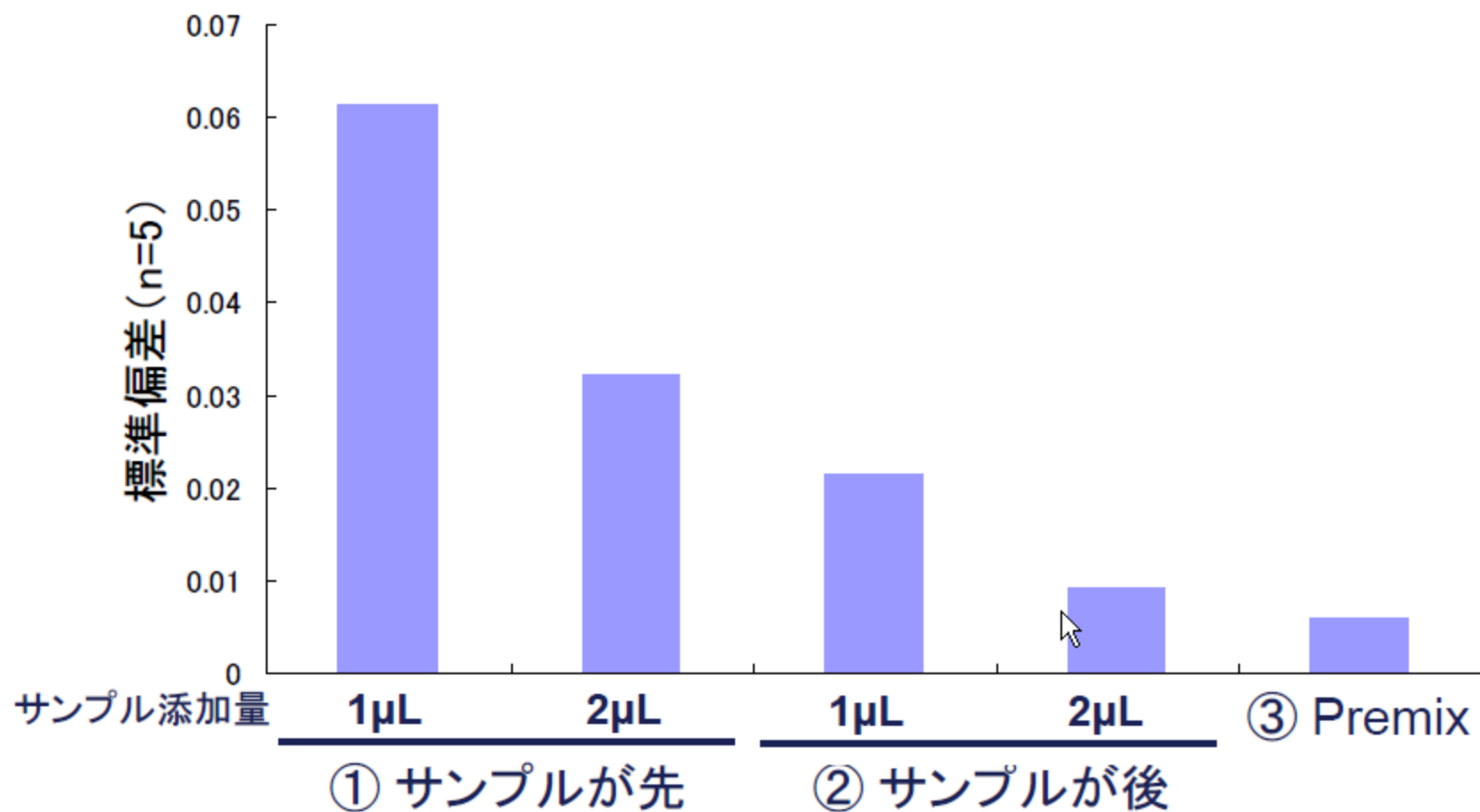
多い



プラスチック消耗品の使用量

life

## 分注方法によるデータのばらつき





# 分注方法による推奨実験方法

## ① サンプルが先

- 5 倍以上の差を見るような、精度の低い実験
- SNP typing や +/- assay など、定性的な実験

