

リアルタイムPCRからDroplet Digital™ PCR (ddPCR™)へのアッセイの移行

Key words : アデノ随伴ウイルス(AAV)、ITR、リアルタイムPCR、条件検討

Abstract

このTech Noteでは、リアルタイム PCR (qPCR) から Droplet Digital PCR (ddPCR) へのアッセイの移行について解説します。これら 2 つの PCR 手法は、根本的に異なるアプローチで DNA 試料の濃度を測定します。また、2 つの手法間のブリッジング試験では、考慮すべき相違点と類似点を示すデータを提示します。qPCR では、濃度測定はバルク PCR 反応からの蛍光シグナルが DNA 量との比例関係に基づいているため、コントロールや標準 DNA 試料に対する相対的なものになります。ddPCR では、PCR 反応を個々のドロップレットに分割し、PCR 増幅が完了した後にポジティブまたはネガティブとしてカウントし、ポアソン統計学で評価することにより DNA 濃度を直接決定しています。ここでは、検量線を使用する qPCR アッセイから、検量線を使用せず直接定量する ddPCR アッセイに移行するための指針提示として、アデノ随伴ウイルス (AAV) の inverted terminal repeat (ITR) アッセイのデータを示しています。最初に、ポジティブとネガティブのドロップレット間の分離を最大化するために ddPCR 反応の annealing/extension ステップで温度グラジエントによる検討を行いました。その後、制限酵素を使用し、アンプリコンのアクセス性またはリンカーが濃度に及ぼす影響を確認しました。プロセスに関与する要因と実験的な要因の組み合わせが、それぞれの手法に潜在的に想定される要因として qPCR と ddPCR 間のウイルス力価の違いに影響を与える可能性があります。qPCR から ddPCR への移行は難しいものではなく、簡単なブリッジング試験により、過去の qPCR データと直接比較できる一貫性のある堅牢な ddPCR 結果を得ることができます。

Introduction

PCR は、DNA を初期量から何百万倍にも増幅することで、DNA または RNA の特定の配列を検出、比較および定量するために使用できる強力な技術です。PCR の基本的なステップは、DNA の変性、目的の DNA 配列のために特別に設計されたプライマーのアニーリング、Taq ポリメラーゼによる伸長です。この変性、アニーリング、伸長のサイクルは、PCR 反応が完了するまで 35~40 回繰り返されます。DNA を検出可能なレベルまで増大させるためには、指数関数的な増幅が必要となります。

PCR が発明されて以来、増幅された DNA を検出するための様々な方法が開発されてきました。ここでは、ゲル電気泳動による検出法、qPCR 検出法、ddPCR 検出法の 3 つの一般的な方法を紹介します。これら 3 つの方法を経て、感度と定量性が向上しました。

初期の PCR の検出および定量方法は、PCR 反応が完了した後のアガロースゲル電気泳動と DNA 染色に基づいています。バンドの幅と明るさを視覚的に比較することで、同じゲル上の DNA コントロール試料を参照して、試料中の DNA 量を定量することができます。このようにスタンダードやコントロールを用いて DNA を定量する相対的な方法は、測定誤差が大きいのが現在でも使用される方法です。

リアルタイム PCR では、PCR 増幅中の各サイクル後の蛍光シグナルを計測します。PCR 反応が完了した後、目的の試料からのデータをリファレンス試料からのデータと比較して、目的試料の DNA 量を決定します。この方法は、ゲル電気泳動よりもはるかに低い誤差で DNA を検出し、定量することができます。ゲル電気泳動と同様に、qPCR 測定は、蛍光シグナルが蛍光と DNA 量の比例関係に基づいているため、コントロールまたは標準 DNA 材料に対して相対的なものになります。この方法は、検量線に用いる試料の同一性と品質に依存し、操作者によるエラーの

影響も受けやすい傾向にあります。多くのアプリケーションにおいて、正確な定量のための、試料の性質を十分に模倣した検量線用試料を作成することは困難です。また検量線用試料のバッチ毎の違いを確認し記載しなければなりません。

ddPCR では、各 PCR 反応を 1 万個を超えるドロップレットに細分化しています。各ドロップレットは個々の PCR 反応系であり、PCR 増幅の後、陽性あるいは陰性としてカウントします。この方法は他の DNA 試料と比較するのではなく、物理的に DNA 分子をカウントするため、量を換算するための検量線を必要としません。

qPCR と ddPCR には類似点と相違点があります。ここでは、検量線を使用する qPCR アッセイから、検量線を使用せずに対象を直接定量する ddPCR アッセイへの移行の指針となるデータを示します。

Materials and Methods

qPCR データ

リアルタイム PCR 用 AAVpro Titration Kit for Real Time PCR (タカラバイオ社、6233) を、コントロールである AAV2-CMV-GFP ウイルスサンプル (Vigene Biosciences, CV10004) の力価決定に使用しました。70°C で 10 分間の溶解緩衝液を用いてベクターゲノムを抽出する前に、DNase I (New England Biolabs, Inc, M0303) を用いて最初にウイルスを 37°C で 30 分間インキュベートしました。この試料を 2 つのアリコートに分配し、qPCR および ddPCR による並列分析に使用しました。すべての qPCR 反応について、以下に要約されるプロトコルの推奨事項に従いました。キャプシド溶解後、付属の希釈バッファーで連続 10 倍希釈したベクターゲノム系列を作成し、qPCR のテンプレートとして直接使用しました。検量線のための試料は、キットに添付された陽性コントロールを用い、希釈バッファーで 10 倍連続希釈を調製しました。

