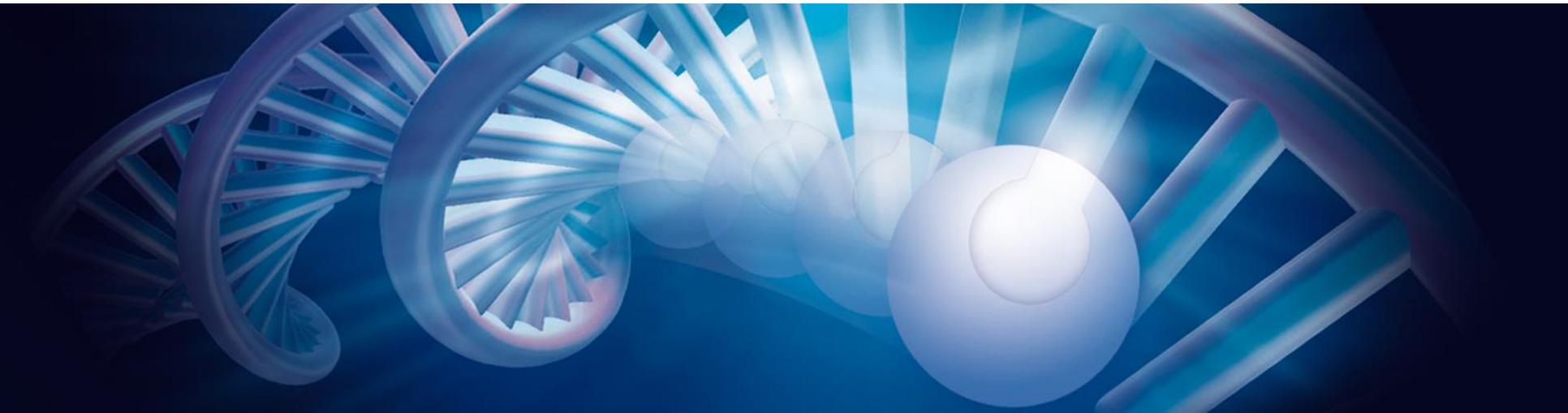


PCRの基礎とコバスLiat概要

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社



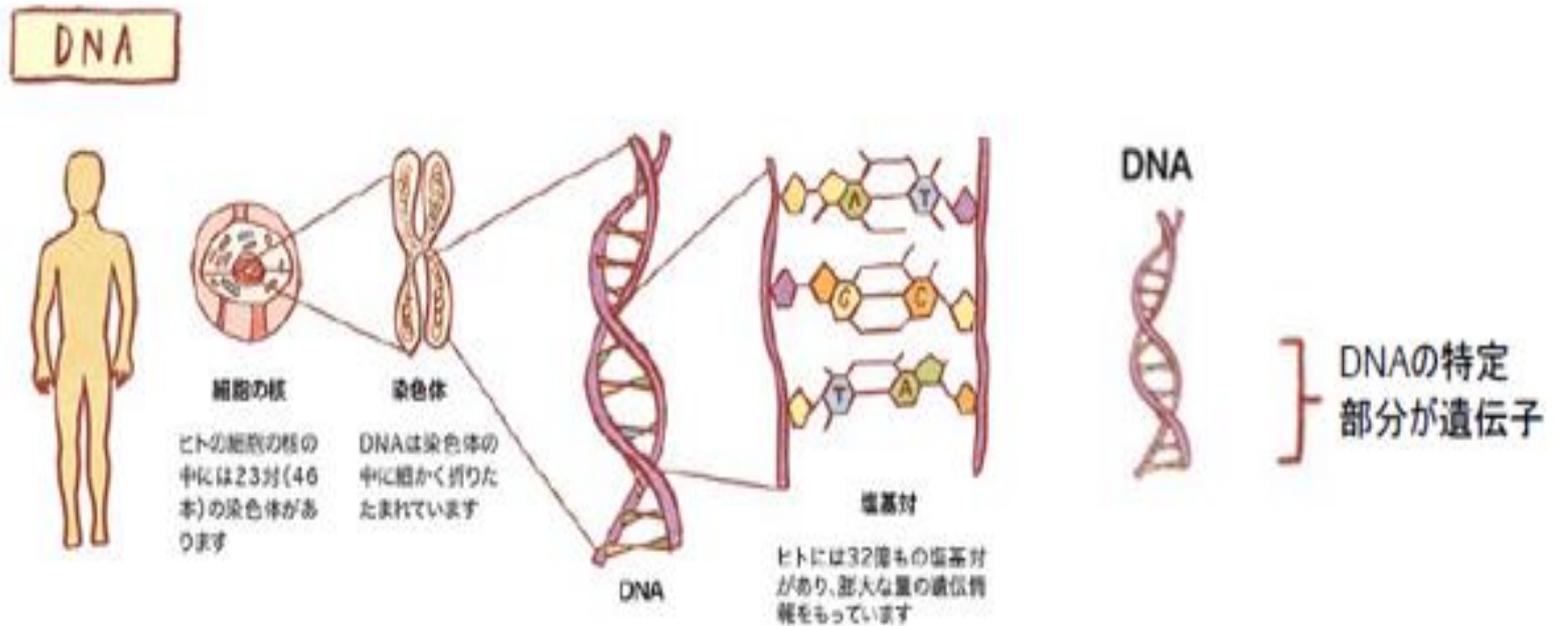
本日の内容

- **遺伝子の基礎**
- **エンドポイントPCRとリアルタイムPCR**
- **内部コントロール**
- **コバスLiat概要**

A large, abstract orange watercolor splash that covers the middle and lower portions of the slide. The splash has irregular, organic edges and varying shades of orange, from light to dark, with some darker spots and a textured appearance.

遺伝子の基礎

細胞 > 染色体 > DNA

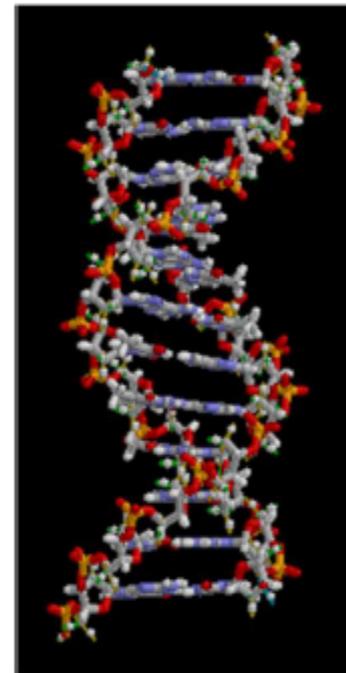


中外製薬よくわかるバイオ・ゲノムより

DNAの性質

重要なDNAの性質

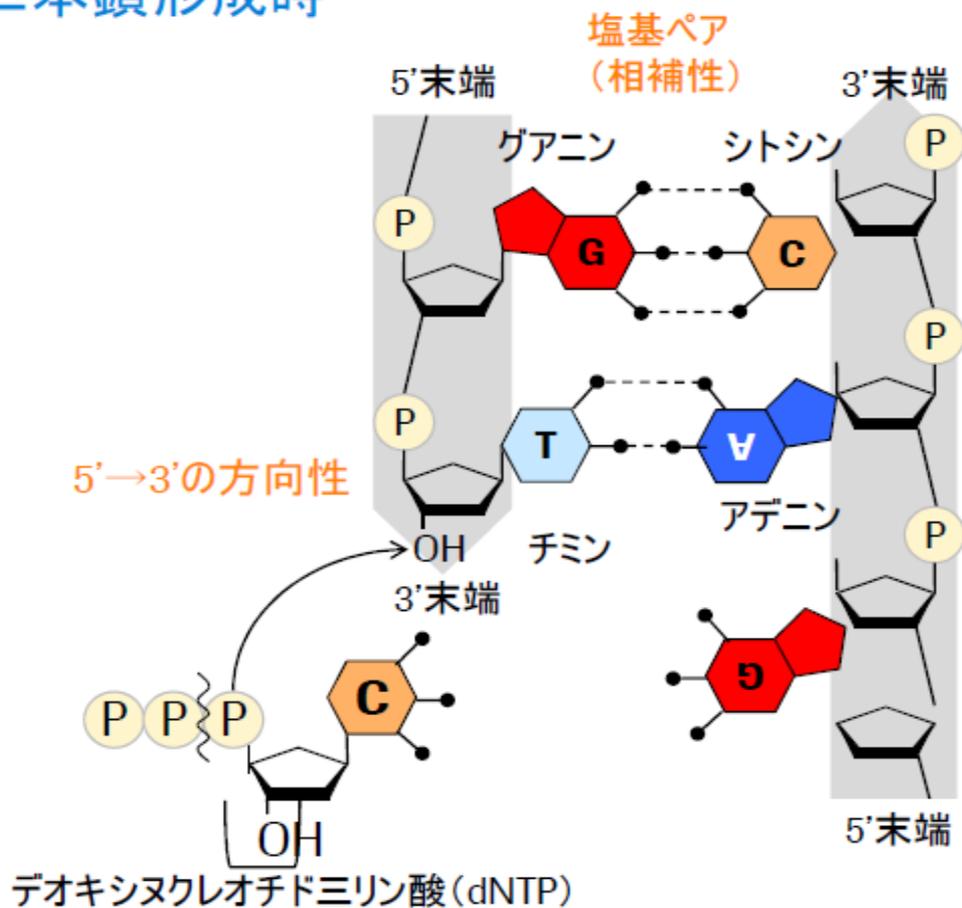
- 相補性
ペアになる塩基が決まっている
- 方向性
DNA鎖には向きがある
- 変性と会合: 可逆性
二本鎖DNAは温度により変性(解離)、会合する



