

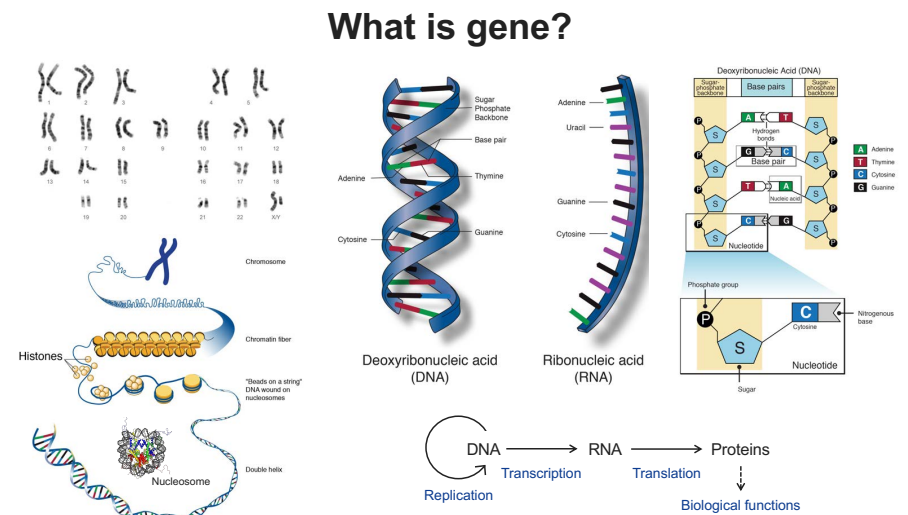
リアルタイムPCR・デジタルPCRを用いた遺伝子発現解析
Gene expression analysis using real-time PCR and digital PCR

大阪大学大学院医学系研究科神経細胞生物学
Dept Neurosci Cell Biol, Grad Sch Med, UOsaka

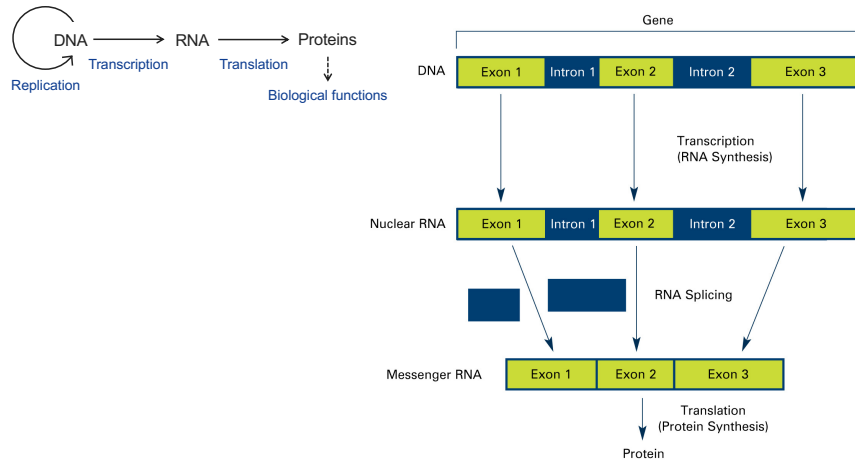
臼井 紀好
Noriyoshi Usui

1. Introduction
2. Real-time PCR (qPCR)
3. Digital PCR (dPCR)
4. Information

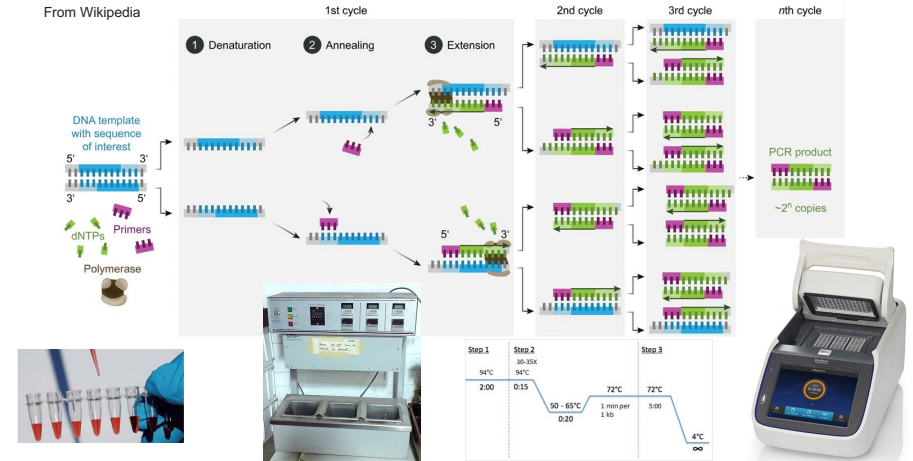
1. Introduction
2. Real-time PCR (qPCR)
3. Digital PCR (dPCR)
4. Information



What is gene?