検量線用試料の反応あたりの最終コピー数は 10^7 から 10^3 の範囲としました。メーカーより、この陽性コントロールは、260nmにおける吸光度値(A_{260})に基づいて 2×10^7 copies /uLに調整されており、AAVベクターゲノムと同じ ITRコピー数を含むプラスミド DNAと説明されています。制限酵素処理には1反応あたり5 Uの MspI (New England Biolabs, R0106)を用いました。すべての試料は、CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad Laboratories, Inc., catalog #1854095J1)を用い、95°Cで2分間の初期変性に続き、95°Cで5秒間、60°Cで30秒間の35回のサイクルで構成される、推奨の2ステップサーマルサイクルプロトコルにてトリプリケイト測定を行いました。増幅後にメルトカーブステップ(65~95°Cを5秒ごとに0.5°Cずつ増分)を追加しました。定量サイクル(Cq)値と検量線用試料からの初期量より対数を用いた検量線を作成しました。検量線回帰線の傾きおよびy切片を、コントロールのAAV2-CMV-GFP ウイルスサンプルのコピー数計算に使用しました。データは、CFX Maestroソフトウェア (Bio-Rad, #12004110J1)を用いて分析しました。

ddPCRデータ

陽性コントロールおよび AAV2-CMV-GFPウイルスサンプルの調製は、TaKaRaプロトコルに従った DNase Iおよび溶解ステップ(上記の qPCRデータメソッドのセクションに記載されている)の後、提供される TaKaRa dilution bufferの代わりにpolyAバッファー(10mM Tris-HCl, pH8, 0.1mM EDA, 100 ug/ml polyA)で10倍連続希釈を行い、ddPCRのテンプレートとして直接使用しました。AAVpro Titration Kitのプライマーを、QX200 ddPCR EvaGreen Supermix (Bio-Rad, #1864033)を用いた ddPCR反応に使用しました。TaKaRaプロトコルで調製した試料を、AAVpro Titration Kitのプライマー、C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, #1851197JA)、および QX200 ddPCR EvaGreen Supermix Product Insert (Bio-Rad, 10028376)を使用して、65°Cから55°Cへの推奨の温度グラジェントを挟んだ annealing/extensionステップを用いて、ddPCRで検討を行いました。第二の AAV2-CMV-GFPウイルスサンプルは社内のバイオ・ラッドプロトコルを用いて調製しました。このプロトコルでは polyAバッファーを用いて Eppendorf DNA LoBind Tubes (Sigma-Aldrich, Inc., 0030108051)中での連続10倍希釈を行う前に、0.1% Pluronic F-68 Non-Ionic Surfactant (Thermo Fisher Scientific Inc., 2404032)を含む DNase I消化バッファー中で37°Cで30分間、DNase Iを用いて脱殻したDNAの消化を行いました。1反応あたり5 Uの MspIで制限酵素処理を行いました。ドロップレットは DG8カートリッジ (Bio-Rad, #1864007)と QX200 Droplet Generator* (Bio-Rad, #1864002JA)を用いて生成し、96ウェルプレートに移した後、ddPCR用ホイルヒートシールで覆い、PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad, #1814000J1)でヒートシールしました。バイオ・ラッドプロトコルおよび ITRアッセイを、ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) (Bio-Rad, #1863023)を用いて実験し、最終的な力価比較に使用しました。バイオ・ラッドプロトコルは、AAV-ITR2 (Bio-Rad, Assay ID dEXD12170542)を使用するプローブベースのアッセイです。ドロップレットを QX200 Droplet Reader* (Bio-Rad, #1864003JA)で読み取り、データを QuantaSoft Software, version 1.7 (Bio-Rad, #1864011)で解析しました。

吸光度測定

Plasmid, pcDNA3.1(+) Mammalian Expression Vector (Thermo Fisher Scientific, V79020)を、提供されるプロトコルに従い直接、または Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (New England Biolabs, T1030)を用いて精製した後に測定しました。カラム精製前後のプラスミドの吸光度を、Nanodrop

2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, ND-2000C)を用い、260 nmでトリプリケイト測定を行いました。 A_{260} 値は、一般に認められている乗算係数 50または実験的に推定された乗算係数 46.25のいずれかを用いて濃度(ng/uL)に換算しました(Nwokeoji et al. 2017)。

$$\text{Concentration (ng/uL)} = A_{260} \times 50$$

または

$$\text{Concentration (ng/uL)} = A_{260} \times 46.25$$

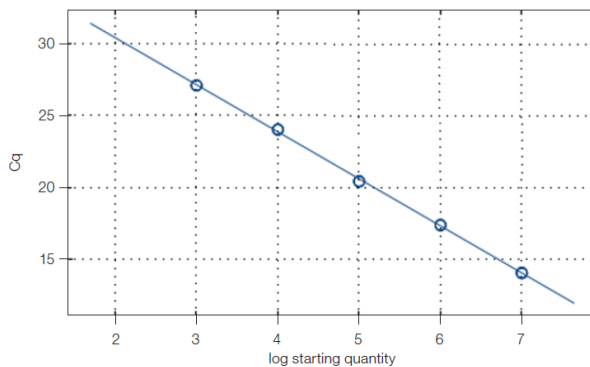
プラスミドコピー数は、次の式を用いて重量からコピー数を換算しました:

$$\text{Copies per uL} = \frac{(\text{concentration [ng /uL]}) \times (6.022 \times 10^{23} \text{ molecules /mol})}{(\text{number of base pairs} \times 660 \text{ g /mol}) \times (1 \times 10^9 \text{ ng /g})}$$

