

QuantStudio 3D デジタルPCRシステム

すぐに手軽に始められる

デジタルPCRの新しいフォーマット

- シンプルなワークフローを実現 — 20,000データポイントを実現したチップフォーマットを提供します
- 手頃な価格 — トータルコストが抑えられます
- 絶対定量 — スタンダードカーブを使用せずに正確な検出が可能です



QuantStudio 3D デジタルPCRシステム

はじめに

これまで、デジタルPCRを実験手法として採用するケースは限られていました。これは、煩雑なワークフローや高いコストなどが理由でした。シンプルでリーズナブルな価格のApplied Biosystems™ QuantStudio™ 3D デジタルPCRシステムは、デジタルPCRで問題となるこれらのバリアを取り除き、どんなラボでもデジタルPCRを実施可能とします。デジタルPCRは、スタンダードカーブを使用すること無く絶対定量が可能のため（図1）、トラディショナルなリアルタイムPCRアプリケーションの境界を拡げます。デジタルPCRを使えば、より高い感度と精度が得られるため、単に

個々の分子を検出しC_tを測定するだけにとどまらず、以下のようなアプリケーションをはじめとする様々な実験が可能となります：

- コピー数多型 (CNV) の解析
- 病原体量の測定
- スタンダードの絶対定量
- 次世代シーケンシング用ライブラリーの定量
- mRNAおよびmiRNAのわずかな発現量変化の検出
- GMOの検出およびコンタミネーション評価

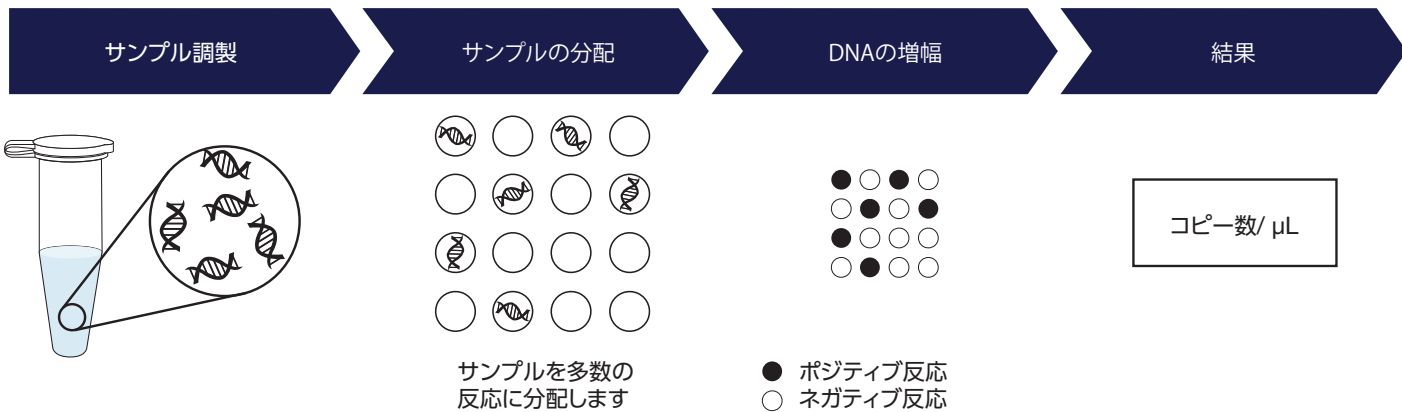


図1. デジタルPCRはターゲットとなるアレルの絶対量を可能とします。デジタルPCRを実施するには、核酸の混合物を、あるウェルは1個のターゲット分子を含む一方、他のウェルにはターゲットを含まない程度に多数の反応ウェルに分配します。各反応液で通常のPCRを実施し、ターゲット分子を含まないウェルを同定します。標準的な統計モデルで補正計算を行い最終的な濃度の値を得ることができます。デジタルPCRではコピー数の定量にC_t値を使用しないので、絶対定量において既知のスタンダードとの比較が不要となります。