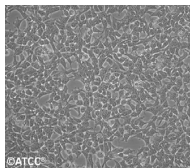


Polymerase chain reaction (PCR)



Comparison of gene expression

Normal vs Abnormal



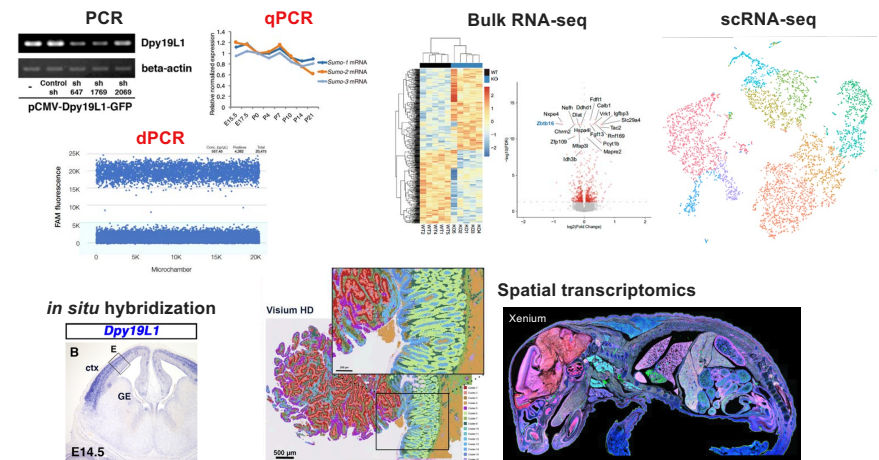
WT vs KO



How difference between control and experimental group?

Morphology
Behavior
Gene expression

Gene expression analyses



1. Introduction

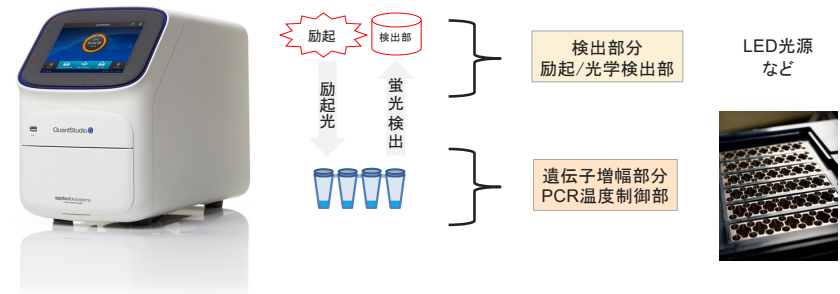
2. Real-time PCR (qPCR)

3. Digital PCR (dPCR)

4. Information

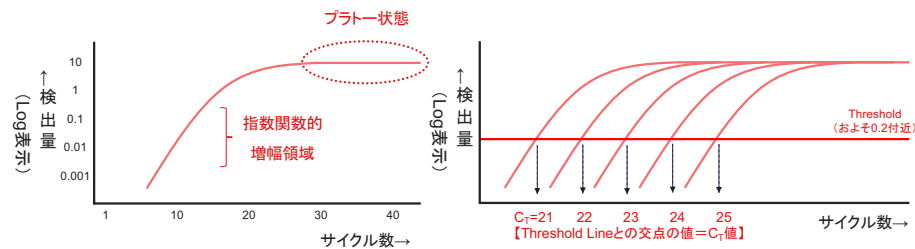
リアルタイムPCR装置の構造

- リアルタイムPCR装置は「遺伝子増幅部」と「光学的検出部」から構成
- PCRによる目的遺伝子領域の増幅に依存した蛍光 (TaqManやSYBR Green) をPCR各サイクルで検出
- 増幅曲線をプロットして、一定の蛍光レベルに達するサイクルを算出



リアルタイムPCRの原理

- PCR増幅産物の検出ではDNAが2倍に増幅する領域は限定されたサイクル数の領域
- 対象遺伝子の増幅を蛍光色素で検出
- サイクルの初期は検出限界以下 & サイクルの後期はプラトー状態
- 指数関数的増幅領域は中間領域のみ



■ プラトーの発生要因 (回避は困難)

- dNTPsやPCRプライマーの枯渇 (プライマー濃度に依存)
- PCR阻害物質の蓄積 など

リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析

実験に必要な一般的な核酸量と所要時間

- 必要なサンプル量 (およその概算回収のイメージ)
 - 遺伝子発現解析 (Total RNA相当量: 10ng/well程度)
 - 培養細胞: HeLa細胞 10^6 細胞数で1-10 μ g程度
 - 組織肝臓の場合1mgから数 μ g程度
 - 血液全血1mLから白血球単離後数 μ g程度
 - SNPなどの一塩基多型遺伝子変異解析
 - ゲノムDNA: 10ng/well程度、髪の毛1本 (毛根付き) や口腔スワブから可能
-
- mRNAの発現解析の所要時間場合
 - 培養細胞からの遺伝子発現解析の事例
 - ① 培養細胞や組織からTotal RNAを回収 (約30分間)
 - ② Total RNAからcDNAへの逆転写反応 (約30分間)
 - ③ リアルタイムPCR実施と解析 (約40分間)

リアルタイムPCRシステム 主なアプリケーション

名称: quantitative reverse transcription PCR, **qPCR**, qRT-PCR, real time PCR

核酸の定量

どれぐらいの量があるのか?