## ② サンプルが後

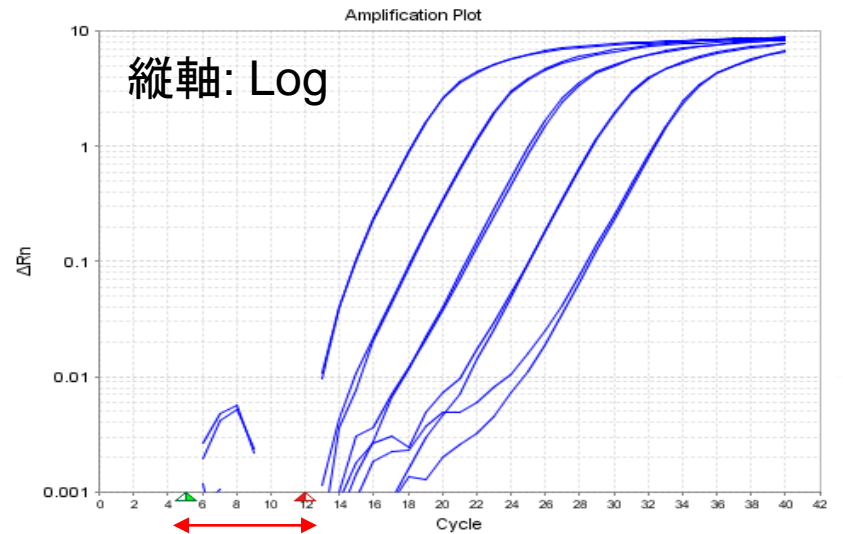
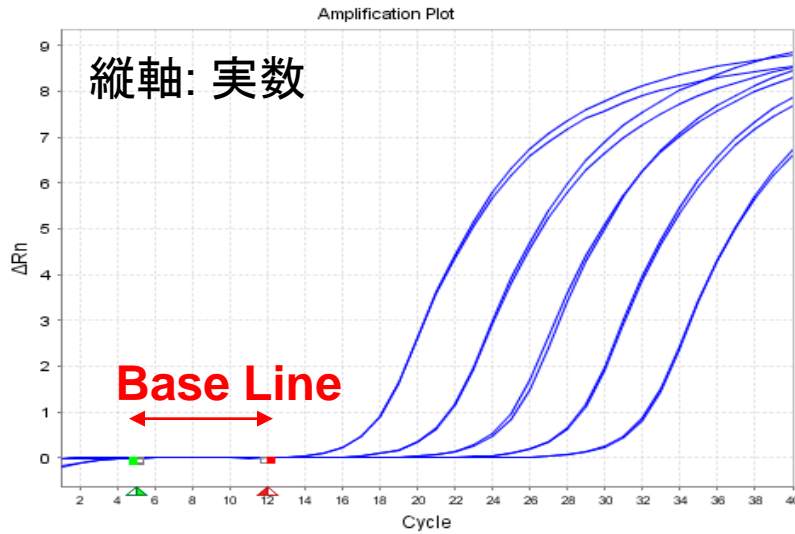
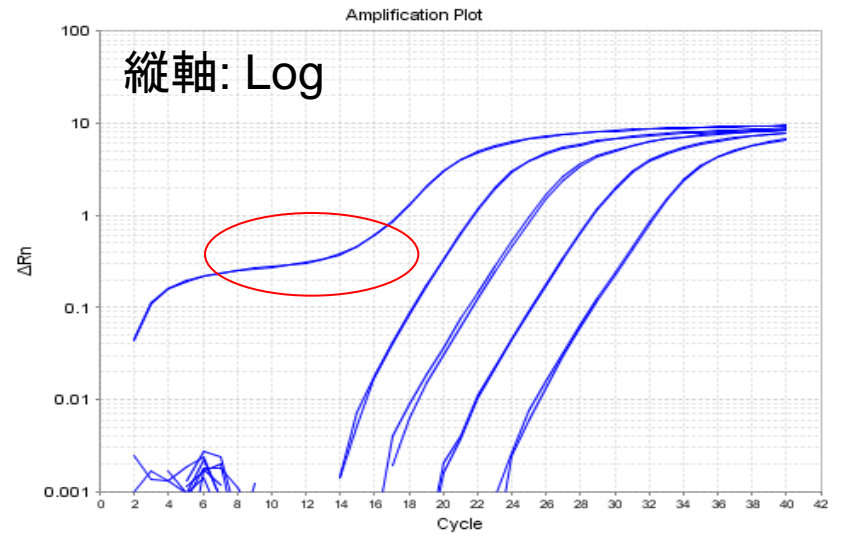
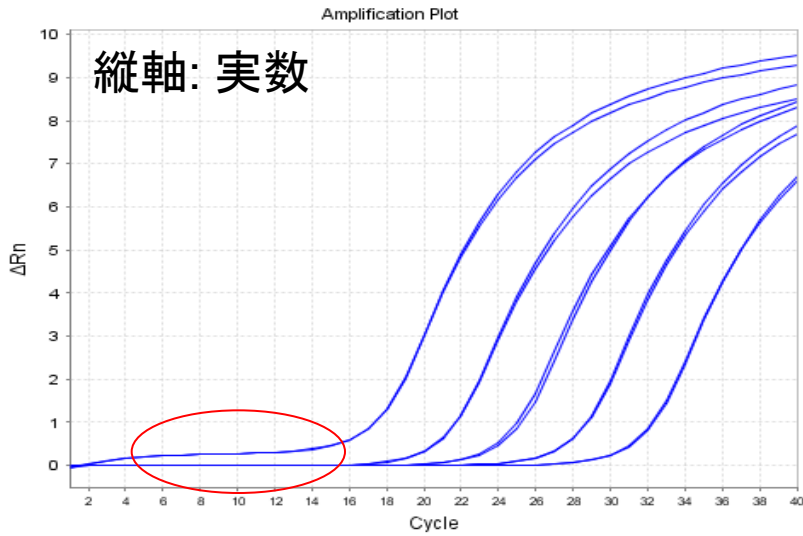
- サンプル数が多い(10 サンプル以上)
- 3 倍以上の差を見るような、高い精度が必要無い場合