シンプルなワークフロー

QuantStudio 3D デジタルPCRシステムは、デジタルPCRを実施する際に必要となる熟練のレベルを最低限に抑えます。反応ミックスをユニークなタグのついたチップに単純にロードし、デュアルフラットブロックを備えたサーマルサイクラーで増幅し、QuantStudio 3D デジタルPCR装置を用いてターゲット濃度を読み取るだけです。読み取りには1分もかかりません。サンプルおよび増幅産物は単純化されたこれらのプロセスの間ずっと密閉されており、(コピー数/μL)という解釈の容易な回答を得ることができます。これと比較すると、現在のドロップレットベースの方法では、何度もピペティングステップが必要となるのに加えて、反応液を環境中に曝すことになり、クロスコンタミネーションや、実験台やラボの機器が増幅産物により汚染される危険が増します(図2)。

QuantStudio 3D デジタルPCRシステムは、高密度ナノフルイディックチップテクノロジーを利用して、サンプルを20,000個の独立した反応ウェルに分割します。チップには均一なサイズのウェルがあり、直接的で頑健なサンプル分割を可能とするので(図3)、1回の操作で数千ポイントのデータを解析することが可能です。一方ドロップレット法はエマルジョンPCRを使用しており、その結果はとても変動が大きくなってしまいます。

ゴールドスタンダードであるApplied Biosystems™ TaqMan™ アッセイはデジタルPCRにも最適です。なぜなら、TaqManケミストリでは定量PCR実験における疑陽性を最小限に抑えられるため、メルトカーブ分析をする必要がないからです。当社では、800万種類以上のプレデザインのTaqManアッセイを提供しており、QuantStudio 3D デジタルPCRシステムを用いてデジタル解析を実施するにあたり、アッセイ選択における出発点となります。



図2. チップベースのデジタルPCRワークフロー：ドロップレットベースのワークフローと比較すると、よりシンプルで安定しています。QuantStudio 3D チップベースデジタルPCRワークフローのピペティングのステップは最小限であり、一度チップをクローズしてしまえば完全にシールされます。一方、ドロップレットベースのアプローチでは、より多くのピペティングステップや溶液の移しかえステップがあり、サンプルのコンタミネーションがおこる恐れも高くなります。

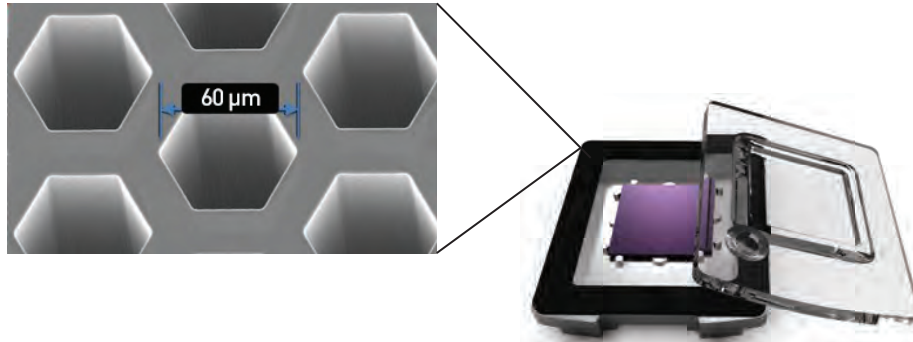


図3. QuantStudio 3D デジタルPCR 20Kチップ。各チップには均一なサイズの20,000個の反応ウェルがあり、最適化されたローディングが可能です。この数は1つのサンプルには十分な数です。1サンプル/チップなのでもう1回のランに十分なサンプル数が集まるまで待つ必要はありません。