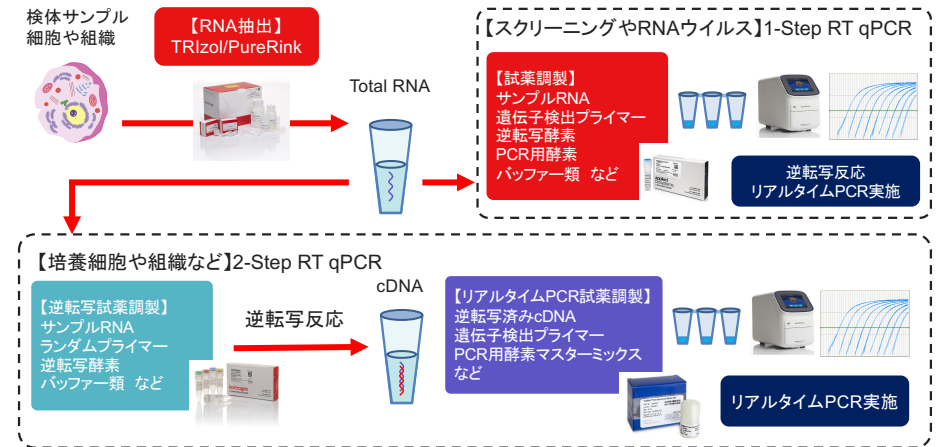
- 絶対定量(絶対量コピー数測定)
 - ウイルス/バクテリアのコピー数
 - 造血器腫瘍やガンなどの融合遺伝子定量
- 相対定量(比較対象との差)
 - 遺伝子(mRNA)の発現変動
 - microRNA発現解析
 - 初期胚発生のステージ
 - 疾病関連遺伝子マーカー解析
 - siRNA抑制効果の確認
 - ゲノムコピー数(CNV: Copy Number Variation)

核酸の定性

どういった性質なのか?

- ゲノムの変異解析
 - 一塩基置換(single nucleotide polymorphism) SNPタイピング
 - 挿入や欠損などの構造変異
- 感染症などの病原微生物の定性的検出
 - 呼吸器感染症や性感染症のパネル解析
 - 同一チューブ内での複数遺伝子の検出

RNA抽出からmRNA遺伝子発現解析:逆転写反応(RT)方法

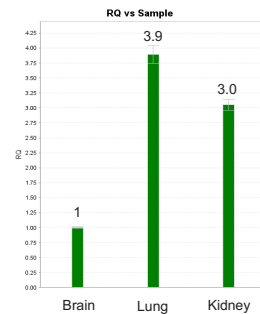


リアルタイムPCRでの定量方法 相対定量法

- 相対定量法【Relative Quantification】
 - 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
 - 1つの特定サンプルを基準として、他のサンプルにおける遺伝子発現を比較

2種類の算出方法(アプローチ)

- 検量線法
 - 解析対象遺伝子と内在性コントロール遺伝子で解析と補正
 - 相対値で希釈系列を作成
 - 検量線PCR効率を補正しながら定量
 - 増幅効率に依存しない
- $\Delta\Delta C_T$ 法(比較 C_T 法、Comparative C_T 法)
 - 検量線を使用せずサイクル数から計算
 - PCR効率を100%として定量
- Reference
 - METHODS 25, 402-408 (2001)
 - Nature Protocols 3, 1101 - 1108 (2008)



検量線を用いた相対定量事例

- 刺激後12時間ごとにおけるIL-6遺伝子の発現レベルを測定
 - 内在性コントロールとしてGAPDH遺伝子でサンプル間補正
 - 検量線に利用するcDNAは36時間のサンプルを2倍(5点)希釈
 - IL-6とGAPDHの各遺伝子プライマーセットで2種類の検量線作成して相対値を算出

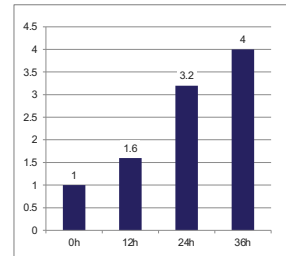
ポイント

- 検量線作成用サンプルの選定
- 希釈倍率の検討
- 内在性コントロール遺伝子の選択

36h cDNA	希釈なし (100%)	1/2 希釈	1/4 希釈	1/8 希釈	1/16 希釈
相対値	16 (100%)	8 (50%)	4 (25%)	2 (12.5%)	1 (6.25%)

時間	IL-6 相対値	GAPDH 相対値	サンプル間補正 (IL6/GAPDH)	0hを基準化
0h	2	8	2/8 = 0.25	0.25/0.25 = 1
12h	4	10	4/10 = 0.4	0.4/0.25 = 1.6
24h	8	10	8/10 = 0.8	0.8/0.25 = 3.2
36h	16	16	16/16 = 1	1/0.25 = 4

刺激0hを基準1とした場合
12時間ごとの発現を相対値で表示



※使用Well数
1遺伝子当たり(n=3測定)
・検量線(5点):15 Well
・サンプル(4種):12 Well
・ネガコン(1点):3 Well
小計:30 Well
↓
2遺伝子解析の場合
合計:60 Well使用