## ③ Premix

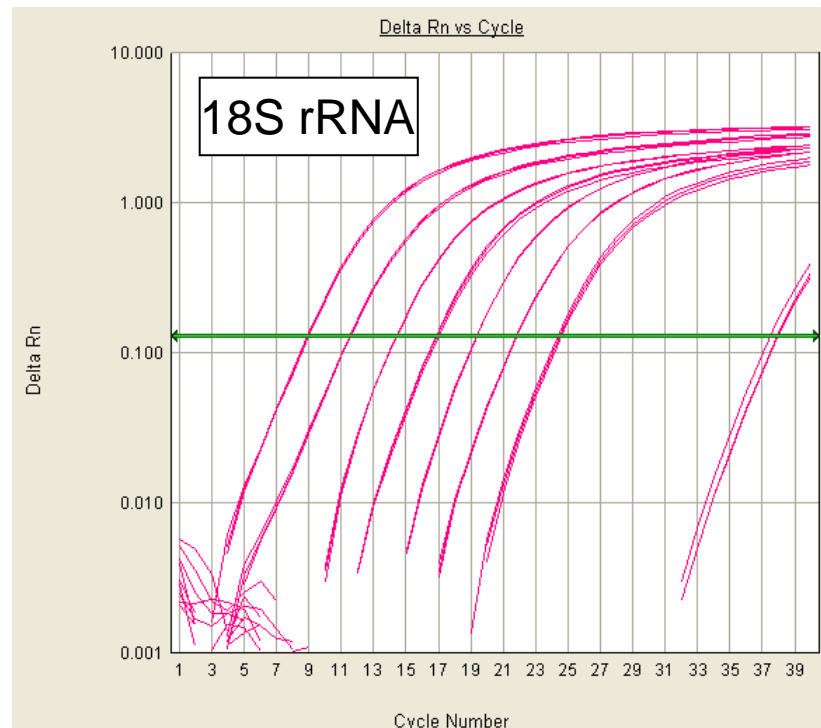
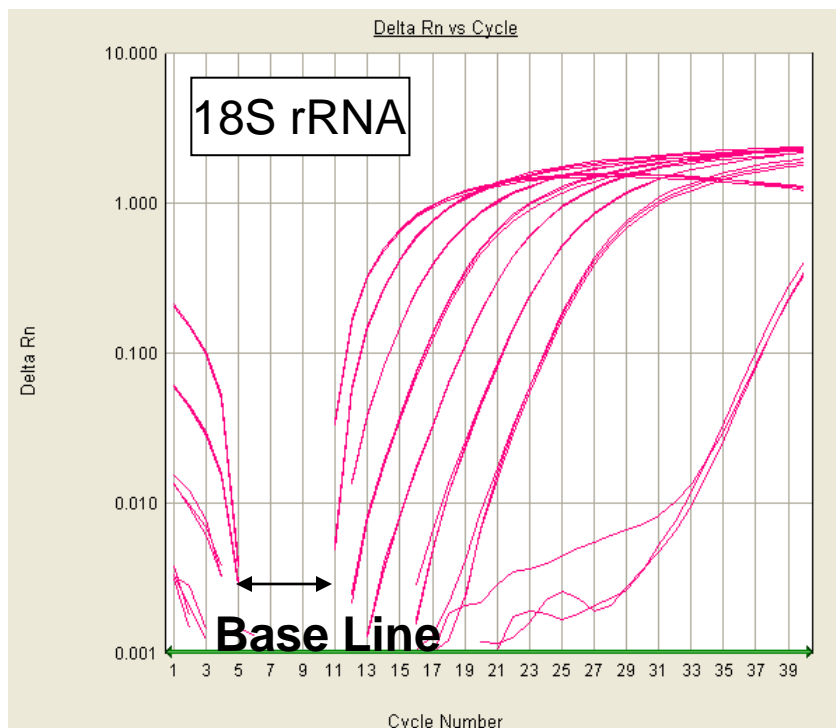
- サンプルが少ない(10 サンプル以内)
- 3 倍以内の差をみるような精度の高い実験