信頼性の高い絶対定量

QuantStudio 3D デジタルPCRシステムによって算出されたそれぞれの答え (copies/ μ L) に対して、データ品質の評価が行われます (図4)。それらのデータの品質があまり良くなかったり、不合格だったりする場合には、2次解析で更に再確認を行うことを促すフラグが適切に付加されます。AnalysisSuite™クラウドソフトウェアは2次解析をサポートしており、クラウドベースの当社のユーザーアカウントを利用することで、インターネットに接続されたどのコンピューターからでも解析が実行可能です。必要であれば、データの移動はシームレスかつ自動で行われます。内部ネットワークやUSBフラッシュドライブなど従来の方法を用いたデータ移動も可能です。

特定のアプリケーションのために、更にデータのQCを進めたり、複数チップの解析を行ったりする場合には、QuantStudio 3D AnalysisSuiteソフトウェアが利用できます。チップのデータは安全な環境にアップロードされ、絶対定量や相対定量など異なるアプリケーションモジュールを使用して解析が行われます。また、ビジュアル化を行うことでチップの確認、クラスターリング、コピー数の計算などが可能です (図4)。

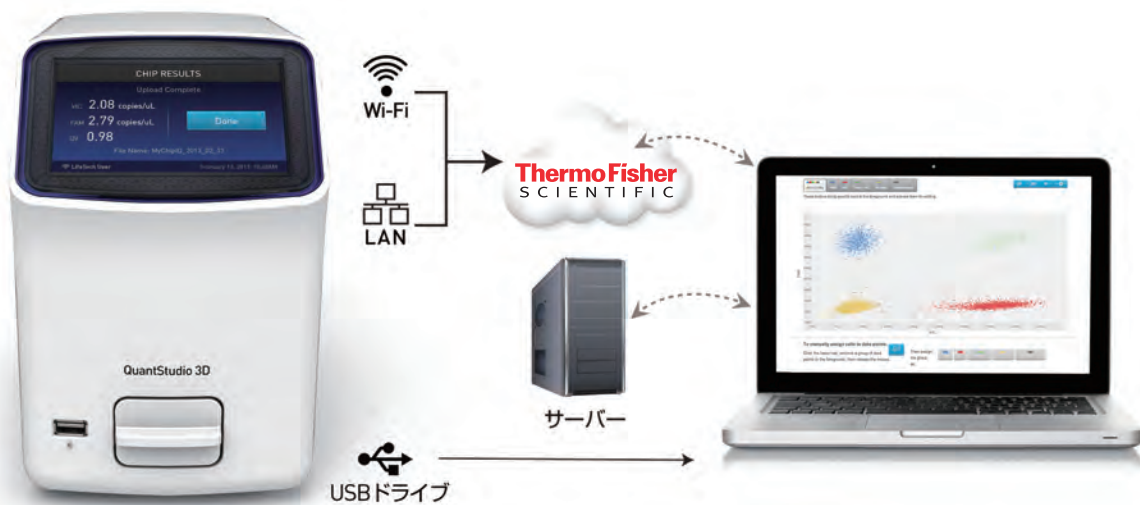


図4. QuantStudio 3D デジタルPCRシステムを用いて行った1次解析。装置本体のタッチパネル部にはコピー数/ μ Lで表した絶対定量の結果およびクオリティフラグが表示されます。データファイルはウェブ上のパーソナライズされたクラウドベースの当社のユーザーアカウントを通じて自動的にQuantStudio 3D AnalysisSuite ソフトウェアに転送されます。クラウドにアクセスする代わりに、スタンドアロンのサーバーを利用することも可能です。QuantStudio 3D AnalysisSuite ソフトウェアで相対定量モジュールを使用したデータ解析の例をラップトップパソコン*のスクリーンに表示しています。複数チップからのデータを自動的に統合し、自動的にレアイベントおよび野生型イベントを色分けした散布図を自動的に表示させる機能は、稀少なアレルの検出などに最適です。さらには、レアタイプと野生型タイプ、および不明なタイプとの境界をマニュアルで設定することも可能です。