DNAの性質

相補性と方向性

二本鎖形成時



DNA

= **D**eoxyribo **N**ucleic **A**cid

-  リン酸基
-  デオキシリボース
Deoxyribose
-  水素結合

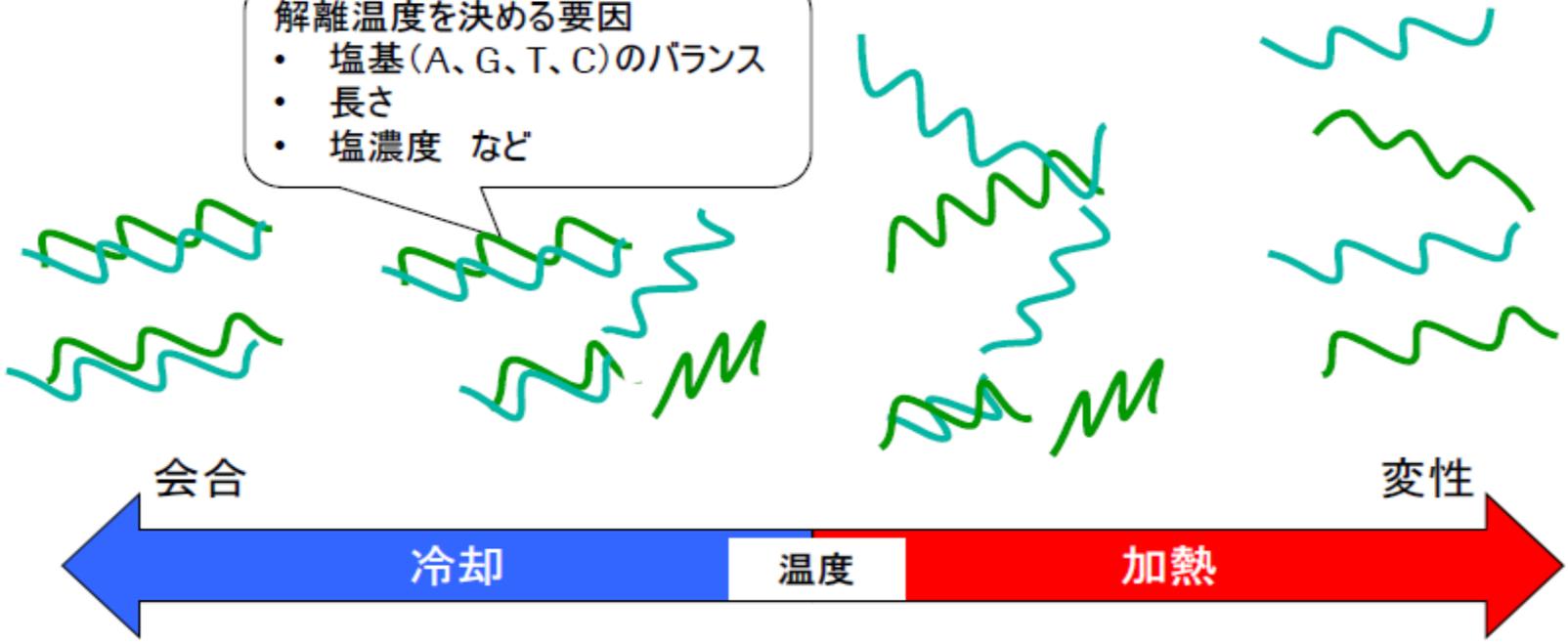
※イメージ

DNAの性質

DNA鎖の変性と会合

DNA鎖は温度により、何度でも変性（一本鎖への解離）と会合（二本鎖形成）する

- 解離温度を決める要因
- 塩基(A、G、T、C)のバランス
 - 長さ
 - 塩濃度 など



二本鎖DNAの50%が一本鎖に変性する温度を『**Tm値**』と呼ぶ

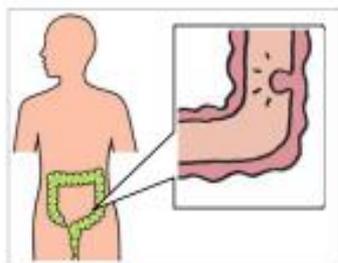
遺伝子関連検査



病原体核酸検査:

病原体(ウイルス、細菌等微生物)の核酸(DNA / RNA)を検出・解析する検査

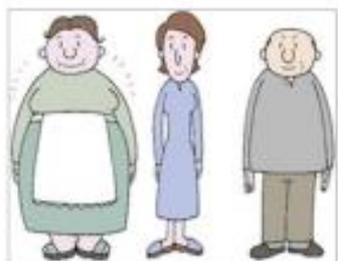
例) 肝炎ウイルス関連・EBV DNA、CMV DNA・淋菌及びクラミジア rRNA・抗酸菌核酸同定・インフルエンザ、SARS コロナウイルス・HTLV-1、HIV-1・HPV ジェノタイプ・薬剤耐性遺伝子・MRSA



体細胞遺伝子検査:

疾患病変部・組織に限局し、病状とともに変化する一時的な遺伝子情報を明らかにする検査

例) 癌関連遺伝子検査・白血病・悪性リンパ腫関連遺伝子検査・Major BCR-ABL1 変異解析・WT1 mRNA・免疫関連遺伝子再構成・EGFR 変異解析・BRAF V600 変異解析・RAS 遺伝子変異解析・サイトケラチン 19 mRNA



生殖細胞系列遺伝子検査:

個体が生来的に保有する遺伝学的情報を明らかにする検査; 原則的に生涯変化しない

例) 各種遺伝学的検査

参照:

「遺伝子関連検査検体品質管理マニュアル」
平成 28 年度「臨床検査における品質・精度の確保に関する研究」(厚生労働行政推進調査事業費補助金(厚生労働科学特別研究事業))報告書より一部改より