# 二段で増幅する

ベースライン補正が上手く行っていない例



# 高発現遺伝子のベースライン補正

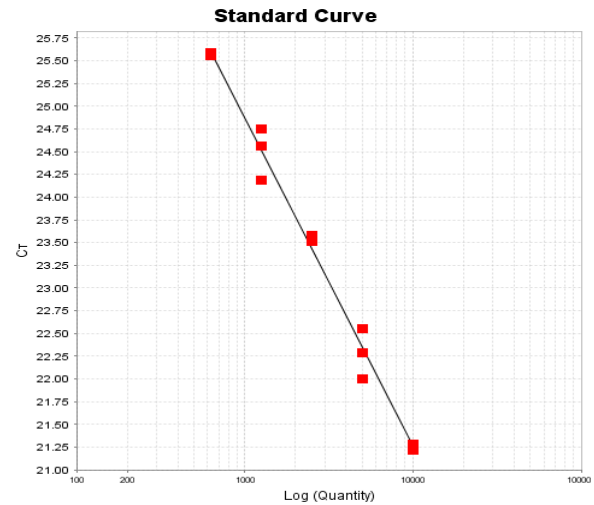
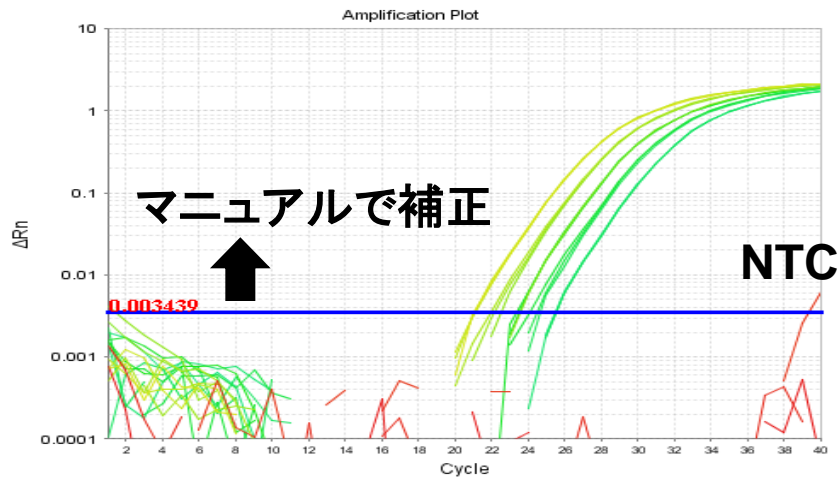