*QuantStudio 3D デジタルPCRシステムには、コンピュータは含まれません。

あなたのアプリケーションにふさわしいパフォーマンス

精度の高さはデジタルPCRの主要な特長ですが、精度は反復の数（チップの反応ウェルの数）が増えるほど高くなります。チップあたり20,000個の反応ウェルのおかげで、QuantStudio 3D デジタルPCRシステムでは高精度が実現されています（図5および6）。このレベルのパフォーマンスは、CNV解析やレアアレル検出、あるいは低発現遺伝子の検出などのアプリケーションで重要です。

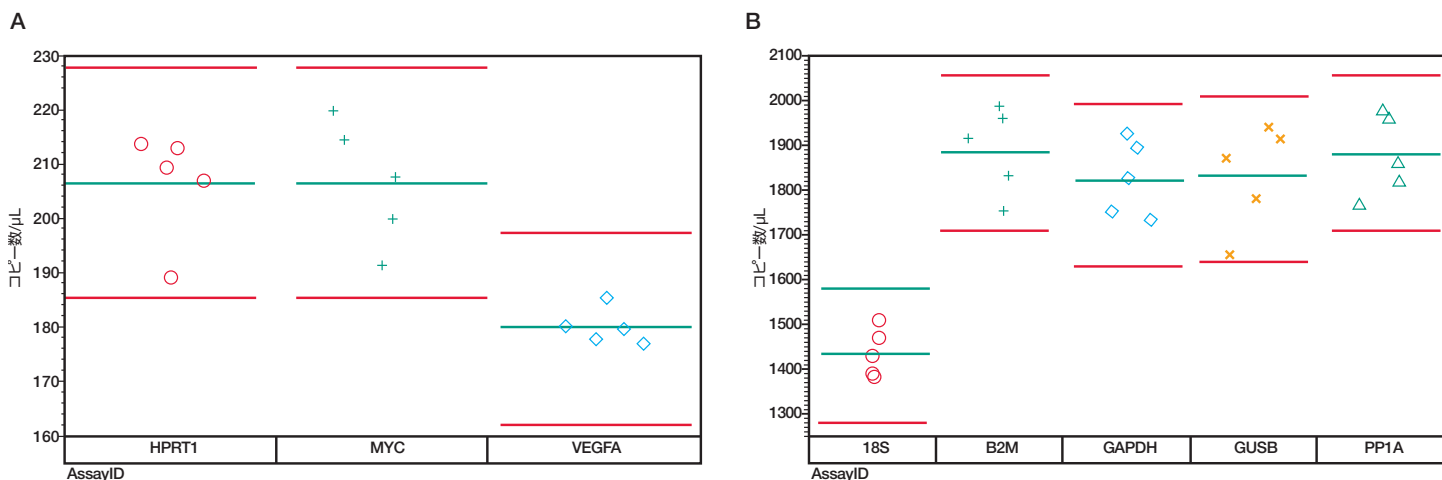


図5. QuantStudio 3D デジタルPCRシステムの精度。Applied Biosystems™ TaqMan™ Gene Expressionアッセイの8種のアッセイパネルに渡って5個の独立したテクニカル反復を置きました。すべての測定はそれぞれの平均値（緑線）の±10%（赤線）の範囲内に収まりました。(A) 低発現遺伝子—HPRT1、MYC、およびVEGFA (B) より高発現の遺伝子—18S、B2M、GAPDH、GUSB、およびPP1A