検量線を用いない解析手法: $\Delta\Delta C_T$ 法

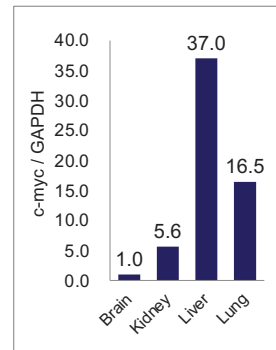
- $\Delta\Delta C_T$ 法の特徴 (Comparative C_T 法、比較 C_T 法)
 - 検量線を作成せずに比較定量する方法
 - 1サイクルの違いで、2倍量の差であるという前提を活用する
 - 検量線作成が不要なので、多サンプルを処理できる

相対比を算出する数式: $2^{-\Delta\Delta C_T}$

- $\Delta\Delta C_T$ 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
- 解析のポイント
 - Calibrator (Reference): 比較の基準「1」とするサンプル
 - Endogenous Control: 事前に有効性を確認した内在性コントロール遺伝子

$\Delta\Delta C_T$ 法に関する参考文献

- 1) METHODS 25, 402-408 (2001),
- 2) Nature Protocols 3, 1101 - 1108 (2008)



Brainサンプルを基準とした
c-myc遺伝子発現比較

リアルタイムPCRアプリケーション

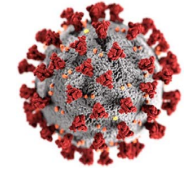
絶対定量法

既知濃度のサンプルを希釈して検量線作成して測定
定量結果はコピー数/μLなどの濃度で算出

例)

- ウイルスなどの病原微生物遺伝子コピー数定量
- 造血器腫瘍におけるMajor BCR-ABL融合遺伝子定量
- 固形腫瘍におけるWT1遺伝子コピー数定量

遺伝子組換え実験レベルダウン時



SARS-CoV-2

リアルタイムPCR 絶対定量法データ例

SARS-CoV-2ウイルス遺伝子検出例

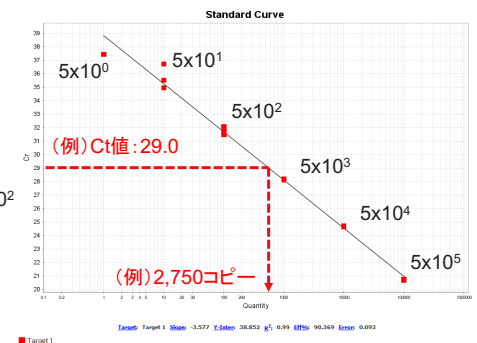
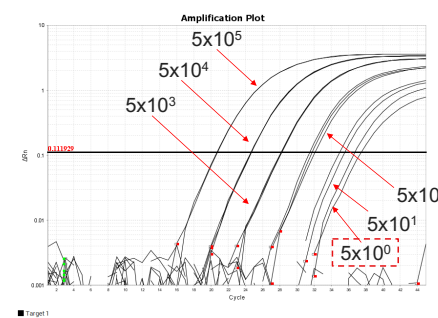
- 感染症研究所ガイドラインに沿った検出
 - SARS-CoV-2ウイルスのN2遺伝子領域を検出
 - 人工合成ウイルスRNA (10⁷コピー/μL) 希釈系列の検出
 - 検出可能な濃度領域を検証 (LoD: Limit of Detection)
- サンプル準備 (例)
 - 人工合成RNAを用いた10倍希釈系列: 6段階
 - ネガティブコントロール: 1点
 - ポジティブコントロール: 1点
 - 測定対象検体サンプル: 4点
 - 合計12種類 36Well測定 (3反復 n=3測定)

番号	検体
#01	ネガコン (Water)
#02	5 x 10 ⁰ コピー/well
#03	5 x 10 ¹ コピー/well
#04	5 x 10 ² コピー/well
#05	5 x 10 ³ コピー/well
#06	5 x 10 ⁴ コピー/well
#07	5 x 10 ⁵ コピー/well
#08	検体番号001
#09	検体番号002
#10	検体番号003
#11	検体番号004
#12	ポジティブコントロール

リアルタイムPCR 絶対定量法データ例

SARS-CoV-2ウイルス遺伝子 (N2領域) 検出例

各サンプル濃度は1Wellあたりのターゲット遺伝子量 (絶対定量)



目的遺伝子の正確な検出を行うための蛍光検出

TaqMan®を利用した検出方法

- ・ 特異性が高く、遺伝子配列認識が高い
- ・ FAMとVIC等の蛍光ラベル可能
- ・ マルチプレックス: 貴重なcDNAを有効に活用

【入手方法】

- ・ 論文などからの配列を参照
- ・ 設計済み TaqMan Gene Expression Assay
- ・ オンラインオーダー
- ・ 条件検討不要で良好な結果
- ・ 良好な増幅効率となるような設計



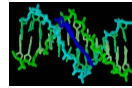
Webで購入

SYBR Greenを利用した検出方法

- ・ 条件検討がスムーズにできれば比較的安価
- ・ 特異性の高いプライマーの選択が必須
- ・ 実験の条件検討に注意が必要
- ・ 非特異的な増幅の回避&解離曲線が必須