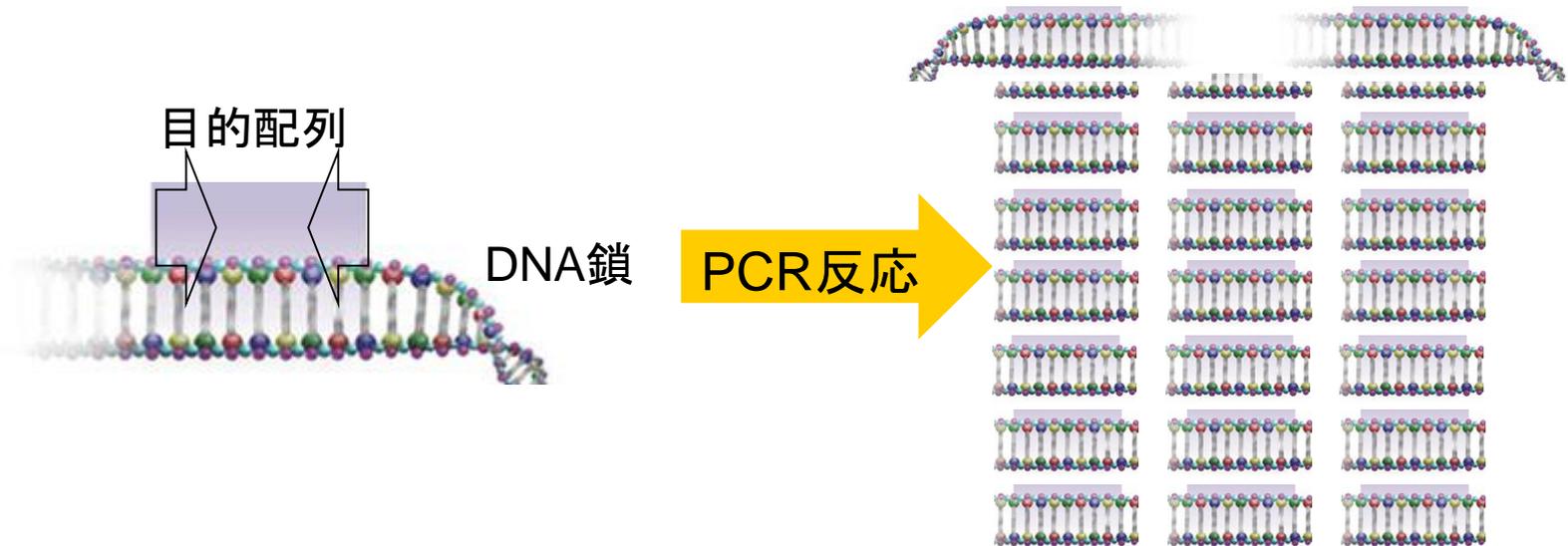
A large, abstract orange watercolor splash that covers the middle section of the slide, serving as a background for the title text.

エンドポイントPCRとリアルタイムPCR

PCRとは？

DNA配列を増幅する技術

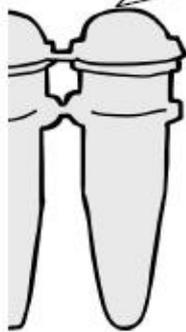
Polymerase **C**hain **R**eaction（ポリメラーゼ連鎖反応）の略
遺伝子検査したい特定のDNA配列を狙って増幅する



- ◆ 目的遺伝子領域の有/無
- ◆ 目的領域の長さ
- ◆ シーケンシング前の目的領域増幅

PCRの原理

PCRの基本条件



- 検体DNA
- プライマーセット
- 基質: dNTP(デオキシヌクレオチド三リン酸)
(dATP / dGTP / dCTP / dTTP) 
- 酵素: 耐熱性Taq DNAポリメラーゼ 
- 補因子: 塩化マグネシウム(Mg²⁺)
- 緩衝液: Tris-HClベース緩衝液 など

- 温度設定
- サイクル数



サーマルサイクラー
(温度制御ブロック)

PCRの原理

プライマーとは

増幅したい遺伝子に特異的な配列を持つDNA断片

- ✓ プライマーの長さは20-30塩基長(bases)
- ✓ 増幅させたい遺伝子の両側と塩基対を形成できるように2種類必要(プライマーA,B)

遺伝子や、PCR産物の長さ？
塩基対：**Base pair**



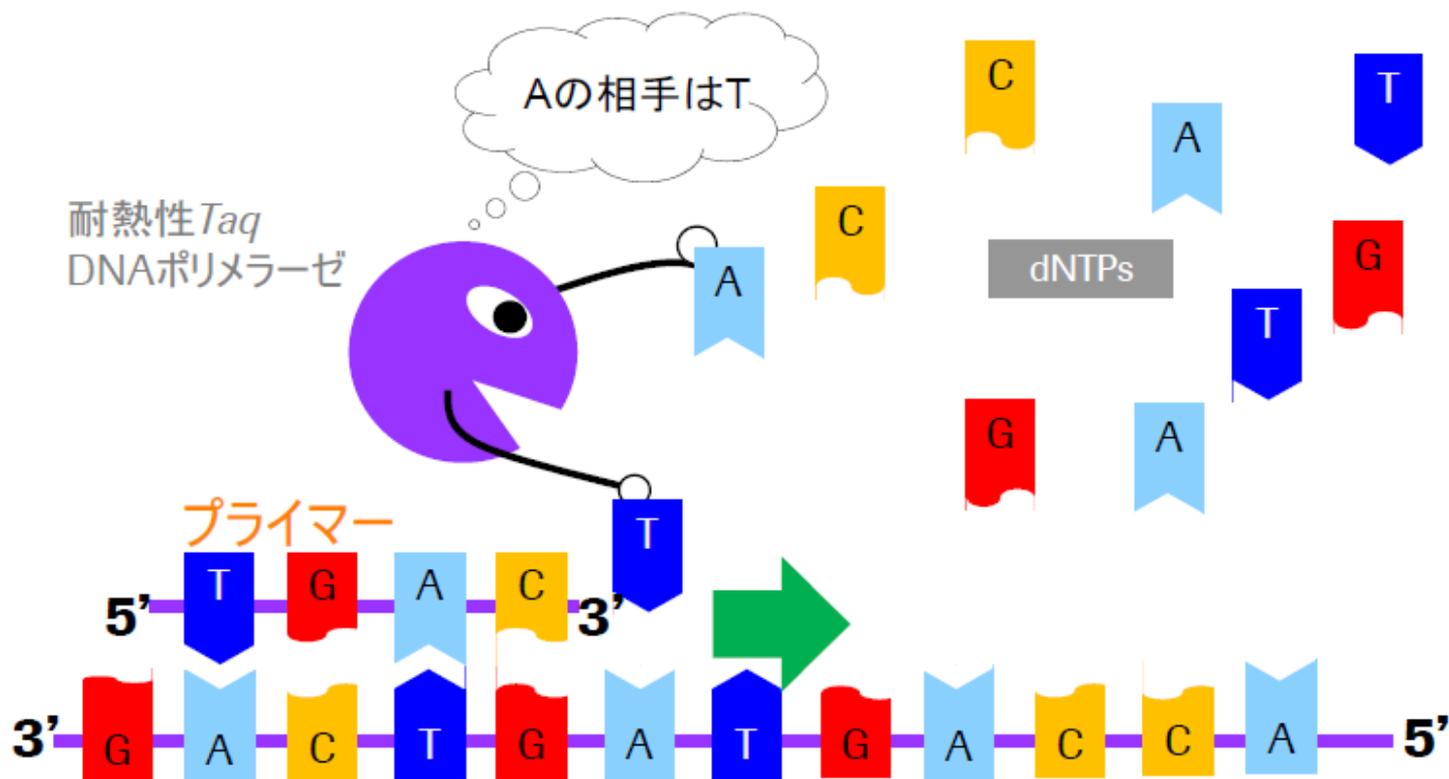
ある決まった配列が出来る確率は？ 20塩基長の場合

$$4 \times 4 \times 4 \times 4 \cdots \times 4 = 4^{20} \approx 1,100,000,000,000 \quad \text{約1兆分の1!}$$