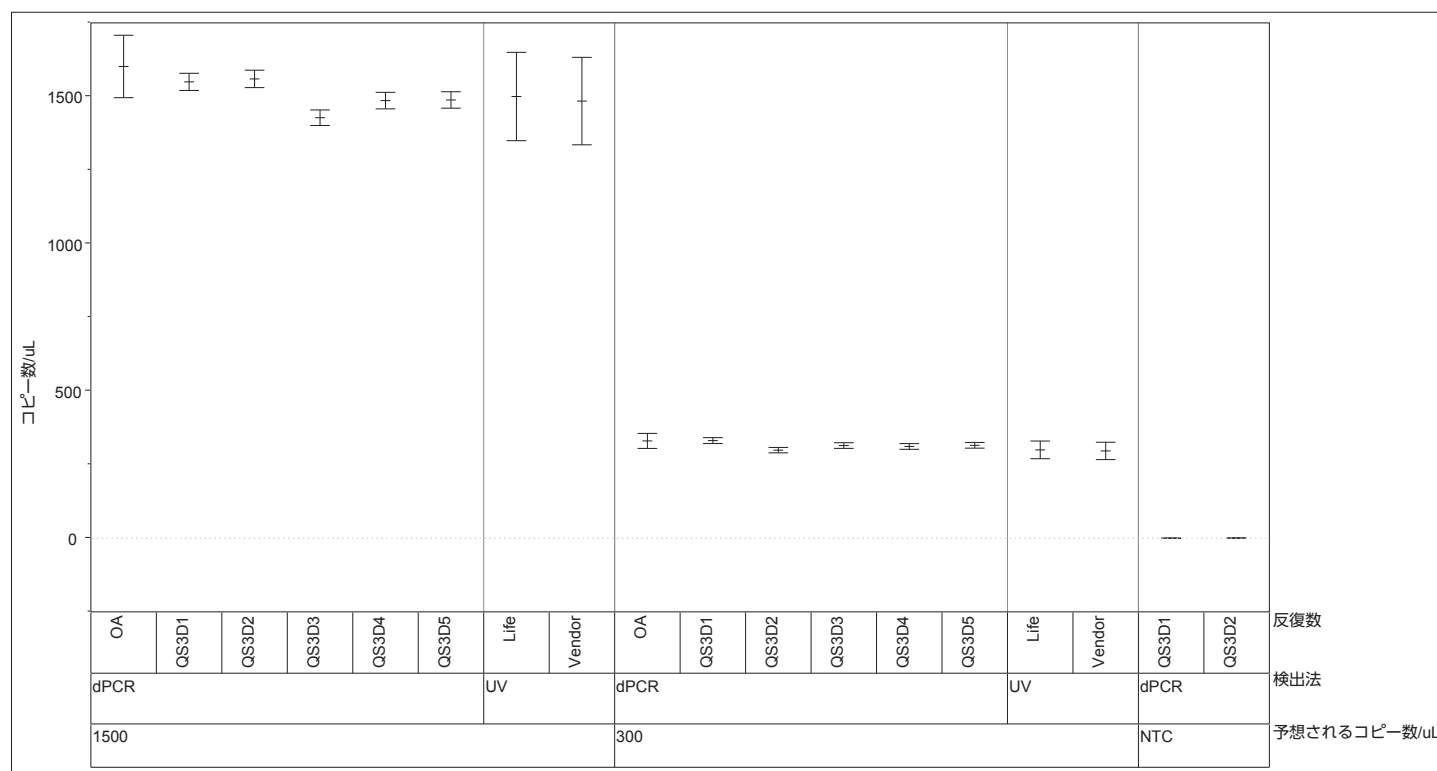


図6. QuantStudio 3D デジタルPCRシステムの精度。絶対定量におけるQuantStudio 3D デジタルPCRシステムの精度を独立する2つの定量法に従って評価しました。オスのゲノムDNA (Promega) を使用し、UV分光光度計とデジタルPCRで2つの濃度のコピー数/μLを測定・比較しました。UV分光光度計ではPromegaが測定した値 (Vendor) と当社で測定した値を示しています。また、デジタルPCRはApplied Biosystems™ QuantStudio™ 12K Flex OpenArray™ デジタルPCRプレート (OA) および 5つの反復をQuantStudio 3D デジタルPCRシステム (QS3D) で測定しました。ベンダーによって記録されたターゲット濃度は、2つのサンプルについてそれぞれ300 コピー/μL と1,500 コピー/μLでした。それぞれの測定値はベンダーの想定する値の範囲に収まっていますが、他の方法で得られた値と比較するとQuantStudio 3D デジタルPCRシステムで得られた測定値がもっとも高い精度を示しました。