【入手方法】

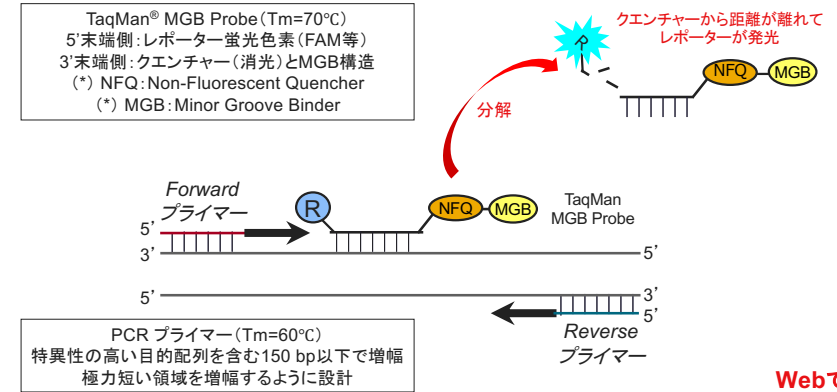
- ・ 論文などからの配列を参照
- ・ 設計時にはデータベースなどの活用が必須
- ・ 検量線の作成による増幅効率の確認
- ・ 増幅効率の確認 (特に $\Delta\Delta C_t$ 法使用時)



自分で設計

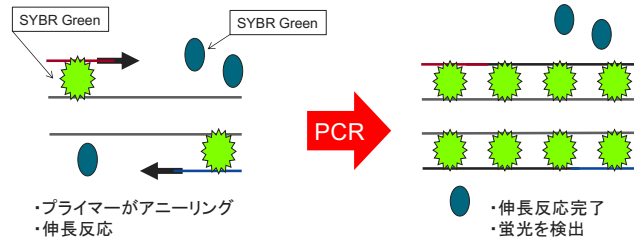
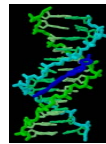
TaqMan® Probeとプライマーの設計

目的の配列を含む特異性の高い領域でプライマー設計



SYBR Greenアッセイの特徴

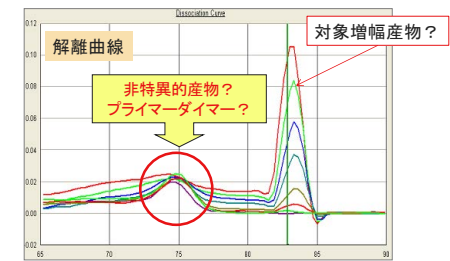
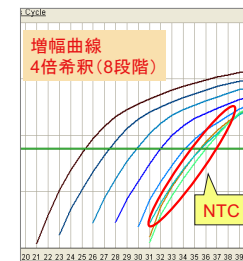
- ・ 二本鎖DNAにインターカレートして蛍光発光する分子
- ・ 青色など短波長の励起光を受けて、緑色蛍光を発する
- ・ プライマー配列と反応濃度に注意
- ・ プライマーダイマーは二本鎖DNA: 蛍光検出されノイズとなる
- ・ 解離曲線による非特異的産物の確認が必須



自分で設計

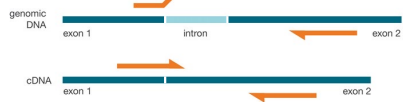
SYBR Greenアッセイにおけるプライマーダイマー確認

- ・ SYBR Greenを用いた実験では解離曲線とNTCの設定が必須
- ・ 非特異的産物生成の確認 (Melt Curve, Dissociation Curve)
- ・ NTC: No Template Control, Negative Control (cDNAの代わりにWaterを添加)での確認
- ・ NTCサンプルから増幅があると、各サンプルにおいて非特異的産物の影響あり
- ・ 定量性に非常に大きな疑問が発生→プライマー濃度変更 (例: 500nM→200nM)、プライマー再設計の実施

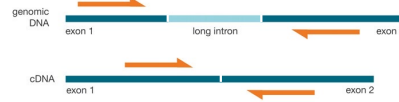


Primer design

1. Primer spans an exon-intron boundary



2. Primer flank an intron



Primer3web v3.0.4.0 - Pick primers from a DNA sequence.

NIH National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information

UCSC Genome Browser Human (GRCh38/hg38)

TM: 60
Product size: 50-250 bp
Check the specificity

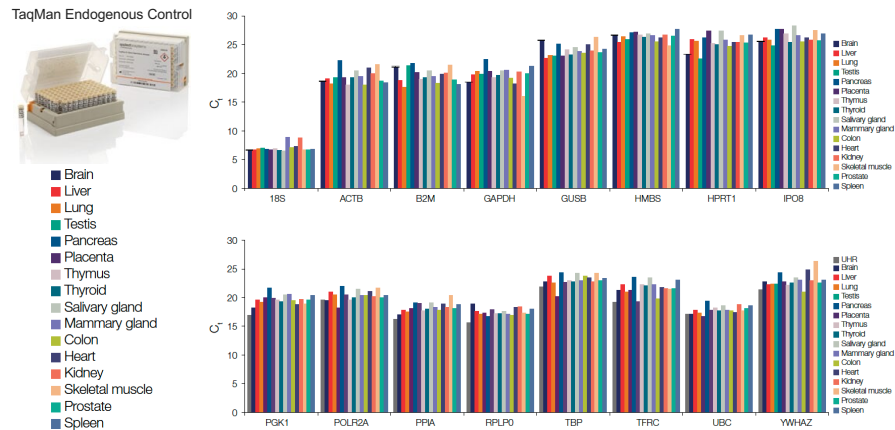
Housekeeping genes (reference genes)

Table 1. TaqMan Gene Expression Assays featured in this study.

