

## 研究機器等紹介

## ドロップレットデジタル PCR

(ddPCR, 正式名称: QX200 AutoDG Droplet Digital PCR システム)

バイオ・ラッド社

バイオ・ラッド社ドロップレットデジタル PCR (ddPCR, 正式名称: QX200 AutoDG Droplet Digital PCR システム) は、平成 31 年 2 月に日高キャンパスゲノム医学研究センター棟 6 階 607 実験室に設置されました (図 1)。ddPCR は次世代型の定量 PCR ともいべき装置で、低発現域での遺伝子発現定量、微小なコピー数定量・変異解析などにおいて僅かな差異を検出し、優れた解析能力を発揮します。従来法の定量 PCR では、解析対象とする核酸配列を一定量にまで増幅するのに必要な PCR サイクルの回数 (Ct 値) をサンプル間で比較することにより、元々のサンプル間における対象核酸配列の存在量比を算出するという原理に基づいています。これに対してデジタル PCR では、解析対象の核酸配列をほぼ 1 分子ごとに微小空間に分配してそれぞれエンドポイント (40 サイクル) まで PCR を行い、PCR 増幅がかかった“微小空間の個数”をサンプル間で比較することによって、元々の対象核酸配列の量をサンプル間で比較します。

バイオ・ラッド社の ddPCR では、おもに 3 つのステップで実験を行います。まず、核酸分子を 1 分子ごとに仕切る微小空間をオイル滴によって作り出します。無数の微小なオイル滴 1 個ずつの中に、低濃度にした対象核酸配列を分配して、PCR マスターミックスと一緒に閉じ込めます (ステップ 1: ドロップレット作製)。オイル滴によっては対象核酸配列が 1 分子も含まないものがあったり、対象核酸配列を 1 分子または 2、3 分子含むオイル滴が存在する、という状況を作ります。これらの無数のオイル滴について、一つのチューブの中でそれぞれエンドポイント (40 サイクル) まで PCR を行います (ステップ 2: エンドポイント PCR)。そうすると、対象核酸配列を含んでいたオイル滴では対象核酸配列が PCR

により十分に増幅されます。一方で対象核酸配列が含まれていなかったオイル滴では PCR 増幅が起こらないという状態になります。この状態の約 2 万個のオイル滴を 1 個ずつ高速で流し、蛍光測定により PCR 増幅がかかったオイル滴 (PCR 陽性ドロップレット) と PCR がかからなかったオイル滴 (PCR 陰性ドロップレット) の個数をカウントします (ステップ 3: PCR 陽性・陰性ドロップレットの定量)。PCR 増幅がかかったオイル滴の絶対的な個数をサンプル間で比較することにより、サンプル間での対象核酸配列の量を高精度に比較することができます。当部門の ddPCR システムでは、自動分注機を内蔵した QX200 AutoDG というドロップレット作製装置が設置されております。このシステムでは、視覚的にも分かりやすい簡単な操作により、一度に最大 96 サンプルまで自動で処理することができ、数十分でドロップレットを作製することができます。作製されたドロップレットが入った 96 ウェルプレートを手早くサーマルサイクラ (サーモフィッシュャーサイエンティフィック社 Veriti) に乗せ、40 サイクルまでのエンドポイント PCR をかけます。この PCR では温度変化のスピードを遅くする必要があるので、約 3 時間程度の時間がかかりますが、PCR 後は 4℃のままオーバーナイトで置くことも可能であるといわれています。PCR 後のオイル滴が入った 96 ウェルプレートを専用のリーダーに乗せ、1 ウェルごとに約 2 万個のオイル滴を 1 個ずつ流し、PCR 陽性ドロップレットと陰性ドロップレットの個数をカウントします。測定時間としては 1 ウェルあたり 2 分程度かかります。得られたデータは専用の解析ソフトウェアを用いて解析が行われ、グラフ表示を含む測定結果が得られます。このリーダー装置では、ウェルごとに 2 種類の色素を同時に定量することができます。このため、発現定量解析では 2 種類の遺伝子発現量の同時定量を、変異解析では体細胞変異における野生型と変異型の比率の解析などを行うことができます。PCR 産物を検出する方法は従来法の定量 PCR とほぼ同様で、蛍光プローブを使う方法と、2 本鎖 DNA インターカレーターである EvaGreen を使う方法の 2 通りが用意されています。プライマーとプローブは従来法の定量 PCR で用いていたものを使うことができますといわれていますが、バイオ・ラッド社のウェブページ上で ddPCR に最適な専用のプライマープローブセットを選択して購入することもできます。ddPCR のアプリケーションとしては、発現解析やコピー数変異解析、SNP 解析、CNV 解析などの他、マイクロ RNA