PCRの原理

DNAポリメラーゼとは

プライマーを起点に、検体DNAを鋳型として二本鎖DNAを合成



PCRのステップ

ステップ 1 熱変性

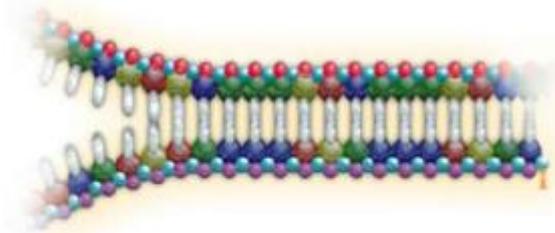
ステップ 2 アニール

ステップ 3 伸長

PCRのステップ

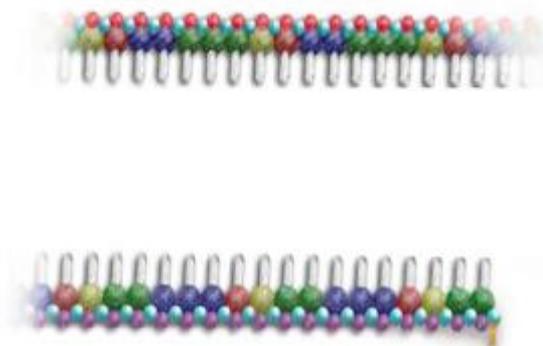
ステップ1 (熱)変性

検体DNA
検出したい遺伝子・鋳型



二本鎖

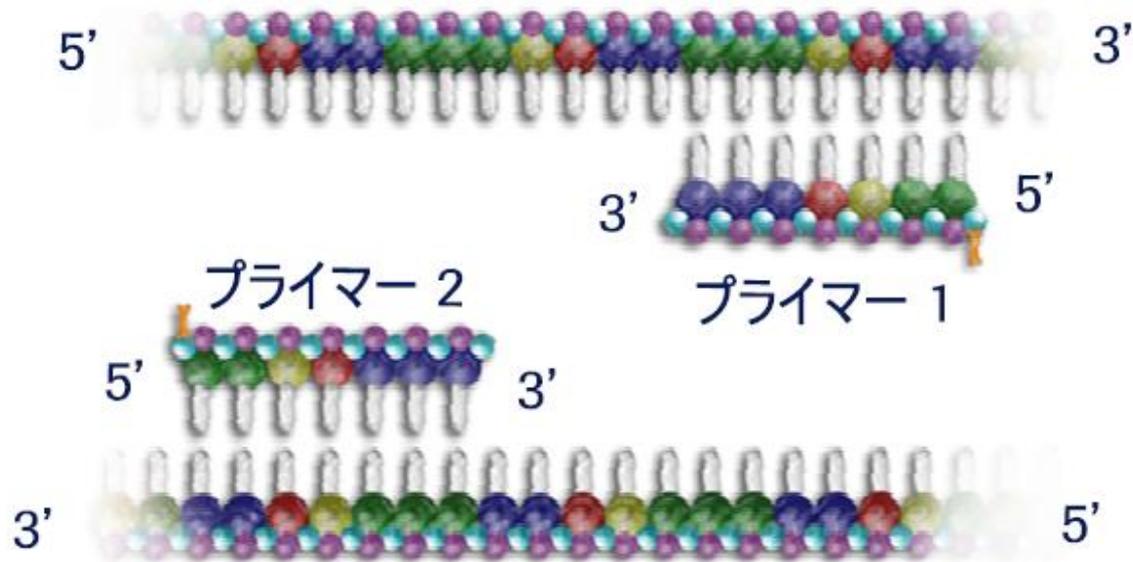
90°C以上の高温



一本鎖に変性

PCRのステップ

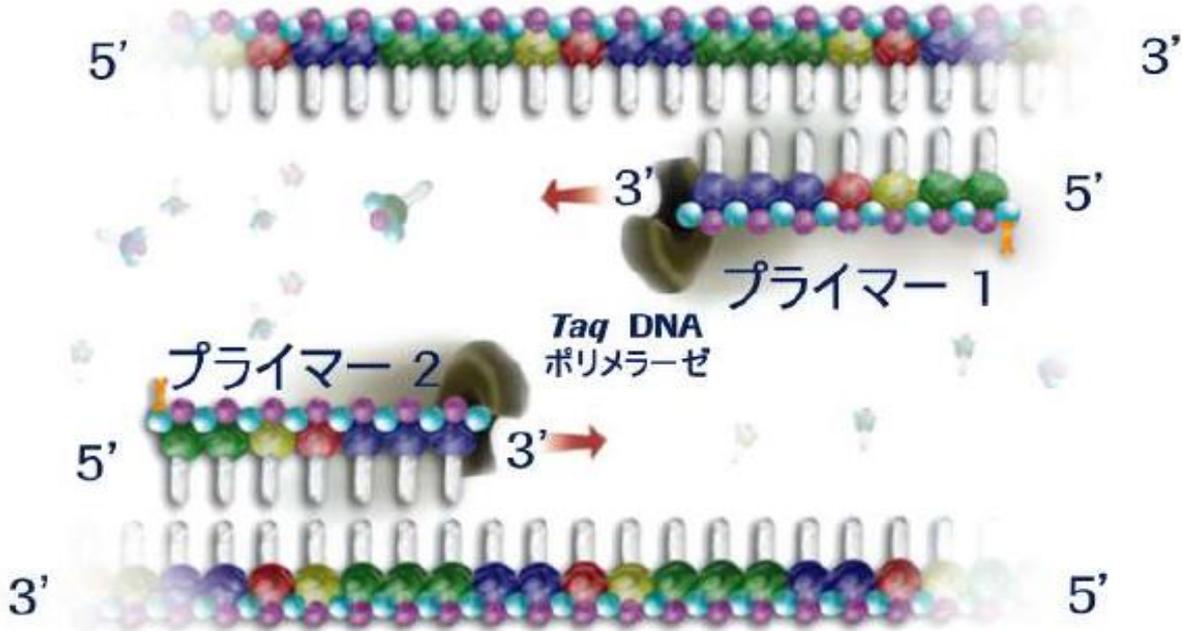
ステップ2 アニール(再結合)



温度を下げる (50~60°C) と、プライマーが相補的に結合し合成のスタート位置となる

PCRのステップ

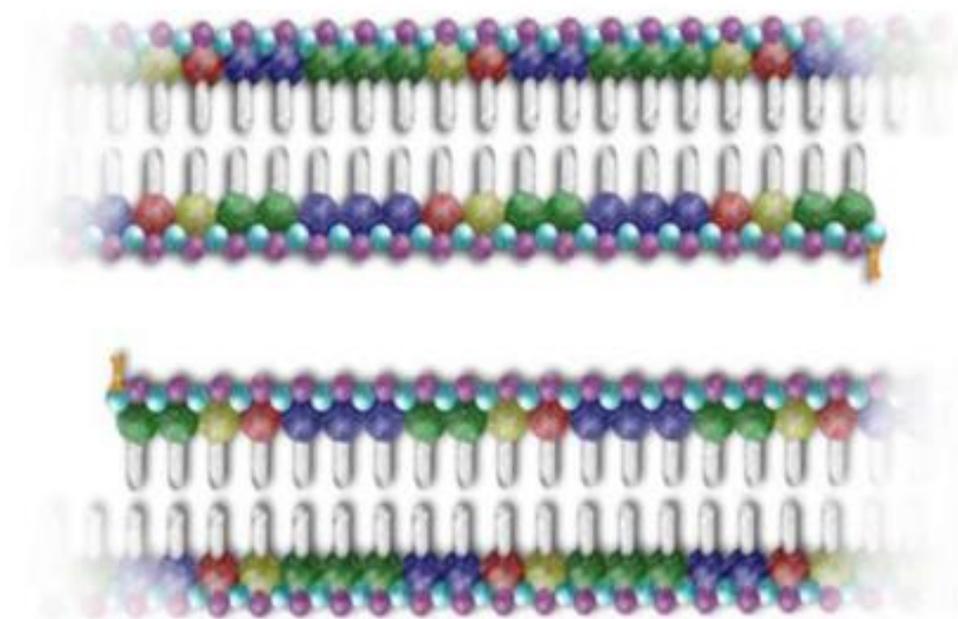
ステップ3 伸長



DNAポリメラーゼが相補的なヌクレオチド三リン酸を付加させ、DNA鎖を合成

PCRのステップ

1本が2本に

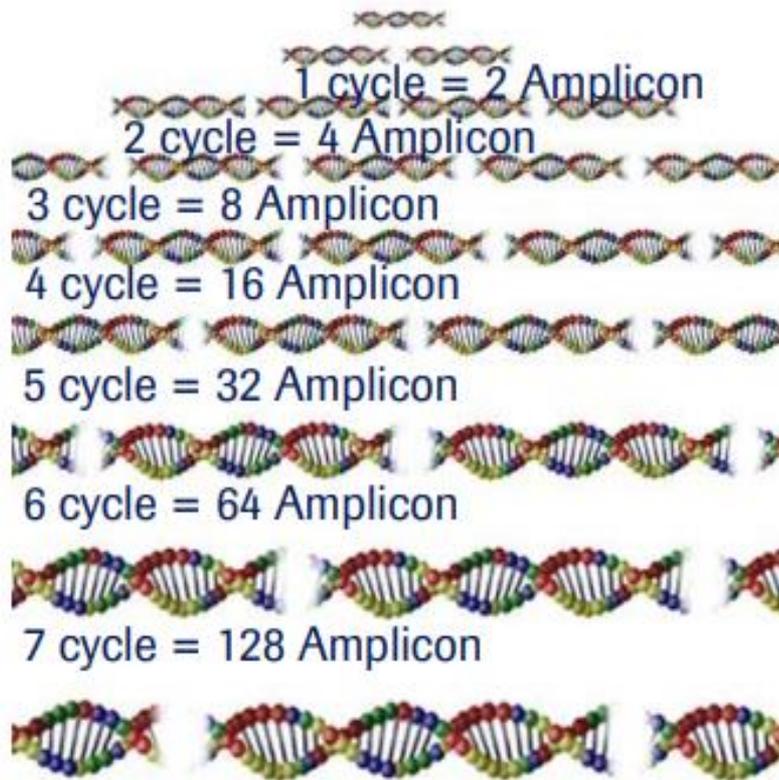


ステップ1～3の温度変化を1サイクルとし、
30～40サイクル繰り返す

PCR増幅のルール

1サイクルで2倍に

特定のDNA配列を短時間で倍々に増幅する



Cycles	ターゲット配列のコピー数
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
20	1,048,576
30	1,073,741,824