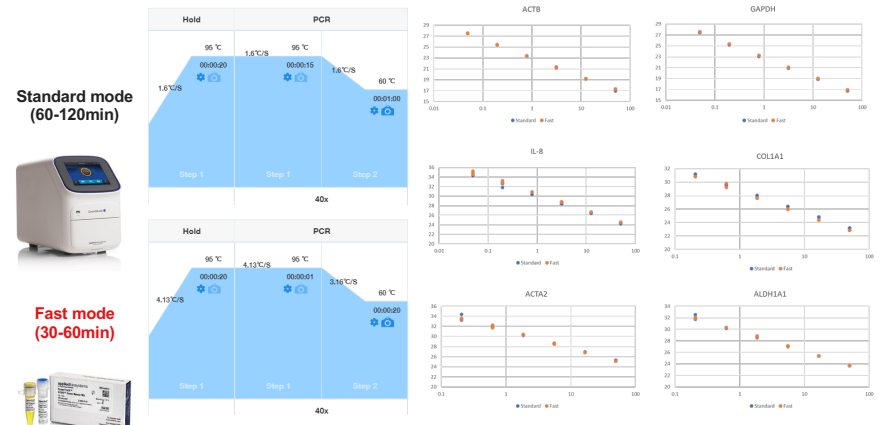
Gene ID	Gene name	Accession number	Assay ID
RPLP0	Ribosomal protein lateral stalk subunit P0	NM_001002	Hs99999902_m1
ACTB	Actin, beta = β -actin	NM_001101	Hs99999903_m1
PPIA	Peptidylpropyl isomerase A	NM_021130	Hs99999904_m1
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	NM_000291	Hs99999906_m1
B2M	Beta-2-microglobulin	NM_004048	Hs99999907_m1
GUSB	Glucuronidase, beta	NM_000181	Hs99999908_m1
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	NM_000194	Hs99999909_m1
TBP	TATA box-binding protein	M34960	Hs99999910_m1
18S	Eukaryotic 18S ribosomal RNA	X03205	Hs99999901_s1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_002046	Hs99999905_m1
TFRC	Transferrin receptor	NM_003234	Hs99999911_m1
IPO8*	Importin 8	NM_006390	Hs00183533_m1
POLR2A*	Polymerase (RNA) II (DNA-directed) polypeptide A	NM_000937	Hs00172187_m1
UBC*	Ubiquitin C	NM_021009	Hs00824723_m1
YWHAZ*	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta	NM_003406	Hs00237047_m1
HMBS*	Hydroxymethylbilane synthase	NM_000190	Hs00609297_m1

*For this study, these assays were run only on the TaqMan Array Human Endogenous Control Panel.

Housekeeping genes (reference genes)



Save the time using Fast mode



【やってみた】リアルタイムPCR ランモードで結果に差がでるか比較してみた
https://www.thermofisher.com/blog/learning-at-the-bench/qpcr_workshop_gsd_ts_3/

1. Introduction

2. Real-time PCR (qPCR)

3. Digital PCR (dPCR)

4. Information

Applied Biosystems™ QuantStudio™ Absolute Q™ デジタルPCRシステム

サンプル溶液のほとんどを反応系に添加可能でサンプルロスが少ないデジタルPCR装置

- Easy (簡便な操作性)
 - 試薬調製とハンズオンタイムが約5分
- Fast (迅速な結果)
 - ラン時間が約90分
- Availability (有効な結果)
 - デッドボリュームが5%以下
- Reproducibility (再現性の高い結果)
 - 20,480個のマイクロチャンバーを一貫して解析
- Multiple (多検体対応)
 - 同時に4、8、12、16 サンプルをラン可能
- Four Dye (多色検出)
 - 4色蛍光による4種類の対象遺伝子検出