核酸濃度を測定するための直交的な方法として、CMVエンハンサーおよび SV40 polyAシグナル配列を標的とするアッセイを用いて、プラスミド濃度を ddPCRで測定しました。反応あたり5 U HaeIII (制限酵素) (New England Biolabs, R0108)を含む ddPCR Supermix for Probes (No dUTP)で調製し、推奨されたサーマルサイクリングプロトコル (Bio-Rad, 10026868)を用いて PCR増幅しました。CMVエンハンサーおよび SV40 polyA濃度を平均化し、260 nmでの吸光度に基づく推定濃度に対する ddPCR濃度の相対的な変化を、次の式を用いて計算しました:

$$\text{Relative change} = \frac{(\text{copies /uL from ddPCR}) - (\text{copies /uL from } A_{260})}{(\text{copies /uL from } A_{260})}$$

A. Standard Curve



B. Amplification

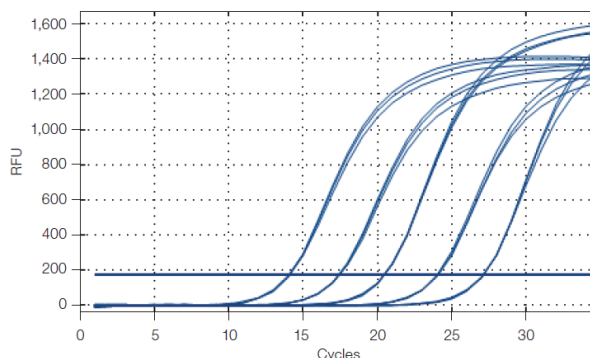


図1. 検量線(A)とAAV2-CMV-GFPウイルスサンプル(B)の各希釈での3回のレプリケートを示すqPCRデータ

検量線の線形回帰パラメータは、検量線の傾き = -3.271、y切片 = 36.949、 $R^2 = 0.999$ 、 $E = 102.2\%$ でした。

Cq: quantification cycle RFU: 相対蛍光値

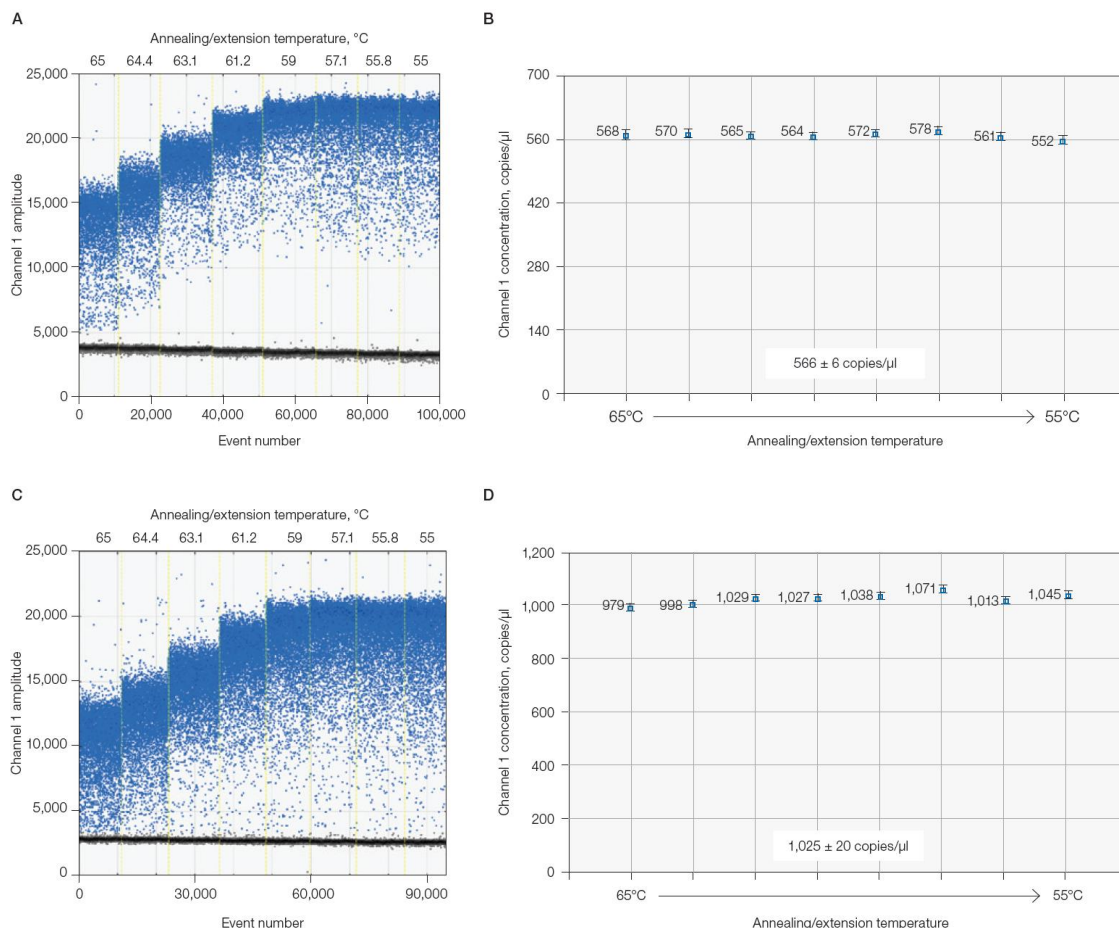


図2. 陽性コントロールおよびウイルスサンプルを用いた、TaKaRa KitのプライマーおよびddPCR EvaGreen Supermixによる、ddPCRのためのannealing/extensionに関する温度グラジエント最適化データ

65°C～55°C(左から右へ)の間でannealing/extension温度を変化させてサーマルサイクリングを行った、陽性コントロール(AおよびB)および AAV2-CMV-GFPウイルスサンプル(CおよびD)についての代表的な1-Dドロップレットデータおよび濃度プロットデータを示しています。1-Dプロット(AおよびC)では、ポジティブドロップレットとネガティブドロップレットの分離は温度によって変化しましたが、ポジティブドロップレットとネガティブドロップレットの間に十分な分離があるため、温度に依存せず濃度(BおよびD)は一貫していました。全ての温度でのデータをマージし、検量線(B)およびウイルスサンプル(D)のddPCR反応における濃度および95%信頼区間を計算するために使用しました。

Results

