

## デジタルPCRを用いた実施例

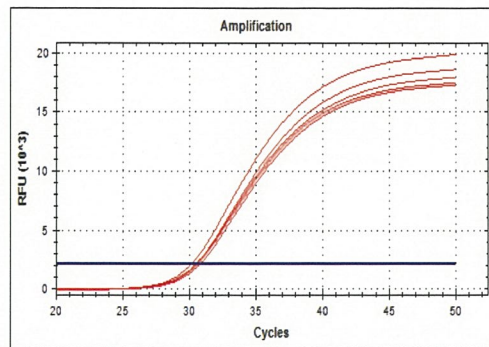
- ・1 miRNAの絶対定量での比較
- ・2 CNV測定
- ・3 トランスジェニックマウスのホモヘテロ判定
- ・4 遺伝子欠損領域の確認
- ・5 次世代シーケンサーのライブラリー定量
- ・6 シングルセルアッセイ



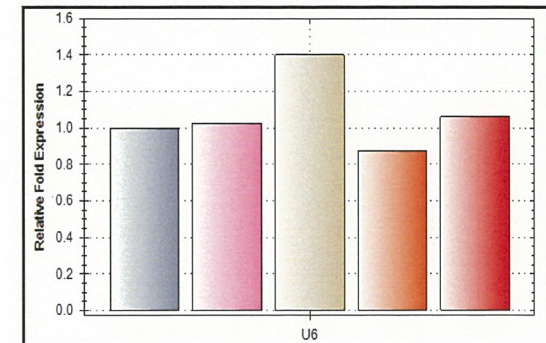
## 実施データ例1 : miRNAの定量

- TaqMan® MicroRNA Assays (ライフテクノロジーズ社)キットを利用

リアルタイムPCR



$\Delta C(t)$ 法による  
相対定量

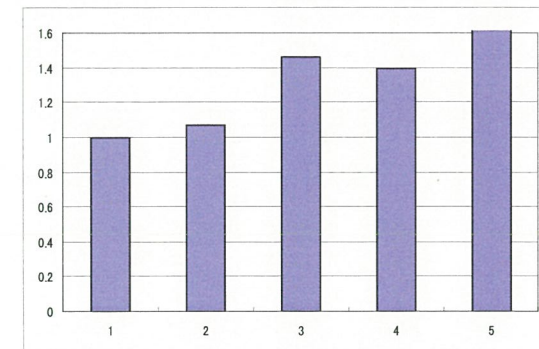


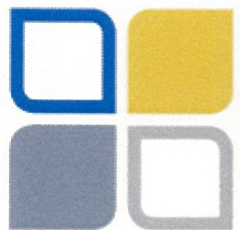
リアルタイムPCRでは、miRNA実験ではスタンダードを作成することは困難です。

デジタルPCR

Assay	Concentration (copies/ul)	Positives	Negatives
U6	34.1	374	11872
U6	36.6	469	13838
U6	49.8	531	11448
U6	47.6	524	11844
U6	55.7	643	12372

絶対定量での  
比較



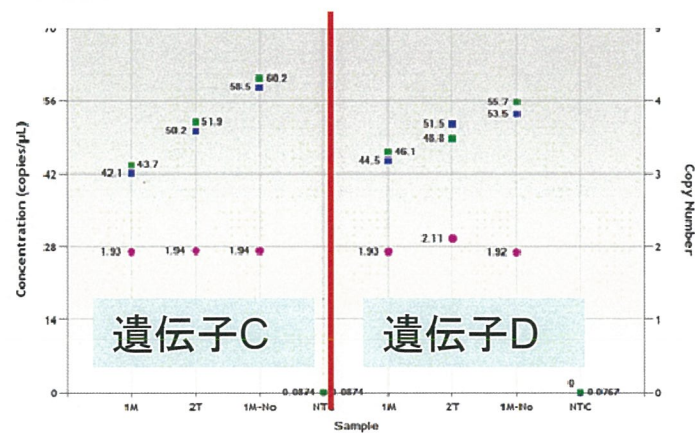
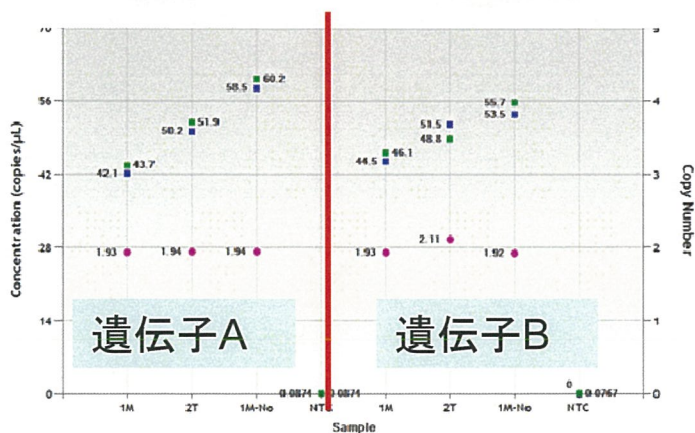


