

# Naica Systemアプリケーションノート 混合DNAサンプル中の微小ターゲットの定量

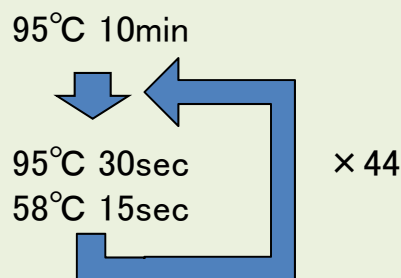
## pUC18サンプル中のpMD20の定量

血液サンプルなどを用いた場合、混合DNAサンプルからウイルスなどのターゲットとなる遺伝子を定量する必要がある。そこで、pUC18とpMD20 (GAPDH遺伝子挿入)を用い、大多数を占めるpUC18が存在する中で、微量のpMD20のターゲットを高精度に定量できるかを検証した。

### サンプル調整

pMD20 (2 fg)*	1.0 $\mu$ L
pUC18 (2 $\mu$ g, 1.5 $\mu$ g, 1 $\mu$ g, 0.5 $\mu$ g, 0.1 $\mu$ g, N/A)*	8.0 $\mu$ L
PCR Primer (25 $\mu$ M)**	1.0 $\mu$ L
Fluorescence Probe (25 $\mu$ M)**	0.25 $\mu$ L
Fluorescein (1 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ L
PerfeCTa Multiplex qPCR Tough Mix	5.0 $\mu$ L
Water	7.25 $\mu$ L

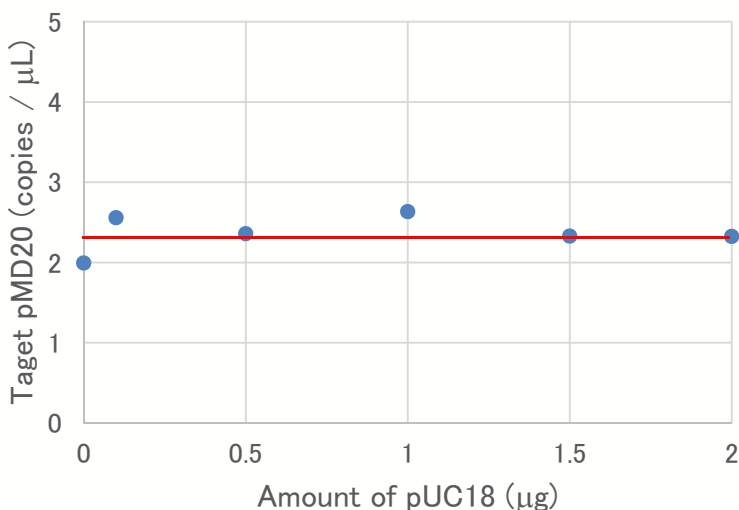
### PCR条件



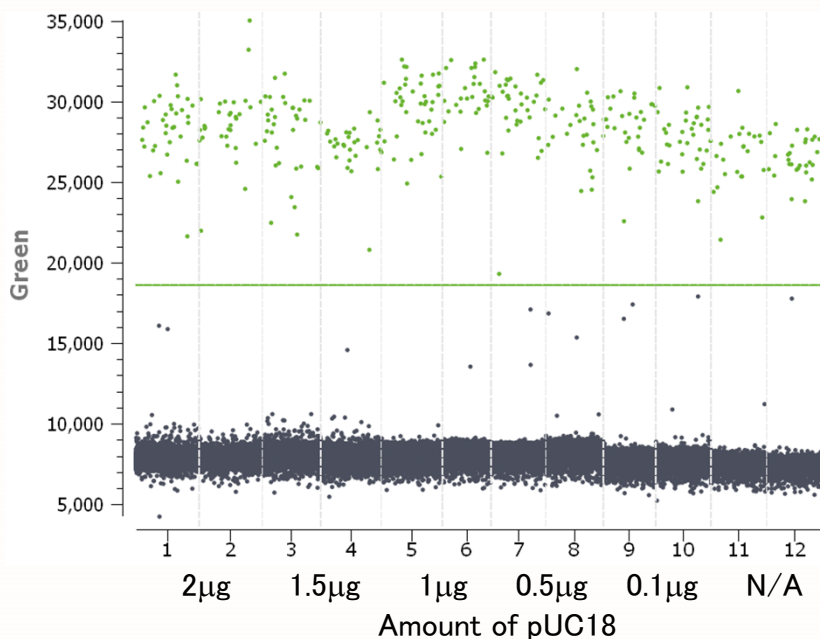
\*: サンプルの()内は最終サンプル量になります。  
\*\* : PrimerおよびProbeは全てHPLC精製品を使用