図1にキットを用いた検量線および AAV2-CMV-GFPウイルスサンプルのqPCRデータを示します。検量線(図1A)の各10倍希釈系列(反応あたり $10^7 \sim 10^3$ コピー)を、推奨のトリプリケイトにてアッセイしました。データの線形回帰パラメータおよび計算された効率をグラフ上に示しました。R²値(0.999)と効率(102.2%)は、最適化されたqPCR実験の許容範囲内でした。AAV2-CMV-GFPウイルスサンプルの増幅プロット(図1B)は、ウイルスの10倍希釈系列の3回反復を行ったデータを示しています。検量線の濃度内にある、ウイルスゲノムで表される4点のウイルス希釈溶液を、 $(3.98 \pm 0.77) \times 10^{12}$ vg/mlのウイルス力価の算出に使用しました。qPCRアッセイから ddPCR アッセイへの移行の最初のステップとして、annealing/extensionステップの温度グラジエントを行いました。データは TaKaRaのqPCR試料調製プロトコルに従い、ddPCR測定により取得しました。2つの方法間のアッセイ性能に対する温度の影響を直接比較するために、同じ試料調製方法及びqPCRプライマーを用いました。

qPCR サーマルサイクルプロトコルの代わりに、annealing/extensionステップで65°Cから55°Cまでの温度グラジエントを行い、推奨のddPCR サーマルサイクルプロトコルを使用しました。この結果を図2に示します。検量線の段階希釈試料

(図2Aおよび2B)およびウイルスサンプル(図2Cおよび2D)の代表的なデータは、1-Dプロット(図2Aおよび2C)において、ポジティブおよびネガティブのドロップレット間の分離は温度によって変化しますが、アッセイの分離は広い範囲の温度にわたって堅牢であることを示しています。annealing/extensionが65°Cから59°Cに低下するにつれて分離は増加し、その後は55°Cまで一定でした。ネガティブおよびポジティブのドロップレットを区別する適切なしきい値を定義することができるので、濃度(図2Bおよび2D)は温度から比較的影響を受けていないと言えます。しきい値の設定を容易にし、サンプルマトリックス効果の影響を軽減するために、ポジティブとネガティブの間に最大の分離が得られる温度を選択することが多くの場合望まれます。

各温度の個々の濃度を示すプロット(図2Bおよび2D)に加え、すべての温度からのデータをマージし、陽性コントロール試料(図2B、 566 ± 6 copies/μL)およびウイルスサンプル(図2D、 $1,025 \pm 20$ copies/μL)の濃度および95%信頼区間を計算し、試料の希釈系列は補正した後 $(4.15 \pm 0.08) \times 10^{12}$ Vg/mlとしました。陽性コントロールの濃度は、メーカーによって割り当てられた検量線の値よりも1.76倍低い値となりました。ddPCRは、存在する物理的なアンプリコンの数をカウントし、濃度を算出するために吸光度(UV)測定を使用しないので、qPCRの結果とは異なる場合があります。例えば図3(Precolumn)では、ddPCRによって決定された精製プラスミドの濃度が、UV測定に基づいて予想される濃度より