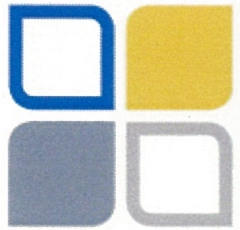
## 実施データ例2: CNV測定

- Universal Probe Library (UPL)® (ロシュ社)の利用  
UPLは165種類のおよそ8ベースのTaqManProbeで、配列決定されたあらゆる生物種の数百万ものアッセイを実施できます。  
データベースが公開されており、様々な箇所にプローブの使いまわしが可能です。  
多ターゲットの場合、コスト削減に適しています。

<http://www.roche-biochem.jp/sis/2010/07/post-187.html>

### 1種類のプローブで4遺伝子のCNV測定した結果



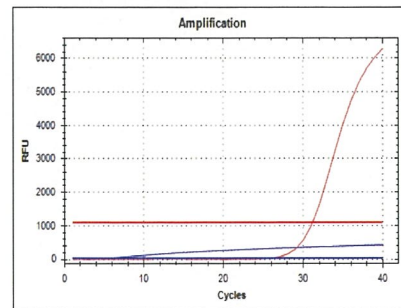


# 実施データ例3:トランスジェニックマウスの判定

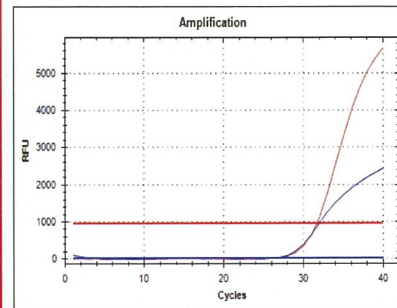
ホモ・ヘテロの判定はリアルタイムPCRでは判別が困難です。

リアルタイムPCR

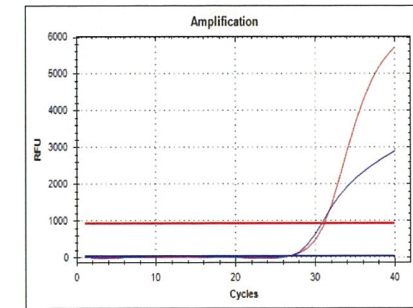
野生株 (+/+)



ヘテロ (Tg/+)

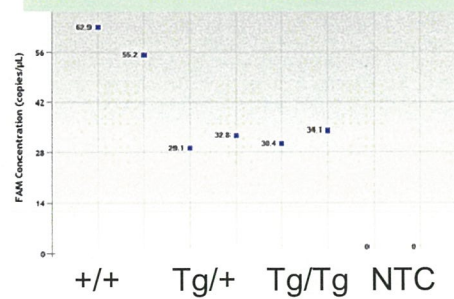


ホモ (Tg/Tg)

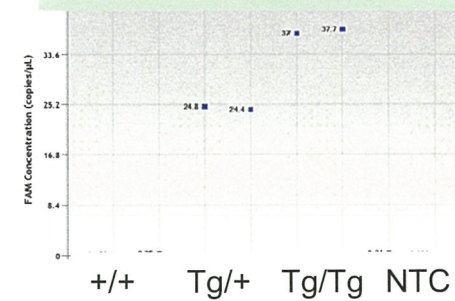


デジタルPCR

コントロール遺伝子



ターゲット遺伝子





# 実施データ例4: 遺伝子欠損領域の確認

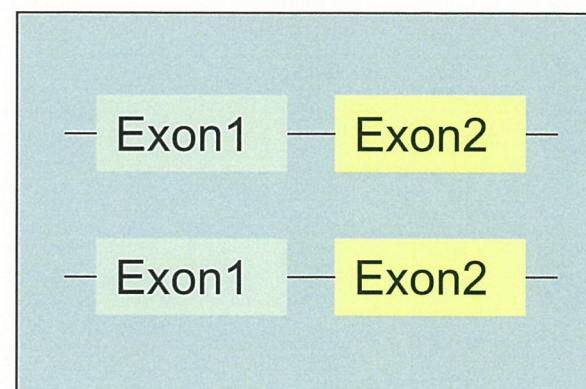
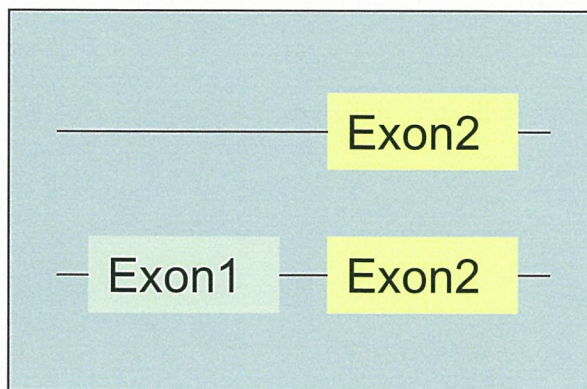
DNAチップ、次世代シーケンサーでも、判別は困難です。