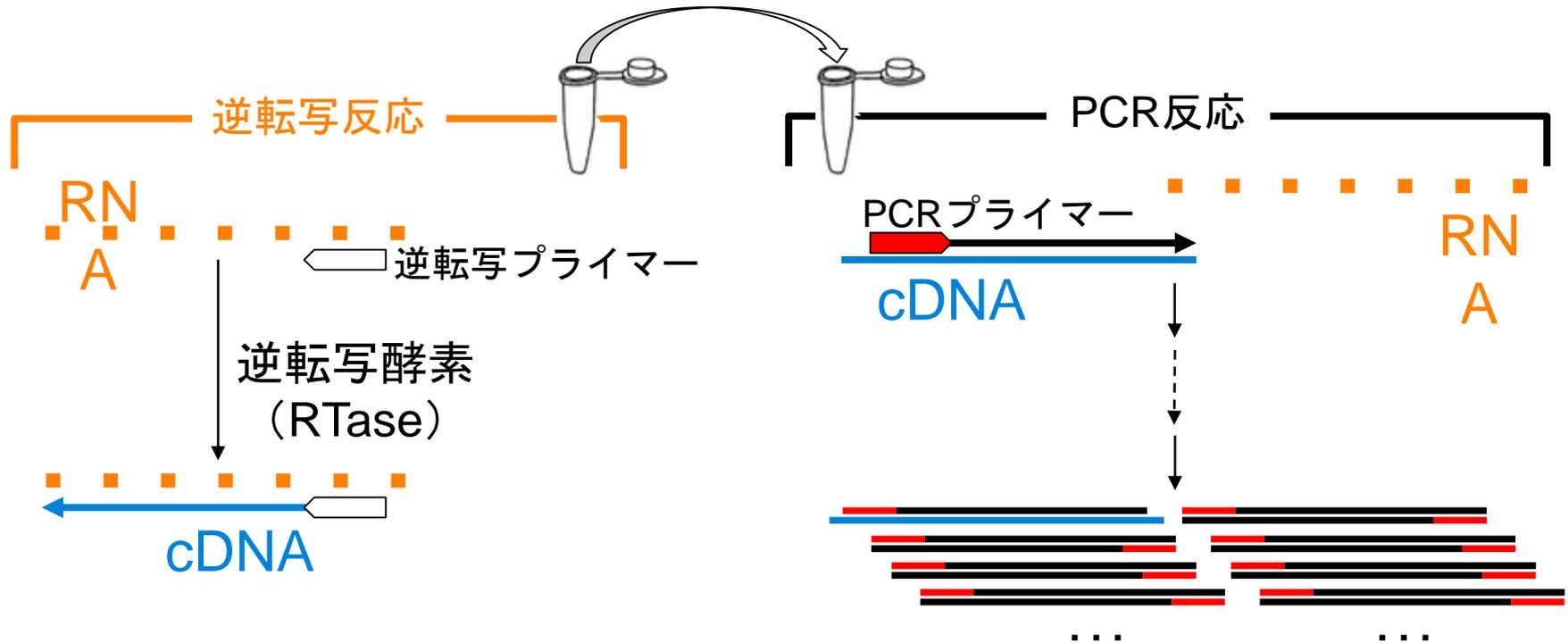
PCRは理論的には指数関数的に増幅する
 Nサイクル後のPCR産物量は
初めのDNA量 $\times 2^N$ と表すことができる