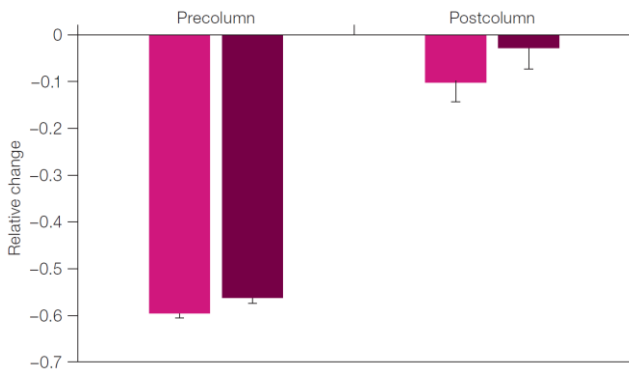


図3. 吸光度測定から算出したコピー数とddPCR濃度との相対的な変化
 コピー数は660 Da /bpと乗算係数 50または 46.25のいずれかを用いて算出しました。カラム精製前のプラスミドでは、計算されたコピー数に対してddPCR濃度は予想よりも低値となりました。プラスミドの小スケールカラム精製を追加したところ、計算されたコピー数と実験で得られたコピー数はよく一致した。■ 50 ng x (cm/uL) ■ 46.25 ng x (cm/uL)

も約 55%低くなることを示しています。2つの測定値の差は、追加のカラム精製ステップ (図3, Postcolumn)によって10%以下に減少しました。

定量 PCRから Droplet Digital PCRに移行するためのもう一つの一般的な方法は、DNAに完全にアクセスできるようにプロトコルを最適化することです。アンプリコン内でなく、アンプリコン近傍を切断する制限酵素を追加することで、アンプリコンへのアクセス性を高めることができます。ddPCRで制限酵素を使用すると、PCR増幅の改善に加え同じ DNA上に物理的に位

置する2つの DNAターゲットを分離して、個々のドロプレットに分配して別々にカウントさせることができます。

図4に、qPCRキットの AAV2-CMV-GFPウイルスサンプルと陽性コントロールに対する制限酵素処理の効果を示しました。各試料のタイプは、サーマルサイクリング前の qPCRおよび ddPCR反応ミックスに、反応あたり5 Uの MspIを加えることにより評価しました。陽性コントロールおよび AAV2-CMV-GFPウイルスサンプルに対してそれぞれ異なる制限酵素の効果が見られました。AAVpro Titration Kitでの陽性コントロールの測定は、MspIに対して最小限の感受性を有しており、MspIを用いた異なる希釈および酵素を添加しない場合の Cq値が類似していることが示されました (図4A)。しかし、ウイルスサンプルの異なる希釈液の Cq値は、酵素を添加しない場合と比較して、MspIを添加した場合で低下しました (図4B)。効率(103.7%)および R²値(0.999)は、酵素なしの値と同様であり、許容範囲内のパラメータを示しました。陽性コントロールの1希釈について、異なる annealing/extension温度で ddPCRを行ったところ、酵素なし (566 ± 6コピー/uL)と MspIあり (557 ± 9コピー/uL)の濃度に変化はありませんでした (図4C)。対照的に、AAV2-CMV-GFPウイルスサンプルでは、MspIによって変化し、ITR領域が制限酵素によって分離された場合にのみ、予想された約2倍の ITR濃度の増加を示しました。ウイルス前駆体の異なる希釈液の Cq値は、酵素なしの値と比較して MspIを用いた場合では低く (図4B)、ddPCR濃度は酵素なしの場合は1,025 ± 20 copies /uLから、ddPCR反応ミックス中に MspIを加えた場合の1,864 ± 17 copies /uLに増加しました (図4D)。これは、異なるannealing/ extension温度のそれぞれにおいても同様でした。陽性コントロールとウイルスサンプルに対する MspIの効果は、2つの試料が異なるテンプレートへのアクセス性を持っている可能性があり、スタンダードとテンプレートが同等の増幅となると仮定している qPCRでは定量エラーが生じる可能性があることを示唆しています。MspIを用いた Cq値の減少および ddPCRコピー数の増加により、ITR濃度は qPCRでは(1.33 ± 0.25) × 10¹³ copies