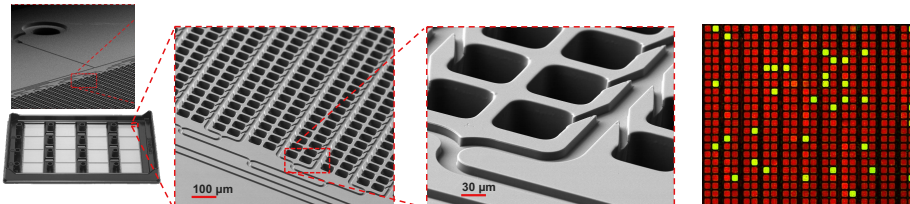
QuantStudio MAP16 プレートを使用してランします

プレート

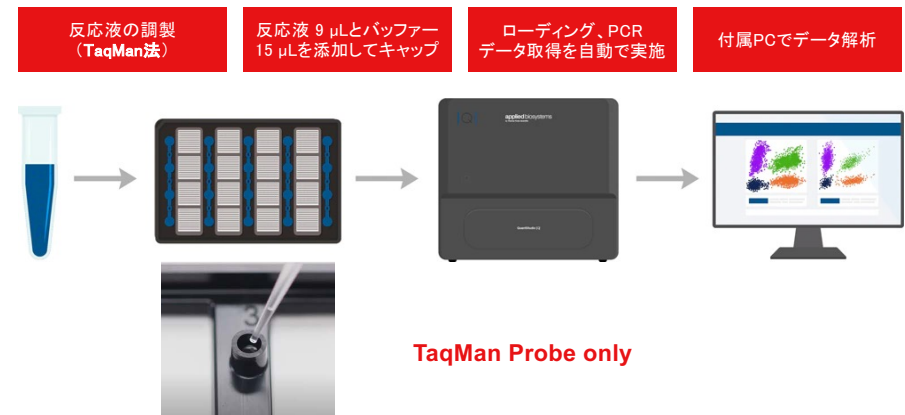
- 1プレートで最大16サンプル処理が可能
- 縦4つのアレイごとにランが可能
- 未使用のカラムは次のランに使用可能

アレイ

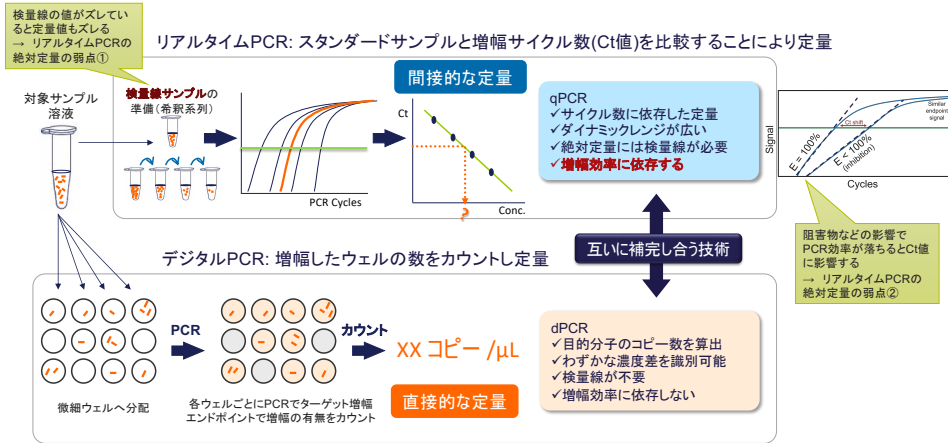
- 20,480個のマイクロチャンバーが16枚
- 反応液9 μ L + Isolation buffer 15 μ Lを添加
- 解析ポイント数として20,000個以上を安定して確保



早くて簡単“入れるだけ感覚の”ワークフロー

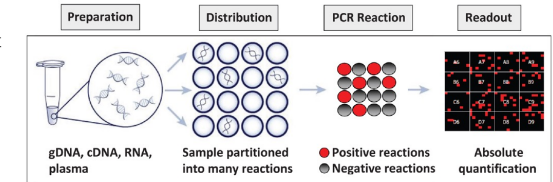
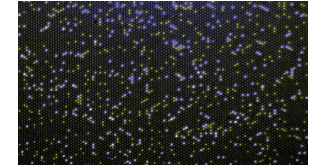


リアルタイムPCRとデジタルPCRの違い



デジタルPCRによる遺伝子解析

- 新しい溶液中の分子数測定方法
 - 反応液を多数のウェルに分配してPCRを実施
 - 増幅したウェルと増幅しなかった各ウェル数をカウント
 - 絶対濃度 (copies/ μL等) が直接的に算出できる手法
- 腫瘍・ガン研究アプリケーション
 - リキッドバイオプシー(腫瘍組織でのレアバリエント検出)
 - 体細胞におけるモザイク比率解析
- 遺伝子発現解析
 - 遺伝子間の発現量の比較
 - クロマチン免疫沈降(ChIP)ターゲットの定量
- ウイルス・バクテリア研究
 - 病原体微生物の検出・定量
 - 残存DNA検出



デジタルPCRが得意とする主なアプリケーション

がん・腫瘍研究

- 0.1%頻度の希少変異など低濃度ターゲット配列を高感度検出
- リアルタイムPCRでは基準サンプルが必要なCNV解析において、デジタルPCRでは基準サンプルが無くても解析可能
- 腫瘍組織における希少変異検出
- 体細胞におけるモザイク比率
- Copy Number Variation解析

