

## QX Droplet Digital™ PCR (ddPCR™)を用いたC型肝炎ウィルス(HCV)のアミノ酸変異ハイスループット & 高感度検出

**Key words :**ミューテーション, ウィルス, 高感度検出, モニタリング, SNP

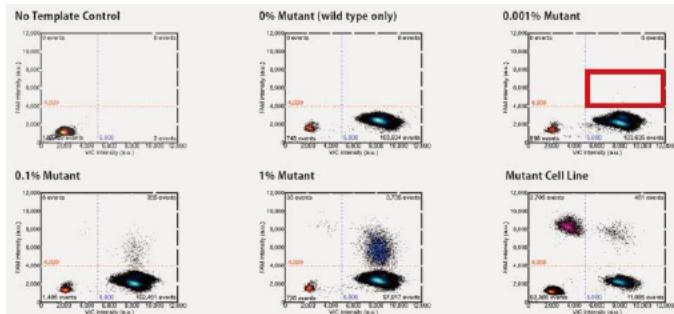
### ddPCR for Rare Mutation Detection

レア変異を高感度に検出するアプリケーションが求められる場合、Droplet Digital PCRは従来の手法よりも優れています。表1に示すようにリアルタイムPCRと比較すると感度や手間に關して有利な点が多くあげられます。

	従来の リアルタイムPCR法	QX ddPCRを用いた 超高感度検出法
感度	1%以下の変異 検出困難	>0.005%の変異を 検出可能
手間	<ul style="list-style-type: none"> <li>・検量線が必要(相対定量)</li> <li>・データ間の比較には インテラナルコントロール が必要</li> </ul> <p>↓</p> <p>アッセイの構築困難</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・検量線が不要(絶対定量)</li> <li>・データ間の比較には インテラナルコントロール 必要なし</li> </ul> <p>↓</p> <p>アッセイの構築容易</p>

表1 従来のリアルタイムPCR法との比較

リアルタイムPCR法とQX200 ddPCR法との違いをまとめた。



参考データ1 ddPCRによるBRAF V600Eをターゲットとした変異検出結果  
(バイオ・ラッド提供\*)

TaqManプローブを用いたduplex PCRにより変異検出を行った。FAMプローブのターゲット遺伝子:BRAF V600E, VICプローブのターゲット遺伝子:wild type 0.001%オーダーのMutantの検出に成功した。(上図赤枠部分)

\*本データはバイオ・ラッド提供によるものであり(C10561L1904e, P9)、論文掲載データとは異なります。

### Research Background

C型肝炎ウィルス(HCV)コアタンパクはトランスジェニックマウスで造腫瘍性を持つこと、活性酸素(ROS)の産生に影響していることが判明していますが、このコアタンパクの70番目のアミノ酸変異が肝炎や肝細胞癌の進行性だけでなく抗ウィルス療法の効果にも重要な要因であることが知られています。一方で、C型肝炎の病因における70番目のアミノ酸置換の機能についてはほとんど明らかになっていません。このコアタンパク70番アミノ酸の生理学的機能を明らかにするためには、より微細な変異の存在を正確に定量できる検出系確立が求められています。

### Application Advantages

- ウィルス変異 / 感染の検出感度を大幅アップ
- 絶対定量により測定値をCopy/ $\mu$ Lとして検出できるため、実験の煩雑さを低減
- HBV, HIV, CMVなど他のウィルス検出にも応用可能であり、ウィルス感染の早期検出、治療前中後のモニタリングにも有用

(注) QX100/200™ Droplet Digital™ PCRシステムは研究用機器です。

### Content

今回、2014年に国立研究開発法人 国立国際医療研究センター研究所 向出 雅一先生、ゲノム医科学プロジェクト長 溝上 雅史先生の研究グループが世界に先駆けJournal of Virological Methods誌でご報告されたQX Droplet Digital PCR (ddPCR)を用いたHCVゲノム中に存在するSNPの超高感度定量法についてご紹介します。



論文にはddPCR法の変異検出力、変異型HCVスタンダードプラスミドを用いてLODを検出した例、臨床血清サンプルを用いた既存体外診断薬とQX ddPCRとのHCV RNA量の定量比較結果、ダイレクトシークエンス法との結果の違いなど数々の興味深い結果が掲載されています。詳細は下記Publicationに記載されている論文をご参照ください。