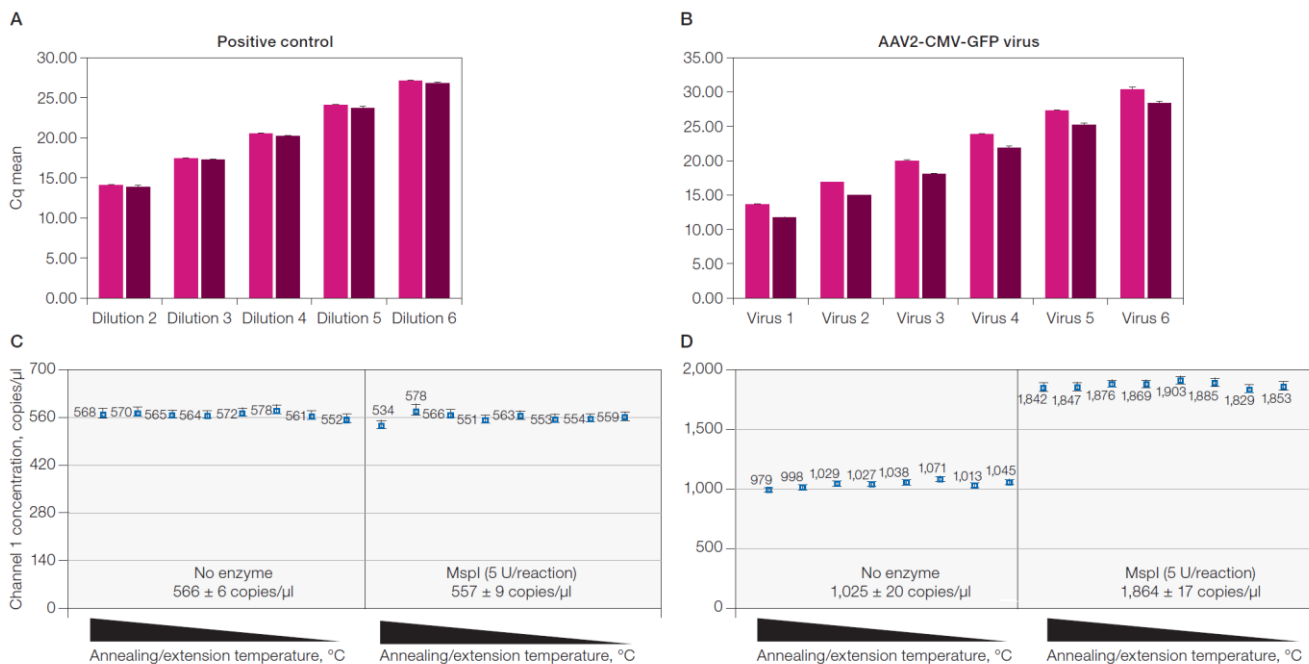


図4. 制限酵素消化の効果

MspI (1反応あたり5 U)を、サーマルサイクリング前の陽性コントロール (AおよびC) および AAV2-CMV-GFPウイルスサンプル (BおよびD)に添加しました。MspIは陽性コントロールの qPCR Cq値 (A)または ddPCR濃度 (C)にはほとんど影響を与えませんでしたが、MspIは AAV2-CMV-GFPウイルスサンプルの qPCR値 (B)を低下させ、ddPCR濃度 (D)を増加させました。全ての温度からのデータを統合し、陽性コントロール (C)およびウイルスサンプル (D)の ddPCR反応における濃度および 95%信頼区間を算出しました。酵素なしのデータ (CおよびD)は、図2Bおよび2Dから取得されました。

■ 制限酵素無し; ■ MspI Cq: quantification cycle

/ml、ddPCRでは $(7.35 \pm 0.15) \times 10^{12}$ copies /mlでした。図5は TaKaRaプロトコルからの qPCRデータと、Bio-Radプロトコルによる ddPCRデータを使用した別のウイルス定量を用いて計算されたストック試料中のウイルスゲノムコピー /uLを示しています。両プロトコルの最終的なウイルス力価 (copies /uL) は、qPCRでは $(3.98 \pm 0.77) \times 10^9$ 、ddPCRでは $(8.72 \pm 0.10) \times 10^9$ でした。Vigene Biosciences社の AAV-CMV-GFPストック試料の力価を遺伝子コピー数で表すと、 2.17×10^{13} gc /mlまたは 2.17×10^{10} gc /uLでした。

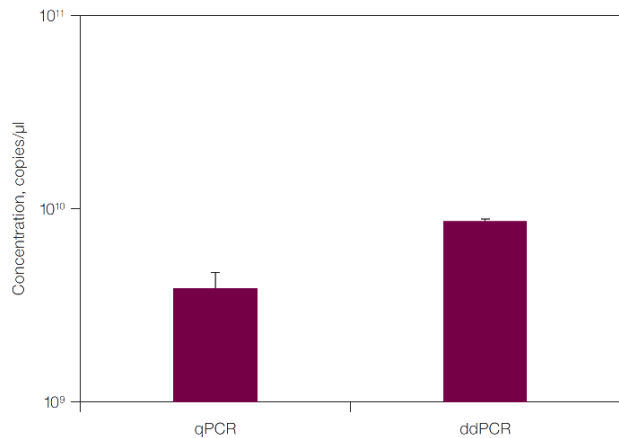


図5. qPCRプロトコルおよびddPCRプロトコルから算出された最終的なウイルスゲノム濃度

2つのプロトコルのウイルスゲノムのコピー/uLの濃度は、 $(3.98 \pm 0.77) \times 10^9$ (qPCRプロトコル、TaKaRa) および $(8.72 \pm 0.10) \times 10^9$ (ddPCRプロトコル、Bio-Rad) でした。

Discussion

この研究の第一の焦点は、qPCRから ddPCRに移行する際にデータをどのように橋渡しするかを議論することでした。我々が示し、議論するデータは、このプロセスを理解するのに役立つことを意図しています。最終的に方法とプロトコルが確立されれば、2つの方法で同一ではないですが堅牢な互換性が保たれます。ddPCR アッセイは、多くの場合、あらかじめ定量された標準物質を使用せずに、陽性コントロールと陰性コントロールのみで実行されるため、DNA の完全な増幅を確実に行うことが重要です。この理由から、ddPCRへの堅牢な移行を確実にするために使用されるいくつかの一般的な方法を示します。温度グラジエントとアンプリコンの外側をカットする制限酵素の追加は、アッセイを ddPCRに移行する際に推奨される2つの一般的な最適化方法です。

qPCRと ddPCRには、核酸の検出や定量のための指数関数的増幅や蛍光化学法 (DNA結合色素や加水分解プローブ) などの類似点があります。一方の方法から他方の方法に移行する際には、その違いを理解することが重要です。大きな違いの一つは、qPCR が定量化に検量線が必要とするのに対し、ddPCR はポジティブとネガティブドロプレットの分率とポアソン統計学を用いて、反応中の増幅配列の絶対数 /uLとそれに対応する信頼区間を決定している点にあります。その結果、2つの技術間で最終的な濃度が異なる主な理由の1つは、qPCR で試料を定量するために使用される検量線にあります。この DNA 濃度の測定は、検量線の線形回帰分析から得られた傾きと y切片に基づいて割り当てられます。本来の検量線の定量化は、最も一般的には UV 測定によるものですが、これは不純物やその他試料のアーティファクトのために、不正確で

ある可能性があります。この理由から、我々は、qPCR と ddPCR 定量化の間の共通の変動要因として UV 測定を検討しました。さらに qPCR データ解析では、検量線試料と未知試料の PCR 反応が、Cq に到達するのに必要なすべてのサイクルで一定の増幅効率を有することを前提としています。ここでは、制限酵素の添加に対して、検量線とウイルスゲノムが異なる反応を示すという点で、検量線の材料が類似しているようには見えなかったことを示しています (図4)。

標準物質の濃度は、独立した手法で決定する必要があります。標準物質定量のための一般的な手法に、分光光度計で A_{260} 値を測定し、標準物質に含まれる塩基対の数と DNA 塩基対の平均分子量を用いてコピー数を計算する方法があります。 A_{260} 値は DNA に特異的な値ではなく、一本鎖 DNA は二本鎖 DNA に比べてハイパークロミティシティであり、核酸構造の影響を受けます。さらに、標準物質中の混入有機物質、タンパク質、または残留大腸菌 DNA が A_{260} 値に影響を与える可能性があります。260 nm での吸光度を有する任意の化合物を検出する非特異的な UV 吸光度測定と特異的な ddPCR 測定との間の濃度差が公表されています (Lockら2014)。我々は、これらの濃度差が、追加のカラム精製ステップによって最小化され得ることを示しました (図3)。さらに、吸光度を濃度に変換する間に行われた仮定もまた、ddPCR コピー数が UV 吸光度測定から計算された濃度と異なる原因となり得ます。これらの仮定のいくつかは、分子量 (660 Da /bp、650 Da /bp、または個々の塩基組成に基づく de novo 値)、吸光度から濃度への変換係数 (50 または $46.25 \text{ ng} \times [\text{cm}/\mu\text{L}]$)、DNA が外来の宿主細胞 DNA を含まず完全に純粋であること、および DNA トポロジー (スーパーコイル状、弛緩状、直線状) が均一な二本鎖であることです。

DNA の蛍光検出は、コントロール試料に対する DNA 濃度を測定するための代替方法です。蛍光アッセイは一本鎖または二本鎖 DNA に特異的ですが、温度変動や雑多な二本鎖 DNA はアッセイの精度に影響を与える可能性があります。さらに、DNA の構造、トポロジー、塩基配列の影響は、DNA インターカレート色素に影響を与える可能性があります。検量線の定量変動のこれら原因のすべては、ddPCR に移行する際に、実際のそれぞれの定量に何らかの違いをもたらす可能性があります。

検量線に基づく定量においては、標準物質と未知試料との PCR 効率の差が qPCR の結果に影響を与える可能性があることが言及されました。図 4 に示すデータは、検量線の陽性コントロールとウイルスサンプルの PCR アクセシビリティが一致しないことを示しています。両方の試料が同じプライマーアクセシビリティを持っていた場合、同じ濃度の標準物質と未知試料は同じ Cq 値を持つこととなります。我々は、テンプレートアクセシビリティを修正するために、MspI によるエンドヌクレアーゼ制限酵素消化を使用しました。qPCR データ (図4Aおよび4B) では、陽性コントロール試料のテンプレートアクセスは、Cq 値に変化がないため、MspII による制限消化によって影響を受けないことを示していますが、ウイルステンプレートは、MspI 処理によってウイルステンプレートのアクセシビリティが増加した結果、Cq 値は減少しました。このようにテンプレートへのアクセシビリティが異なることは、試料の条件が検量線試料と異なる場合に定量精度に影響を与えます。MspI の同様の効果は、ddPCR データについても見られました (図4Cおよび4D)。2つの ITR を持つテンプレートの場合、ddPCR を用いた測定でウイルスサンプルに見られる濃度増加は、テンプレートへのアクセシビリティと、2つの ITR が同じ DNA 片上で物理的に連結されている連結性の組み合わせによるものと説明できます。ITR が分離されていない場合は、ITR はウイルスゲノムごとに1つとしてカウントされます。

qPCR アッセイを ddPCR アッセイに変換する一般的に推奨される方法は、検量線の希釈系列と現実的な試料の結果を類似した条件を用いて比較することです。ddPCR では、アンプリコンを物理的にカウントする方法として、温度グラジエントと制限酵素を