疾患変異体

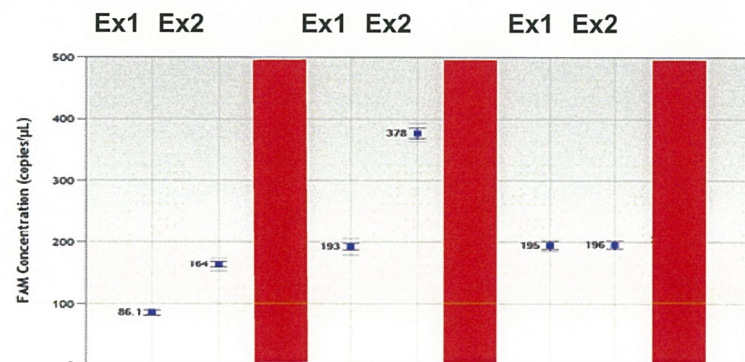
正常体

染色体 A ♂

染色体 A ♀



デジタルPCR



サンプル1

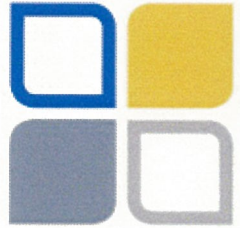
サンプル2

サンプル3

欠損

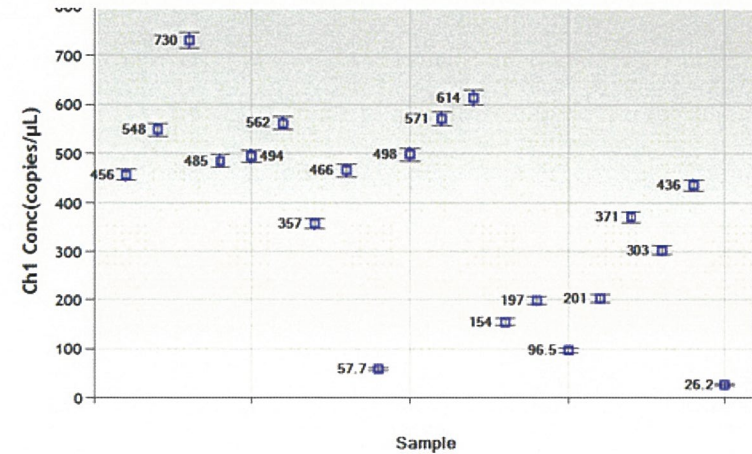
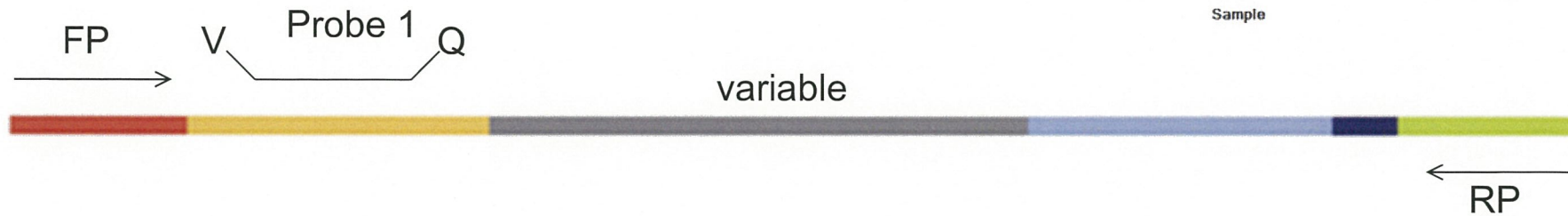
欠損

正常

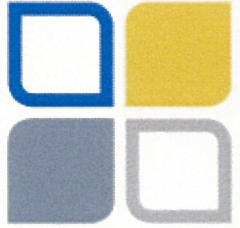


## 実施データ5: シーケンスライブラリーの定量

- ライブラリー周辺の構造



- ライブラリーには様々なサイズのDNAフラグメントが存在するが、デジタルPCRでは、全て1本としてカウントします。



## 実施データ6: シングルセルアッセイ

- ソーティングしたシングルセルを溶解し、逆転写を行い、これをテンプレートにデジタルPCRで各遺伝子を定量した。