ベースラインが増幅曲線と被っている

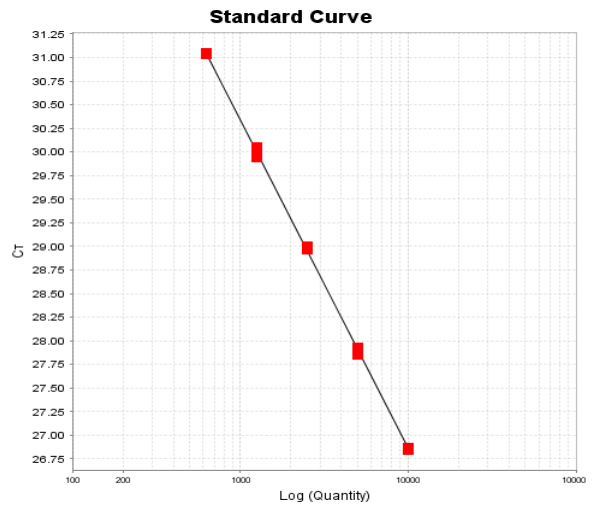
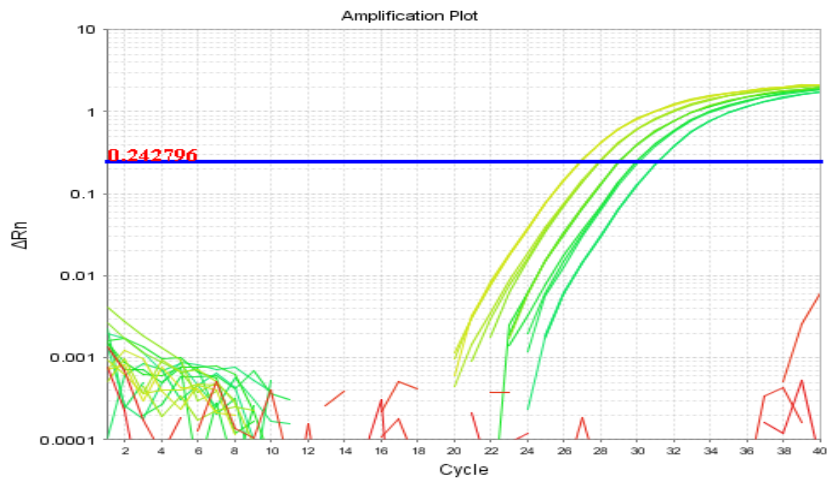
マニュアルでベースライン補正後



# Threshold Line が低すぎる



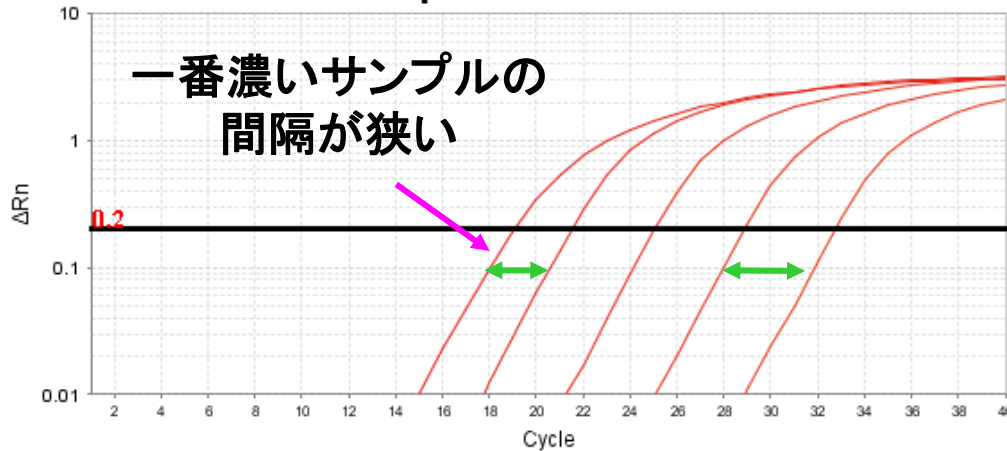
Target: RNase P Slope: -3.604 Y-Inter: 35.675  $r^2$ : 0.989 Eff%: 89.449