絶対定量

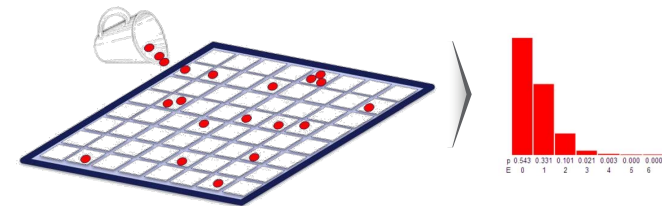
- デジタルPCRでは標準物質不要
- 未知濃度サンプルから直接的に絶対定量が可能
- 複数の遺伝子量として比較可能
- エキソソーム解析
- マイクロRNAの絶対定量
- 遺伝子間の発現量比較
- 遺伝子治療のAAVベクター定量

PCR阻害状況での定量

- デジタルPCRはリアルタイムPCRと比べてPCR阻害因子の影響を受けにくい
- リキッドバイオプシーや環境サンプルなど阻害物質が含まれることが考えられる場面での定量に有効
- 病原微生物の検出・定量
- 血中の循環サンプル
- バイオマーカーの探索
- 組換え体や残存DNA検出

コピー数の算出にはポアソンモデルによる補正が行われる

- Problem:** ランダムに分配されるので、全てが1コピー/反応になるわけではない
→ **陽性ウェル数≠コピー数ではない**
- ポアソンモデルにより各コピー数の分配確率を導くことができる
- 分配確率から各コピー数を算出し、補正計算を行う
- 少なくとも1反応は0コピーの反応がなくてはならない

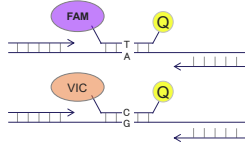


デジタルPCRによるレアな体細胞変異配列の検出

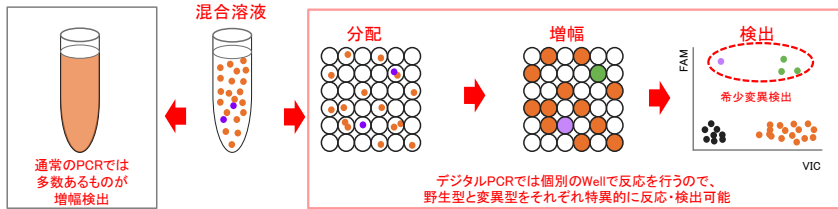
溶液中に混在している2種類の配列(野生型 & 変異型)を2種類の蛍光で検出

変異型検出アッセイ(Primer & Probe)
【存在割合: 希少(レア)】

野生型検出アッセイ(Primer & Probe)
【存在割合: 多数(メジャー)】

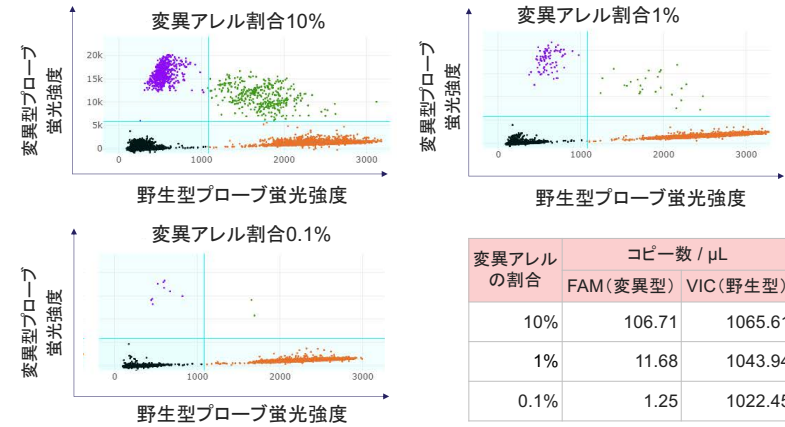


変異型/野生型の各変異配列に特異的な2種類のTaqManプローブでPCR増幅(PCRプライマーは共通)して各蛍光強度を検出



レアな変異配列検出

測定例: 人為的に混合したBRAF V600Eの変異検出



How to reserve the PCRs

1. Introduction
2. Real-time PCR (qPCR)
3. Digital PCR (dPCR)
4. Information

User registration required for the first time

qPCR: ViiA7, QuantStudio7, QuantStudio5
250yen/30min, approximately **1.5 to 3h/experiment**

dPCR: QuantStudio Absolute Q
350yen/30min, approximately **2h/experiment**
Trial service available, details on COC HP

More information?



<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/brands/invitrogen/molecular-biology-technologies/mol-bio-school/pdf-request-form.html?CID=MolBio-pdf-download-01>



<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/real-time-pcr-handbook.html>



使用上の注意 Notes for use

医学系研究科で購入した**共通利用機器**です
Common equipments for Graduate School of Medicine

使用する時間だけ予約しましょう
Make your reservation by minimum units

他の人が使っている時は**機器・パソコンは操作しない**
Do NOT operate while someone else is using

ゴミは持ち帰ってください
Take your trash home

初回使用時や問題発生時は**COCスタッフが丁寧に説明・対応してくれます**
Please contact COC the **first time** you use PCRs, or if you have **any problems**

 大阪大学大学院医学系研究科 附属最先端医療イノベーションセンター
CoMIT Omics Center
Management room 0501 (5F), ext.8327

Acknowledgments
 **ThermoFisher**
SCIENTIFIC