図 1 QX200 AutoDG Droplet Digital PCR システム (設置場所: 中央研究施設・日高ランチ機能部門 607 実験室)。

発現解析やウイルスの力価測定、次世代シーケンサーやマイクロアレイのライブラリ調整時の品質調査など、サンプル間での対象核酸配列の定量を高い精度で行うことを必要とする様々な目的に用いることができるといわれています。

ddPCRの当施設での使用例として、ミトコンドリアDNAに存在する特定変異に着目したヘテロプラスミー率を測定したデモ実験をご紹介します。ある種のミトコンドリア病ではミトコンドリアDNA中の特定部位のAがGに変異している割合が高いことが知られています。この変異の割合を定量するための測定系の確立を試みるために、野生型と変異型のDNA配列をベクターにクローニングし、1) 野生型 100%、2) 野生型：変異型=50%：50%、3) 変異型 100%という3つのサンプルを調整しました。アニーリング温度をいくつか振ってエンドポイントPCRを行い、ddPCRのリーダーで定量したところ、アニーリング温度50℃-55℃の範囲で、野生型と変異型の割合を良好に判別することができました(図2)。

ddPCRの実験において気をつけるべき点として、まず、サンプル測定時にはPCR陽性ドロップレットと陰性ドロップレットの両方についてある程度の個数が検出されるように、元々の対象核酸配列の濃度を十分に希釈する必要性が挙げられます。もし測定した約2万個のオイル滴がほぼ全てPCR陽性ドロップレットとして検出されてしまうと、検出上限を超えていることになり、サンプル間での元々の核酸対象配列の存在量の比較ができなくなるので、サンプルの希釈率を十分に検討することが必要になります。次に発現量解析の際に

留意する点として、サンプル間での発現変動がないと想定されるハウスキーピング遺伝子を、従来の定量PCRと同様にサンプルごとに内在性コントロールとして定量する必要があるという点が挙げられます。デジタルPCRは1分子単位で解析対象を絶対的に定量しますが、サンプルを調整する工程などで各サンプルの反応系への持ち込み量には必ずブレが生じます。サンプルごとの持ち込み量のブレは、デジタルPCRでもハウスキーピング遺伝子を用いてサンプル間で補正する必要があります。最後に気をつけるべき点として、コストパフォーマンスに留意する必要性が挙げられます。消耗品コストを合計すると、96ウェルプレートの1ウェルあたりに約600円のコストがかかる計算となるので、実施するサンプルの個数が必要以上に多くならないように検討する必要があります。現在、初回利用者の方には当部門で管理している消耗品の一部をお試しで無料でお使いいただけます。

ddPCRシステムを用いて効果的に定量実験を行うことで、低発現域での発現量比較や変異解析、CNV解析などにおいて精度の高い測定ができ、従来法の定量PCRでは検出することのできなかった新たな結果を得ることが可能になると考えられます。当部門の実機についての現場でのご紹介、初回利用時の説明、実際の実験中の説明など、できる限り随時当部門でサポートいたします。ご興味を持たれた方はぜひ当部門へご連絡をお願いいたします。

(文責 中央研究施設 日高ブランチ機能部門 水野 洋介)

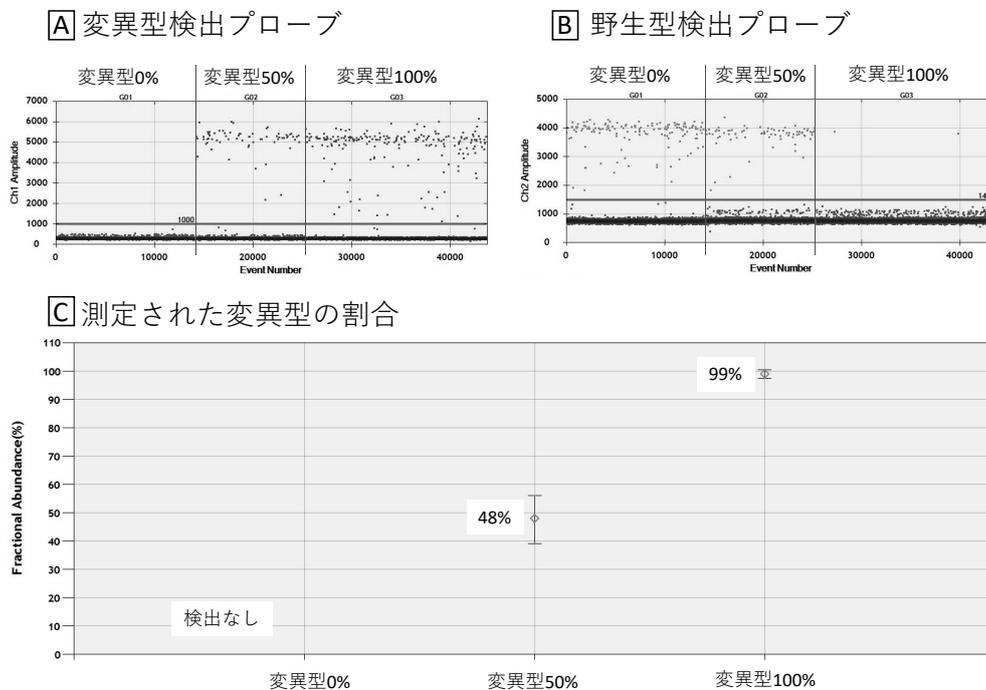


図2 解析結果の一例。ミトコンドリアDNA特定塩基配列の野生型と変異型を検出する2種類のプローブを用意し、野生型100%、野生型：変異型=50%：50%、変異型100%の割合で混合した3つのサンプルを用いてddPCR解析を行った。エンドポイントPCRのアニーリング温度を51.0℃にしたウェルでの結果を示している。A、Bはそれぞれ変異型、野生型の核酸に特異的なプローブにより検出されたオイル滴1個ずつの蛍光強度を示している。蛍光強度が高いPCR陽性ドロップレットの個数の比率を計算することにより、Cの結果が算出された。