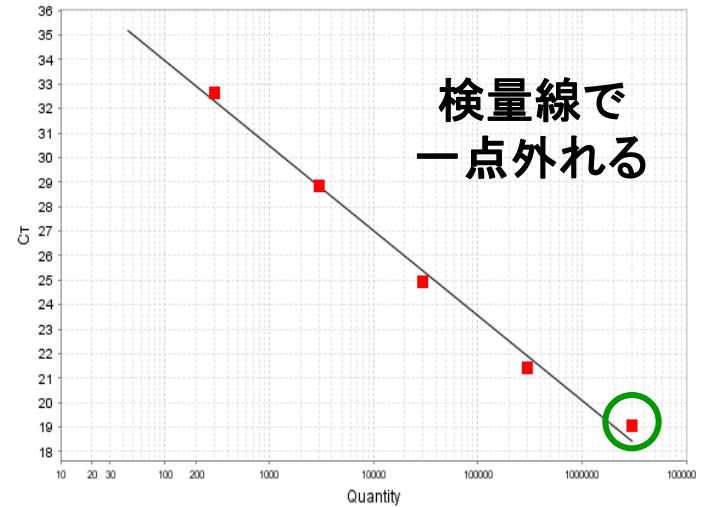
Target: RNase P Slope: -3.477 Y-Inter: 40.768  $r^2$ : 0.999 Eff%: 93.912

# 障害物の影響

Amplification Plot



Standard Curve



## ■ 障害を引き起こす原因

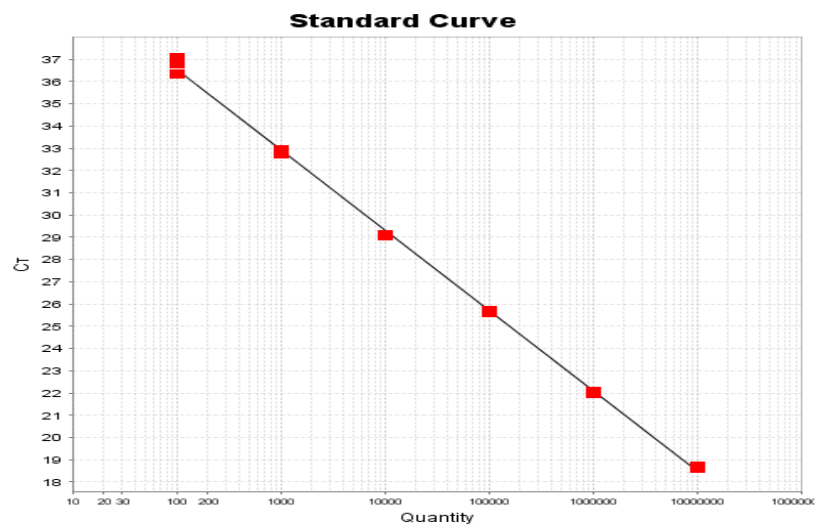
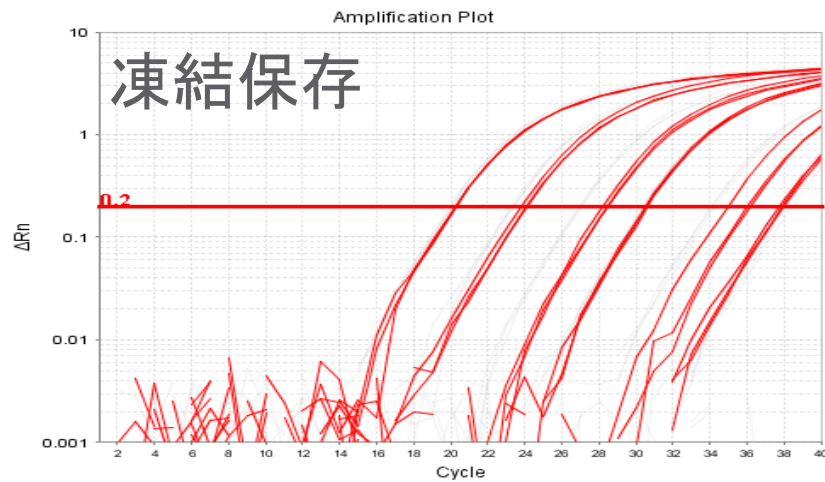
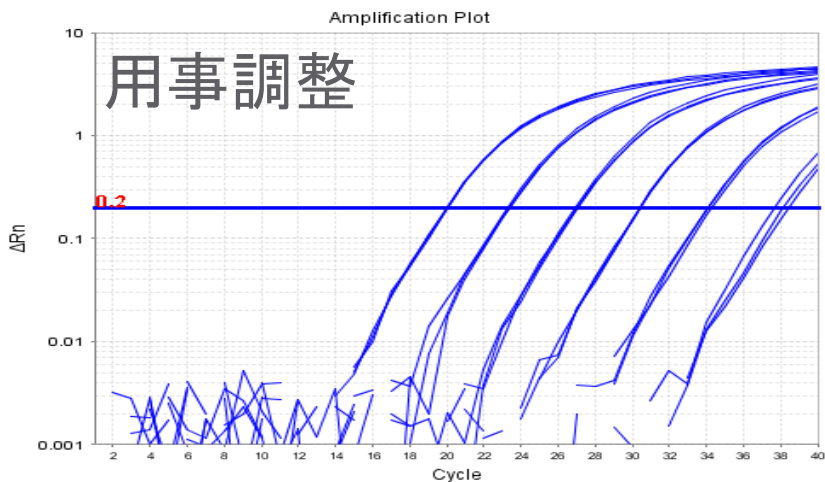
- 塩、多糖類、有機溶媒...など

## ■ 解決方法

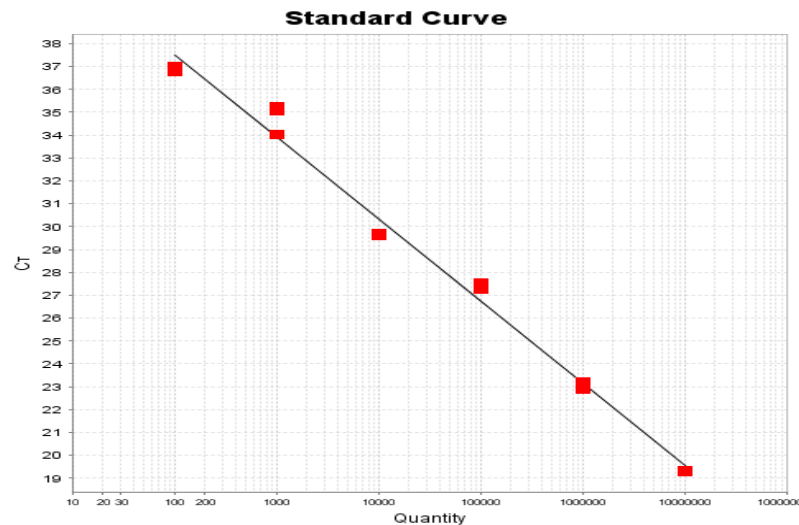
- サンプルを 1/10~1/100 に希釈して実験をする
- cDNA はリアルタイムPCRの反応ボリュームの1/5程度にする
- サンプルの精製を行う

# 検量線の再現性が悪い

## 検量線サンプルを凍結保存しない



Target: Fresh Slope: -3.608 Y-Inter: 43.725  $r^2$ : 0.999 Eff%: 89.322

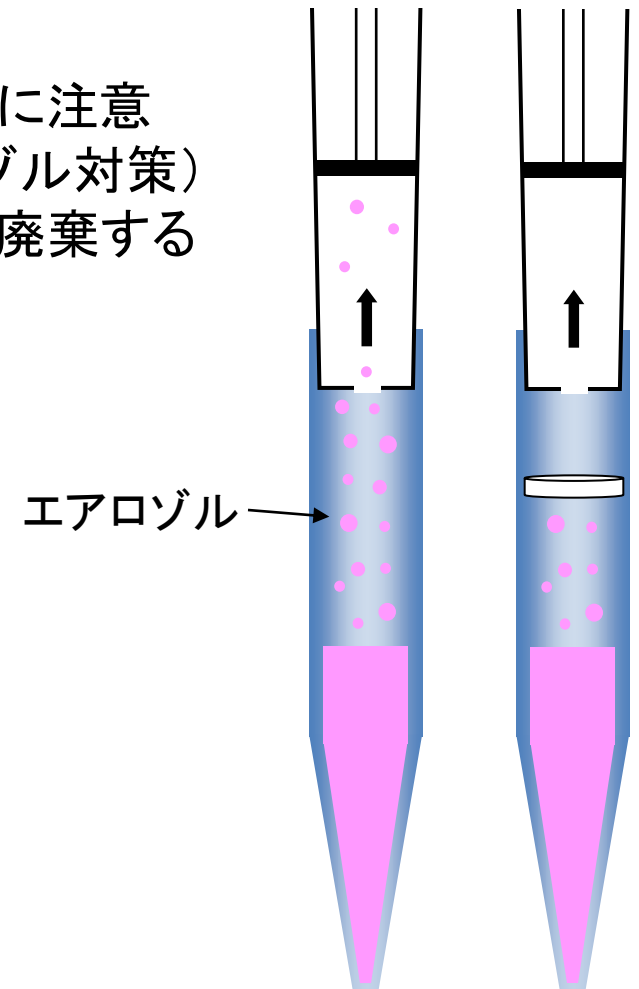
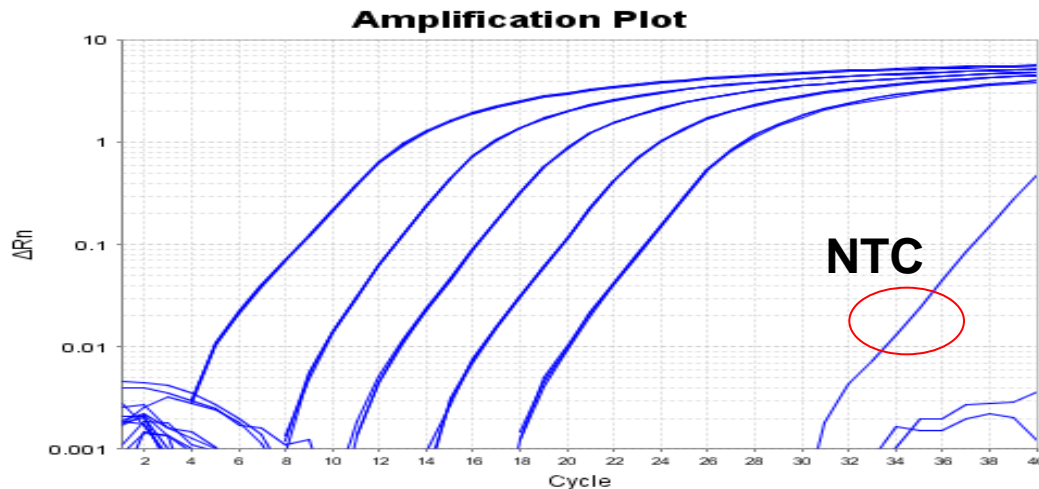


Target: Frozen Slope: -3.582 Y-Inter: 44.651  $r^2$ : 0.989 Eff%: 90.174

# TaqMan<sup>®</sup> Assay で NTC が増える コンタミネーション？

- 絶対定量の検量線に用いる高濃度 DNA の扱いに注意
- できるだけフィルター付きチップを用いる(エアロゾル対策)
- リアルタイム PCR 反応容器は蓋を開封しないで廃棄する
- 試薬類を小分けにして使う

**コンタミネーションは高頻度で起きます！！  
油断しないこと！！**



The QuantStudio™ 3D Digital PCR System is For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.  
研究用のみ使用できます。診断目的およびその手続き上での使用はできません。

© 2013 Life Technologies Corporation. All rights reserved.

The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s)  
or their respective owners.