コピー数解析における精度

QuantStudio 3D システムによるコピー数解析における精度を、Coriell repositoryから調達した9個体のゲノムDNAサンプルを用いたパネルについて測定しました。17番染色体の長腕にある遺伝子座CCL3L1に特異的なApplied Biosystem™ TaqMan™ Copy Numberアッセイと、6もしくは

は8反復の測定を行った結果、サンプルはゲノム当たり0から8のコピー数を示しました(図7A)。7コピーと8コピーを含むサンプル間の差を統計的に有意に検出することができ、デジタルPCRが1.2倍の違いを区別することが可能であることが確認されました。(図7B)。

A

サンプル	反復数	予想されるコピー数	検出されたコピー数 (平均値)	標準偏差	CV (%)
NA17245	6	0	0.08	0.06	N/A
NA17251	6	1	0.98	0.02	2.21
NA17258	6	2	1.96	0.05	2.47
NA17132	6	3	2.98	0.06	1.85
NA19194	8	4	4.00	0.05	1.22
NA18507	8	5	5.11	0.13	2.50
NA17110	8	6	5.91	0.12	2.07
NA17202	8	7	7.02	0.07	1.02
NA18854	8	8	7.95	0.20	2.55

B

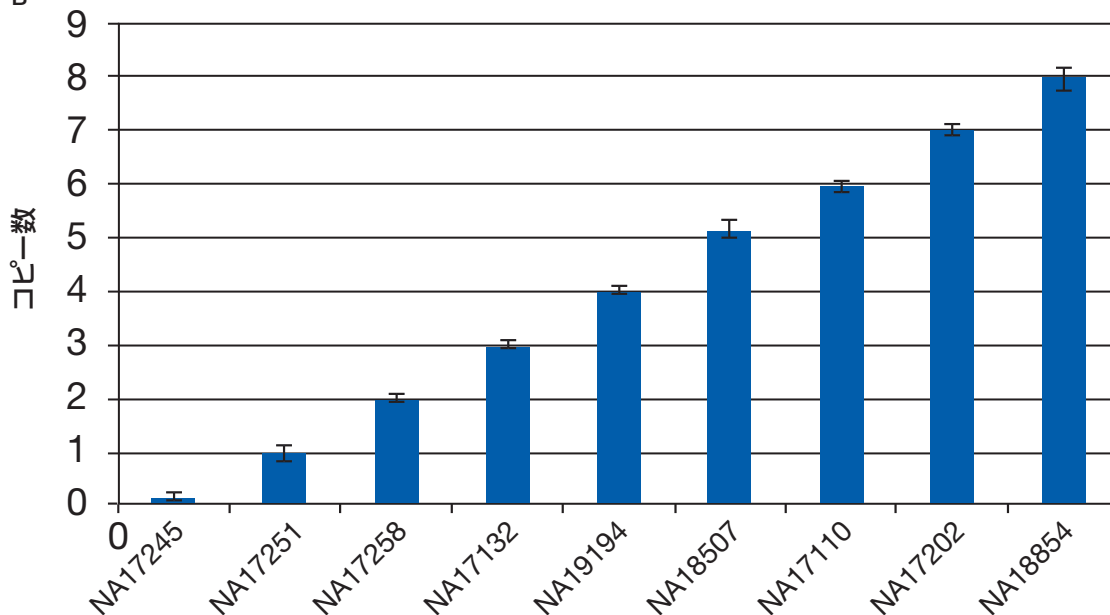


図7. 17番染色体のCCL3L1遺伝子座のターゲットを0コピーから8コピー含む9つの独立したDNAサンプルを用いたコピー数分析で示した精度。(A) 実験デザインおよびテストしたサンプルセットで得られたデータ。それぞれのデジタルPCRの測定値は、予想された値に標準偏差の範囲内でオーバーラップしました。すべての測定でCV(変動係数)値が2.55%以下であり、高い精度が達成可能なことが示されました。(B) Aで示された同じデータのグラフィカルな表示。達成された精度から、デジタルPCRでは、7コピーと8コピーを含むサンプルを識別可能であると言えます。