## pMD20の定量結果

pUC18が全く含まれていないサンプルと、pUC18が0.1  $\mu$ g ~ 2  $\mu$ gの重量が含まれるサンプルを用い、ターゲットとなるpMD20の検出精度を比較した。全てのサンプルでターゲットとなるpMD20は、2 copies/ $\mu$ L前後で検出されており、ターゲットに対して最大で10億倍程度の濃度で存在するpUC18によって阻害または誤検出されることはなかった。



1D dot plotのグラフでは、pUC18が0.1  $\mu\text{g}$  ~ 2  $\mu\text{g}$ と変化しても、液滴の蛍光強度に大きな変化は見られず、またバックグラウンドも一定であることから、増幅の阻害および非特異的な増幅が起きていないことがわかる。



## まとめ

pUC18が0.1  $\mu\text{g}$  ~ 2  $\mu\text{g}$ と数多く存在する中で、わずか2 fgのGAPDHを挿入したpMD20を高精度に定量することができた。これにより、血液などから生成した混合DNAサンプル中から、特定のウイルスや細菌などの微小ターゲットを定量できる可能性がある。また、DNAだけではなく、全RNAから逆転写反応を行うことで、微小な特定のRNAを定量できる可能性も秘めている。


Ref...2~10℃保存 [F]...-20℃保存 [-80]...-80℃保存 表示が無い場合は室温保存です。  
 特定 [毒-I]...特定毒物 [毒-II] [毒-III]...毒物 [劇-I] [劇-II] [劇-III]...劇物 [毒]...毒薬 [劇]...劇薬 [危]...危険物 [向]...向精神薬 [特原]...特定麻薬向精神薬原料 [カルタヘナ]...カルタヘナ法  
 [審-1]...化審法 第一種特定化学物質 [審-2]...化審法 第二種特定化学物質 [化兵1]...化学兵器禁止法 第一種指定物質 [化兵2]...化学兵器禁止法 第二種指定物質  
 覚せい剤取締法...「覚せい剤原料研究者又は取扱者」の免許を取得して、ご購入に際しては、譲受証及び譲渡証による受け渡しが必要となります。 [関]  
 国民保護法...生物・毒薬兵器の製造、使用防止のため、「毒薬等」を試験研究用に使用することを確認する証を頂戴しております。 [毒薬等]  
 上記以外の法律及び最新情報は、弊社試薬サイト (<https://labchem-wako.fujifilm.com>)をご参照下さい。

- 本文に記載しております試薬は、試験・研究の目的にのみ使用されるもので、「医療品」、「食品」、「生活用品」などとして使用できません。
- 希望納入価格には消費税等が含まれておりません。

## 富士フイルム 和光純薬株式会社

本 社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号 TEL 06-6203-3741 (代表)  
 東京本店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号 TEL 03-3270-8571 (代表)

- 九州営業所
- 中国営業所
- 東海営業所
- 横浜営業所
- 筑波営業所
- 東北営業所
- 北海道営業所

 フリーダイヤル 0120-052-099  
 試薬URL: <https://labchem-wako.fujifilm.com>

■ FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation 1600 Bellwood Road, Richmond, VA 23237, USA TEL: +1-804-714-1920 FAX: +1-804-271-7791  
 ■ FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH Fuggerstr 12, 41468 Neuss, Germany TEL: +49-2131-311-0 FAX: +49-2131-311-100