検体がRNAの場合

RT-PCR

PCRはDNAを増幅する技術

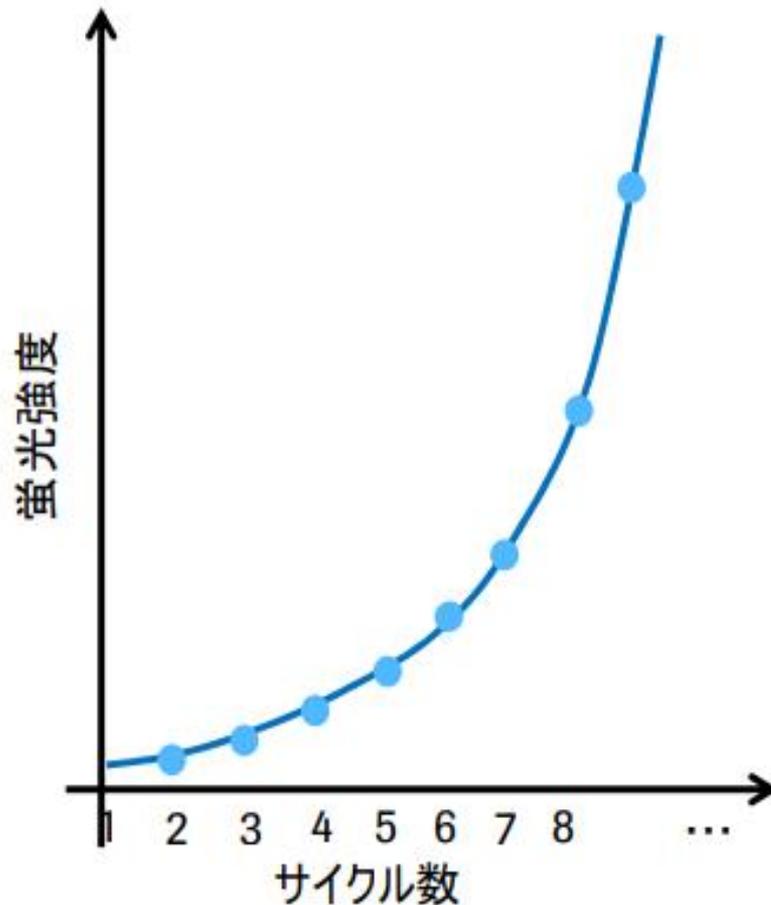
RNAはcDNAに変換（逆転写）してPCRに用いる



両活性を併せ持つポリメラーゼを使用すると、1反応でPCR増幅可能。
例) *Tth*ポリメラーゼ、Z05ポリメラーゼ

リアルタイムPCRの基礎

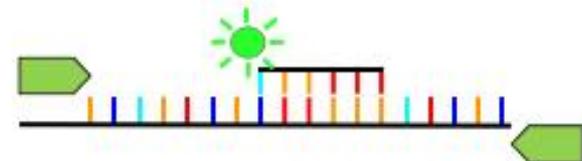
PCR反応をモニタリングする技術



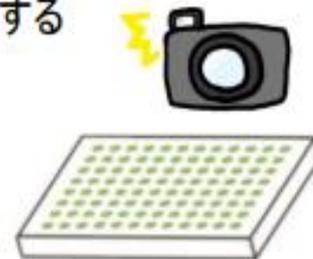
リアルタイムPCRシステム

=サーマルサイクラー+蛍光検出器

1. PCR反応中、PCR産物に蛍光標識DNAプローブを結合

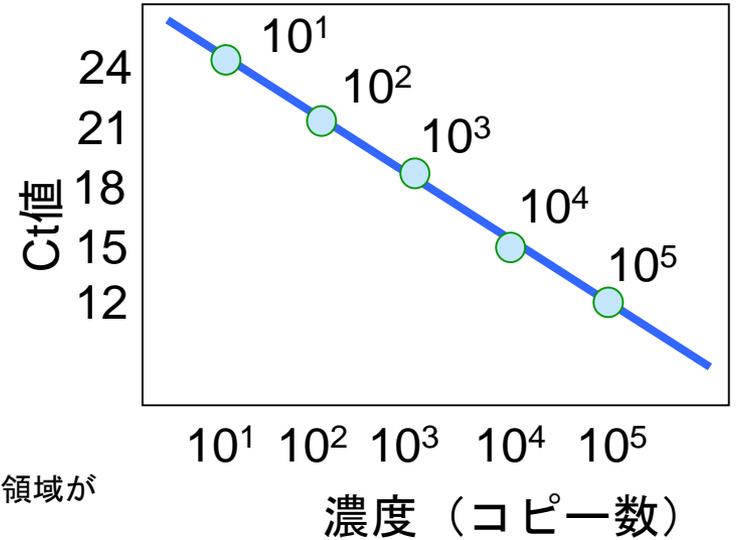
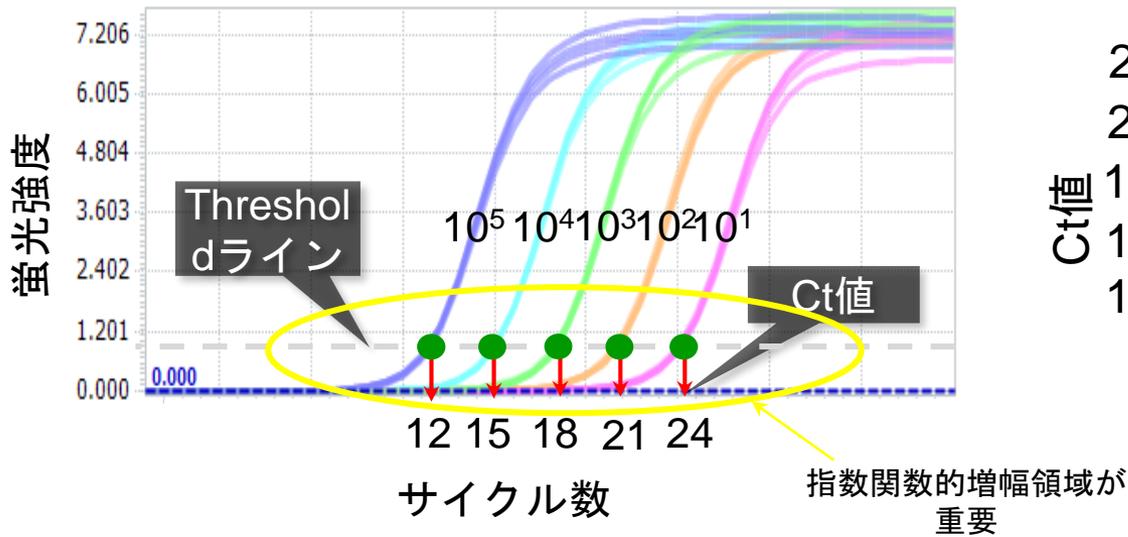


2. 1サイクル毎に蛍光を読み取ることで、PCR産物が増えていく様子をモニターする



リアルタイムPCRの基礎

任意の蛍光強度に達したサイクル数で比較



Ct: Critical threshold value (またはThreshold Cycle)

Cp: Crossing Point

検出フォーマット

TaqManプローブ法は配列に特異的な検出



TaqManプローブ法では、目的遺伝子特異的なプローブを用いる

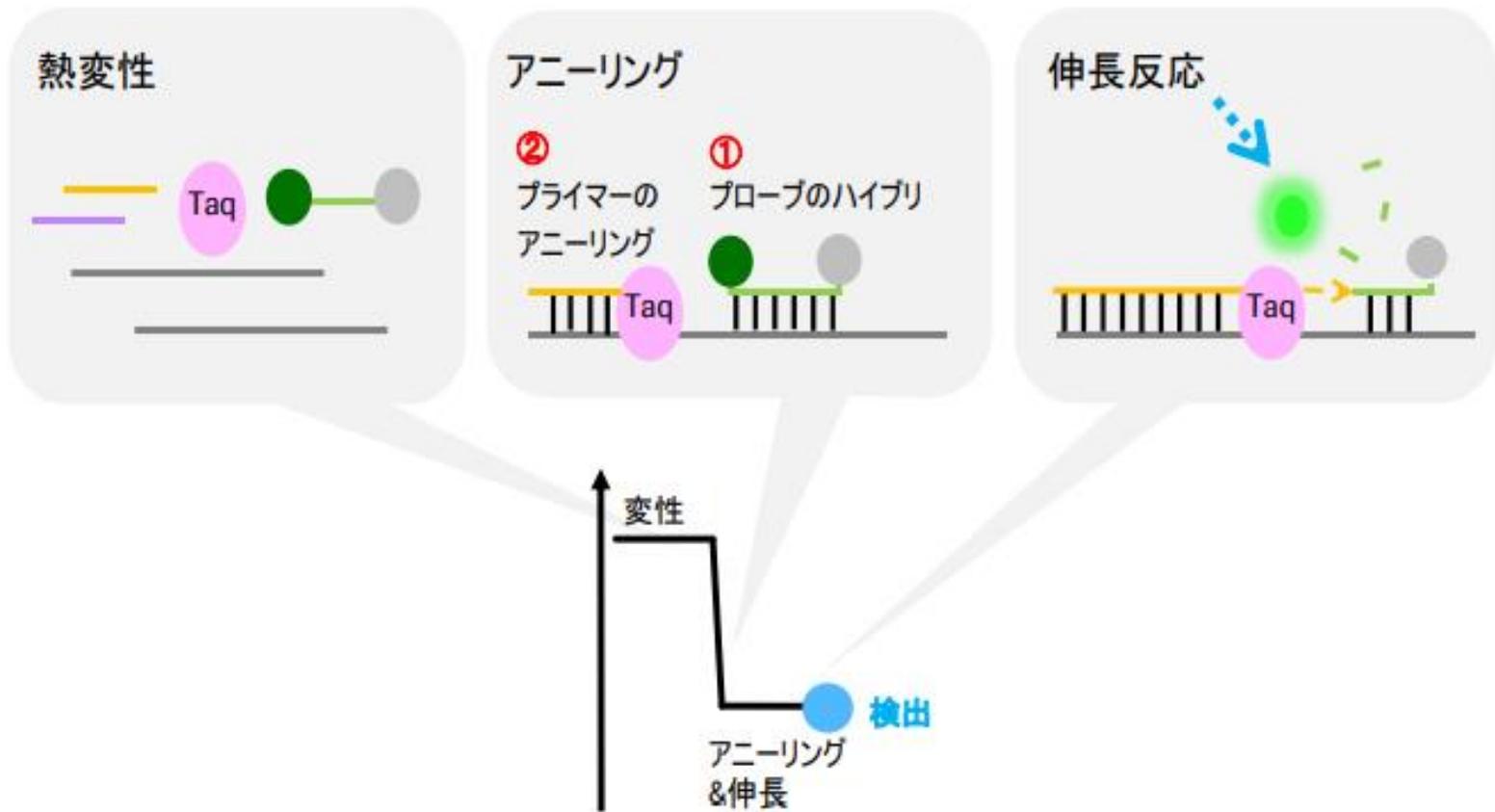
- 5' 末端にレポーター（蛍光物質）
- 3' 末端にクエンチャー（消光物質）
- FRETにより、レポーターの蛍光はクエンチャーに吸収

- FRET: Fluorescence resonance energy transfer
(共鳴蛍光エネルギー転移現象)

検出フォーマット

TaqManプローブ法 検出原理

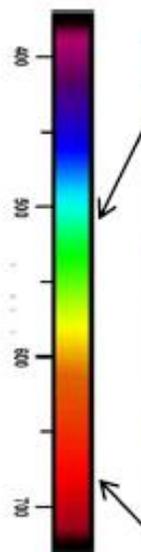
伸長反応時にプローブから遊離した蛍光物質を検出する
 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性をもつTaqポリメラーゼを使用する



検出フォーマット マルチプレックスアッセイ



プローブごとに蛍光物質を変えれば
2つ以上の遺伝子を同時検出できる
(マルチプレックスアッセイ)



レポーター	クエンチャー
FAM	TAMRA/BHQ1/NFQ
VIC	TAMRA/BHQ1/NFQ
Yellow 555	NFQ
HEX	TAMRA/BHQ1/NFQ
ROX	BHQ2
TexasRed	BHQ2/IowaBlack
Cy5	BHQ2/IowaBlack

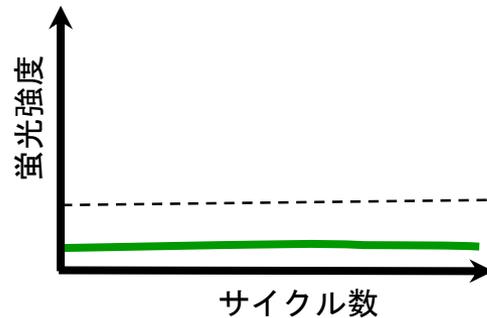
A large, abstract orange watercolor splash that covers the middle section of the page, serving as a background for the title.

内部コントロール

定性解析

内部コントロール (IC)

この検体、本当に陰性ですか？



PCR増幅し
なかった



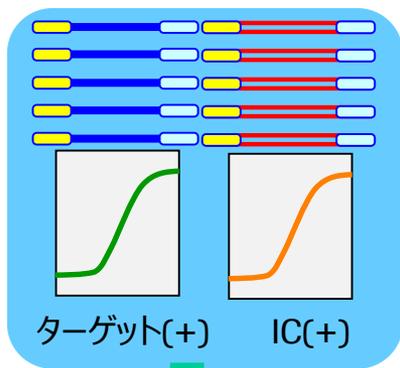
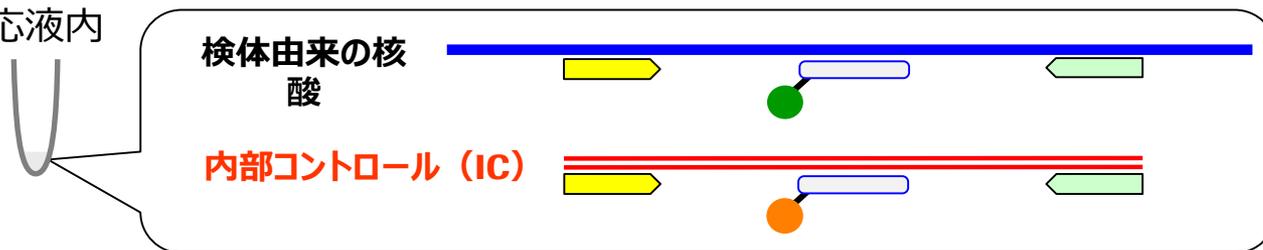
内部コントロール (IC)

- PCR反応をモニターし、陰性判定の際にPCR阻害などによる失敗ではないことを確認
- 同一反応チューブ内で行われる陽性反応
 - 人工的に添加した遺伝子
 - 宿主の遺伝子

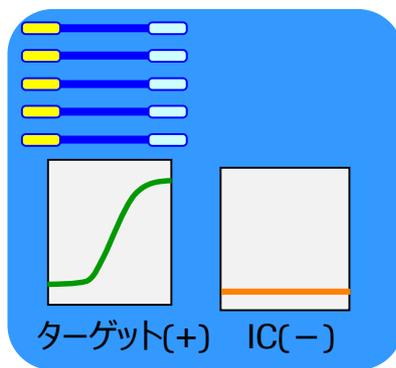
各コントロールの役割

内部コントロールの判定

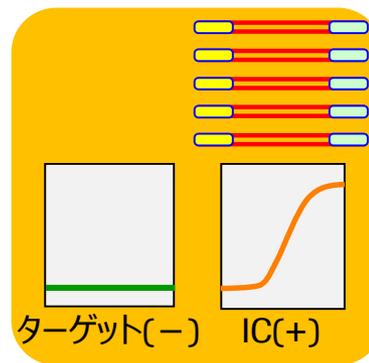
1つの反応液内で確認



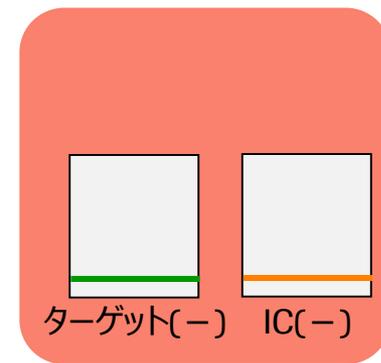
判定： 陽性



陽性
または Invalid



陰性



Invalid

ターゲットと内部コントロールともに陰性であれば、反応阻害が疑われる

A large, abstract orange watercolor splash that covers the middle section of the slide, serving as a background for the title.

コバスLiat概要

コバス Liat システム

「コバスLiatシステム」の特徴



- ✓ 検体分注、カートリッジ挿入のみの
簡単操作
- ↔ Sample to resultが約20分
- ☁ 僅かB6サイズの設置面積

コバスLiat

統一商品コード：518-497583

希望販売価格（税抜き）：2,900,000円

コバス Liat システム

シンプルなワークフロー

20分以内に結果取得



検体のロード

コバス Liat アッセイチューブに付属のピペットで検体をロードします。



バーコードのスキャン

本体のバーコードスキャナでIDを読み取ります。



アッセイスタート

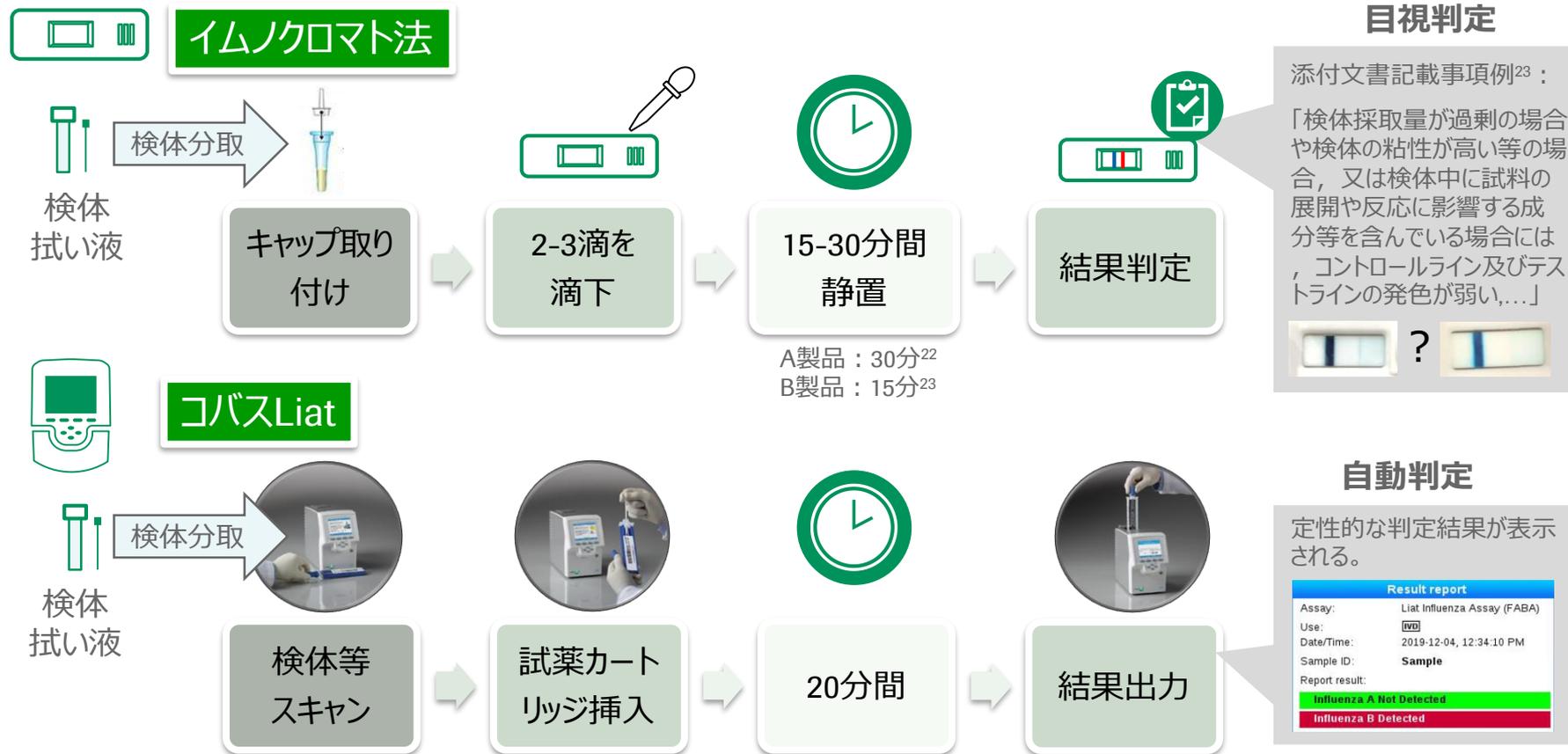
コバス Liat アナライザーにアッセイチューブをセットします。

- 必要な手順はわずか3ステップ、最小限の手順でPCR検査が実施可能
- 検査結果の判定もすべて全自動

コバス Liat システム

コバスLiatとイムノクロマト法のワークフローの比較

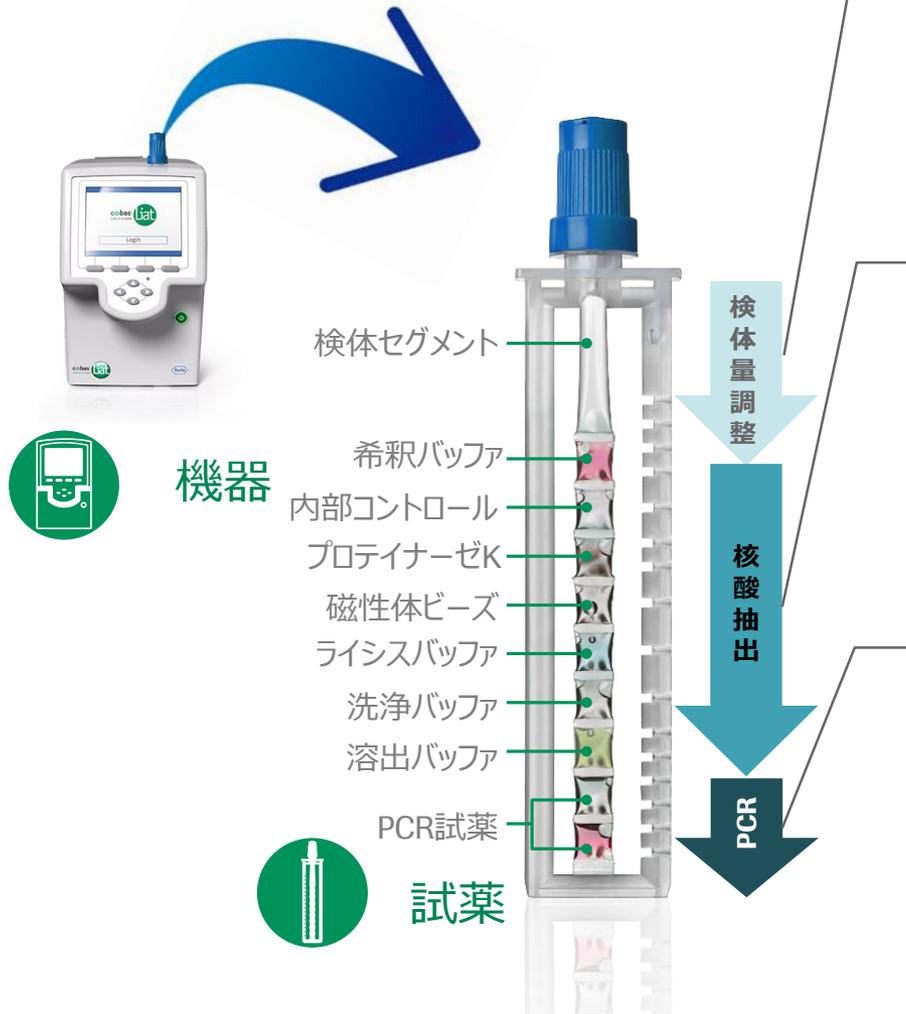
- Liatはイムノクロマト法と同程度の工程数による簡便な検査が可能である。
- LiatではPCR検査にも関わらず全自動で結果判定まで行われるため、人為的差異に因らない検査結果が得られる。



22. A製品, 日本語添付文書.

23. B製品, 日本語添付文書.

コバス Liat システム アッセイチューブについて

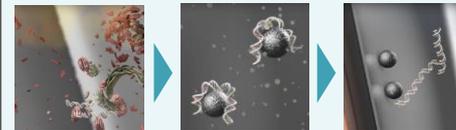


検体量の調整・測定

**Volume sensing
技術**

検体を供した後、自動的に必要量がロードされます。万が一、検体量不足があった場合にはシステムが感知し、ワーニングが表示されます。

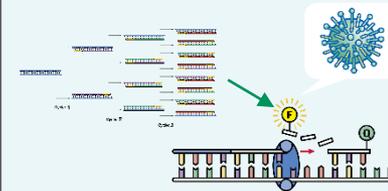
自動核酸抽



**ProKライシス+磁性体ビーズ
による自動核酸抽出**

ProKを用いたライシス、磁性体ビーズを用いた実績のある核酸精製をシングルチューブ内において、全自動で行います。

リアルタイムPCR



**TaqMan技術+
超高速リアルタイムPCRによる
遺伝子検出**

堅牢なTaqMan技術によるターゲット遺伝子の検出、それをドライブする超高速PCRにより僅か20分で目的遺伝子を検出できます。

- ライシス、核酸精製、逆転写、PCRに必要な試薬がプレパック

コバス Liat SARS-CoV-2 & Flu A/B

本製品の基本仕様²⁵

項目	製品情報
検体種	鼻咽頭および鼻腔拭い液
測定遺伝子	FluA: マトリクスタンパク質遺伝子
	FluB: 非構造タンパク質遺伝子
	SARS-CoV-2: Orf 1 a/b(RdRp)遺伝子, N遺伝子
	IPC: 封入RNA (バクテリオファージMS2)
検体安定性	培地懸濁状態：室温下4時間、2-8 °Cで72時間安定、それ以上の輸送等の場合には-70°C以下での保存・輸送。 ※ 凍結後検体の場合-70 °C以下での保存および輸送。
	アッセイチューブ中：室温下で4時間安定
動作環境	コバスLiatアナライザー（SW3.2以上のバージョン） 室温：15-32 °C、湿度：15-80 %、標高 2,000m

25. cobas SARS-CoV-2 & Influenza A/B, 英文添付文書.

コバス Liat SARS-CoV-2 & Flu A/B

SARS-CoV-2のLOD²⁵

Strain	Concentration [TCID ₅₀ /mL]	Concentration [copies/mL]	Total valid results	Hit rate [%]	Mean Ct*
USA-WA1/2020 (stock concentration 3.16E+06 TCID ₅₀ /mL)	0.048	49	10	100	32.6
	0.024	24	20	100	33.5
	0.012	12	20	100	35.2
	0.006	6	20	70	35.9
	0.003	3	20	25	36.7

段階希釈時LOD :
0.012 TCID₅₀/mL
12 コピー/mL

- これらのウイルスが陰性である鼻咽頭スワブ拭い液に、熱不活性化したウイルスをスパイクした検体を用いてLODを決定した。各濃度において多重測定し、95%以上陽性となるウイルス濃度をLODとした。
- また、これらのデータを用いてプロビット解析により95%ヒットレートにおけるLODは下表のとおり。

Strain	Probit Predicted 95% Hit Rate [TCID ₅₀ /mL]
USA-WA1/2020 (stock concentration 3.16E+06 TCID ₅₀ /mL)	0.010 (95% CI: 0.007 - 0.018)

プロビット解析LOD :
0.010 TCID₅₀/mL

- SARS-CoV-2のLODは段階希釈法により、0.012 TCID₅₀/mL(12コピー/mL)
- プロビット解析によるLODは、0.010 TCID₅₀/mL

コバス Liat システム

まとめ



全自動遺伝子検査システムで僅か3ステップの簡単操作です。



高感度なPCR検査の結果が取得できます。



検体から結果報告まで20分以内です。

ご質問に関しては、各ご施設を担当させて頂いております弊社営業担当者へお願い申し上げます。

後日、回答させていただきます。

Doing now what patients need next