ダイナミックレンジ

デジタルPCRは、従来のリアルタイムPCR技術と比較すると原理的にダイナミックレンジが狭くなりがちです。しかし、20,000個の反応ウェルを使用するQuantStudio 3D デジタルPCR 20Kチップでは、理論的に5logのダイナミックレンジを持つので、多くの重要なデジタルPCRアプリケーションを実施可能です。

感度

がん研究など、いくつかの研究分野では、多数の野生型細胞のなかにわずかに存在する少数の遺伝的変異を検出しなければならず、これには技術的な困難を伴います。このような稀な変異の検出においては、多数の野生型細胞集団のバックグラウンド中で変異を識別することのできる高感度なアッセイを用いる必要があります。標準的なApplied Biosystems™ TaqMan™ SNP Genotypingアッセイを利用したデジタルPCRはその1つといえます。サンプルを数千もの個別のPCR

反応に分割することにより、反応を行う分子の総数が大幅に減少するのに伴い、目的の塩基配列を持つ分子が効果的に濃縮され、野生型のバックグラウンド分子は希釈により排除されます。このような変異分子は、野生型分子との対比において稀というだけでなく、絶対的な意味で稀ということになります。デジタルPCRのコンセプトでは、1分子を増幅可能な能力が重要であり、これにより30コピーあるいはそれ以下のターゲットを検出することができるのです(図8)。

あなたのアプリケーションに必要とされる高いパフォーマンス

QuantStudio 3D デジタルPCRシステムは、稀少なターゲットの検出や病原体やGMOの検出、CNV分析、スタンダードの定量などのアプリケーションに必要とされる感度および精度を提供します。シンプルで安定したオペレーションが可能なおと、あるいは密閉されたチップのデザインなどの特長により、QuantStudio 3D デジタルPCR システムは多くのラボに高パフォーマンスの手近な定量手段を提供します。