用いて、可能な限りPCR効率を最適化する必要があります。AAVの例(図5)では、ウイルスサンプルの上流処理の追加的な最適化が不可欠でした。どちらのプロトコルでも、DNase Iを使用してカプセル化などの工程に移る前の核酸を消化し、続いてDNase処理した試料を2つのアリコートに分配し、qPCRとddPCRのプロトコルを使用してその後の並列した試料処理を行いました。qPCRプロトコルは、現在用いられるプロトコルです。ddPCRプロトコルは、polyAを用いてDNase処理したウイルスの10倍連続希釈系列の作成、95°Cで10分間の希釈ウイルス溶解、5 Uの MspIと5,000 copies / μ L未満のテンプレートを加えてPCR反応液を調製する工程を含みます。サーマルサイクリングプロトコルは、qPCRに使用されるannealing/ extension温度より5°C低い温度から5°C高い温度までの温度グラジエントを使用します。次いで、変換係数は2つのプロトコルによって決定された力価の比から計算することができます。この場合、qPCR力価は2.19(MspIを用いたddPCRの力価と標準プロトコルを用いたqPCR力価に対する比率、つまり8.72/ 3.98)を乗算することにより、ddPCR力価に変換することができます。qPCRからddPCRへの変換係数の感度と一貫性を評価するために、ダイナミックレンジ内での濃度試験を行うことが推奨されます。MspIをこの実験のために選択したのは、ITRアッセイでの以前の経験からですが、ITR外の領域(プロモーター、エンハンサー、polyAシグナル配列、関心のある遺伝子など)に対するテンプレートアクセス性を向上させるために、アンプリコン内に認識部位を持たない任意の制限酵素(HaeIII、MseI、AluI、HindIII、CviQI)を5 U用いたプロセスを、ddPCRプロトコルに含めることが推奨されます。

結局のところ、qPCRとddPCRのプラットフォーム間でのウイルス力価の違いには、プロセスに関連する要因と実験的な要因が組み合わさっている可能性が考えられます。

* 本TechNote用いられる下記の機器は研究用機器あり、医療機器ではございません。

- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System,
- QX200 Droplet Generator,
- QX200 Droplet Reader

掲載データはBulletin7320を引用しています。

Conclusion

qPCR では、研究室間で大きな差があることが知られています。例えば、組換えアデノ随伴ウイルス標準物質(AAV2血清型およびAAV8シュードタイプ)は、世界中の16の研究室に配布され、詳細なプロトコルおよび共通の試薬を提供することでアッセイを標準化しようとしたにもかかわらず、研究室間の精度および精度にばらつきがありました(Lock et al. 2010 and Ayuso et al. 2014)。これは、アッセイを定量PCRから、日々の変動やラボ間の変動が非常に小さいddPCRに移行することで克服することができます。簡単なブリッジング試験により、過去のqPCRデータと直接比較できる一貫性のある堅牢なddPCR結果を得ることができます。

References

Ayuso E et al. (2014). Manufacturing and characterization of a recombinant adeno-associated virus type 8 reference standard material. *Hum Gene Ther* 25, 977-987.

Lock M et al. (2010). Characterization of a recombinant adeno-associated virus type 2 reference standard material. *Hum Gene Ther* 21, 1,273-1,285.

Lock M et al. (2014). Absolute determination of single-stranded and self-complementary adeno-associated viral vector genome titers by droplet digital PCR. *Hum Gene Ther Methods* 25, 115-125.

Nwokeoji AO et al. (2017). Accurate quantification of nucleic acids using hypochromicity measurements in conjunction with UV spectrophotometry. *Anal Chem* 89, 13,567-13,574.

このアプリケーションは[bio-rad.com/ddPCR-CellAndGeneTherapy](https://www.bio-rad.com/ddPCR-CellAndGeneTherapy)でもご確認いただけます

BIO-RAD, DDPCR, DROPLET DIGITAL PCR, and QUANTASOFT are trademarks of Bio-Rad Laboratories, Inc. in certain jurisdictions.

EvaGreen is a trademark of Biotium, Inc. Bio-Rad Laboratories, Inc. is licensed by Biotium, Inc. to sell reagents containing EvaGreen Dye for use in real-time PCR, for research purposes only.

Purchase of Digital PCR products from Bio-Rad Laboratories includes a limited, non-transferable right under our intellectual property for you to use the products for your internal research purposes only. Unless we expressly state otherwise in additional Terms and Conditions, no rights are granted for you to distribute or resell the products or to use the products for commercial applications, such as contract services or fee for services. No rights are granted for diagnostic uses. Information concerning a license for such uses can be obtained from Bio-Rad Laboratories. It is the responsibility of the purchaser / end user to acquire any additional intellectual property rights that may be required. The QX200 and QX200 AutoDG Droplet Digital PCR Systems and / or their use is covered by claims of US patents, and / or pending US and non-US patent applications owned by or under license to Bio-Rad Laboratories, Inc. See [bio-rad.com/en-us/trademarks](https://www.bio-rad.com/en-us/trademarks) for details.

All trademarks used herein are the property of their respective owner.

BIO-RAD

バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社

ライフサイエンス www.bio-rad.com
 本社 〒140-0002 東京都品川区東品川 2-2-24 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

※学術的お問い合わせは 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2021年4月現在のものです。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。

取扱店