## Conclusion

今回の論文より、サンプルの存在比率が非常に低いHCVゲノム内の変異解析ではQX Droplet Digital PCR (ddPCR)を用いたHCVゲノムSNP解析は超高感度定量であり、他の手法(COBAS TaqMan HCV RNA Test)と比較しても非常に高い相関性を示すことが確認されました。またダイレクトシークエンス法では詳細解析が難しかった極めて微量な変異サンプルでも変異検出を可能としました。よって、QX Droplet Digital PCR (ddPCR)は存在比率が非常に低い変異解析に大変有用なツールであると考えられます。詳細は論文を確認ください。

※ 本資料作成に当たり、国立研究開発法人 国立国際医療研究センター研究所 向出 雅一先生、ゲノム医学プロジェクト長 溝上 雅史先生より監修を頂いております。

## Publication

### High-throughput and sensitive next-generation droplet digital PCR assay for the quantitation of the hepatitis C virus mutation at core amino acid 70

Motokazu Mukaide, Masaya Sugiyama, Masaaki Korenaga, Kazumoto Murata, Tatsuya Kanto, Naohiko Masaki, Masashi Mizokami.

**J Virol Methods.** 2014 Oct;207: 169-177

## Related Articles

### <HBV>

- Next-Generation Digital PCR Measurement of Hepatitis B Virus Copy Number in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Hepatocellular Carcinoma Tissue. Huang JT, et al. *Clin Chem.* 2014 Oct 31

### <HIV, CMV>

- New assays for monitoring residual HIV burden in effectively treated individuals. Strain MC, et al. *Curr Opin HIV AIDS.* 2013 Mar;8(2):106-10.
- Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies. Eriksson S, et al. *PLoS Pathog.* 2013 Feb;9(2):e1003174.
- Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. Strain MC, et al. *PLoS One.* 2013;8(4):e55943.
- Touchdown digital polymerase chain reaction for quantification of highly conserved sequences in the HIV-1 genome. De Spiegelaere W, et al. *Anal Biochem.* 2013 Aug 15;439(2):201-3.
- Increase in 2-long terminal repeat circles and decrease in D-dimer after raltegravir intensification in patients with treated HIV infection: a RCT. Hatano H, et al. *J Infect Dis.* 2013 Nov 1;208(9):1436-42.
- Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant. Persaud D, et al. *N Engl J Med.* 2013 Nov 7;369(19):1828-35.
- Comparison of droplet digital PCR and seminested real-time PCR for quantification of cell-associated HIV-1 RNA. Kiselinova M, et al. *PLoS One.* 2014 Jan 21;9(1):e85999.
- Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. Tebas P, et al. *N Engl J Med.* 2014 Mar 6;370(10):901-10.
- Maraviroc intensification in patients with suppressed HIV viremia has limited effects on CD4+ T cell recovery and gene expression. Beliakova-Bethell N, et al. *Antiviral Res.* 2014 Jul;107:42-9.
- Cytomegalovirus replication in semen is associated with higher levels of proviral HIV DNA and CD4+ T cell activation during antiretroviral treatment. Gianella S, et al. *J Virol.* 2014 Jul;88(14):7818-27.
- HIV type 1 (HIV-1) proviral reservoirs decay continuously under sustained virologic control in HIV-1-infected children who received early treatment. Luzuriaga K, et al. *J Infect Dis.* 2014 Nov 15;210(10):1529-38.

## 論文検索サイト

ddPCRを用いた論文の検索サイトはこちら ([www.bio-rad.com/ddPCR/publications](http://www.bio-rad.com/ddPCR/publications))



バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社

取扱店

ライフサイエンス [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)

本 社 〒140-0002 東京都品川区東品川1-2-24 TEL:03-6361-7000

大阪営業所 〒532-0025 大阪市淀川区新北野1-14-11 TEL:06-6308-6568

福岡営業所 〒812-0013 福岡市博多区博多駅東2-5-28 TEL:092-475-4856

※学術のお問い合わせは TEL:03-6404-0331

※価格(税抜き)、仕様などは予告無く変更することがありますので、ご了承ください。

※価格は2019年7月現在のもので、メーカー希望小売価格(税別)です。

※本カタログに記載されている会社名、商品名は各社の商標または登録商標です。

C12128L 1907b