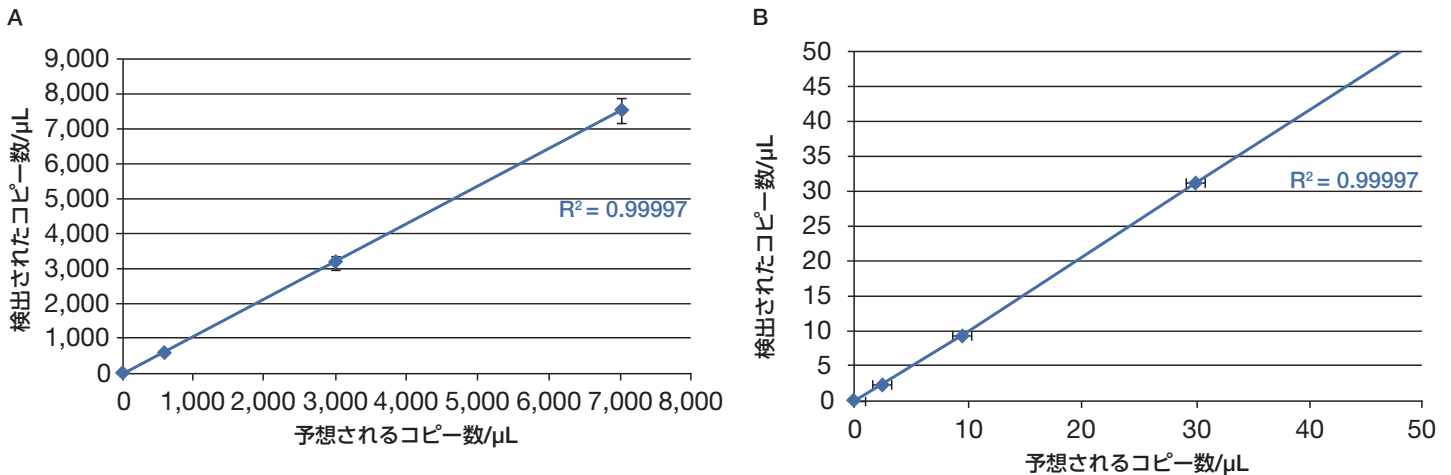


図8. QuantStudio 3D デジタルPCRシステムは30分子以下でも検出可能です。(A) ゲノムDNAはUV分光光度計で定量し、7,000 copies/μLから2.5 copies/μLの希釈系列を作成した後、QuantStudio 3D デジタルPCRで測定を行いました。(B) 測定範囲の低濃度側を見やすくするために拡大しています。

QuantStudio 3D デジタルPCRシステム仕様

QuantStudio 3D デジタルPCR システム	
ラン所要時間 (チップ読み取り時間)	約1分
PCR検出法	エンドポイント
光源	LED
サンプル検出	CMOS
検出チャンネル	FAM、VIC、(ROX) *
リーダーのサイズH x W x D	21 x 13.5 x 23.25 cm
重量	2.4 kg

QuantStudio 3D デジタルPCR 20Kチップ (QS3D Chips)	
パーティション	チップの反応ウェル
チップ当たりのサンプル数	1
チップ当たりのターゲット数	2
サーマルサイクラーにセット可能なチップ数	24
サンプル当たりの反応ウェル数	20,000
ローディング容量	14.5 μ L
シールドワークフローの可否	Yes

パフォーマンス	
ダイナミックレンジ	5 logs
95%信頼区間における精度	\pm 10%

*ROXはウェルにおける反応液の存在を検出します。

Ordering information

製品名	サイズ	製品番号
デジタルPCRシステム		
QuantStudio 3D デジタル PCR システム ProFlex PCR システム付 (構成) QuantStudio 3D デジタル PCR システム、デュアルフラットブロックProFlex PCR システム、 QuantStudio 3D ChipLoader、インストールキット、設置・基本取扱説明付	1 式	QS3D-PF (2年保証)
デジタルPCRシステム用消耗品・試薬		
QuantStudio 3D Chips v2 チップ 12枚、リッド 12枚、サンプルローディングブレード 12個、Immersion fluid 3本	12 チップ	A26316
QuantStudio 3D Lids and Blades リッド 12枚、サンプルローディングブレード 12個	12 セット	4485510
QuantStudio 3D デジタル PCR Master Mix v2	1.5 mL	A26358
QuantStudio 3D デジタル PCR Master Mix v2, 5mL	5 mL	A26359
デジタルPCRシステム用アクセサリ		
QuantStudio 3D Chip Adapter Kit for GeneAmp PCR System 9700 / ProFlex	1 個	4485513
QuantStudio 3D Tilt Base for GeneAmp PCR System (ProFlex用)	1 個	A24898
QuantStudio 3D Extended Wi-Fi Adapter	1 個	A28598
QuantStudio 3D AnalysisSuite サーバシステム	1 式	4489085

詳細はこちら www.thermofisher.com/quantstudio3d

研究用のみ使用できます。診断目的およびその手続上での使用はできません。
記載の社名および製品名は、弊社または各社の商標または登録商標です。
標準販売条件はこちらをご覧ください。 www.thermofisher.com/TC
For Research Use only. Not for use in diagnostic procedures. © 2015 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.
TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc., used under permission and license.
Printed in Japan. SDS091-B1509OB

販売店

サーモフィッシャーサイエンティフィック ライフテクノロジーズジャパン株式会社

本社：〒108-0023 東京都港区芝浦 4-2-8

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ jptech@thermofisher.com

オーダーサポート TEL：03-6832-6980 FAX：03-6832-9584

営業部 TEL：03-6832-9300 FAX：03-6832-9580

 [facebook.com/ThermoFisherJapan](https://www.facebook.com/ThermoFisherJapan)  [@ThermoFisherJP](https://twitter.com/ThermoFisherJP)

www.thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC