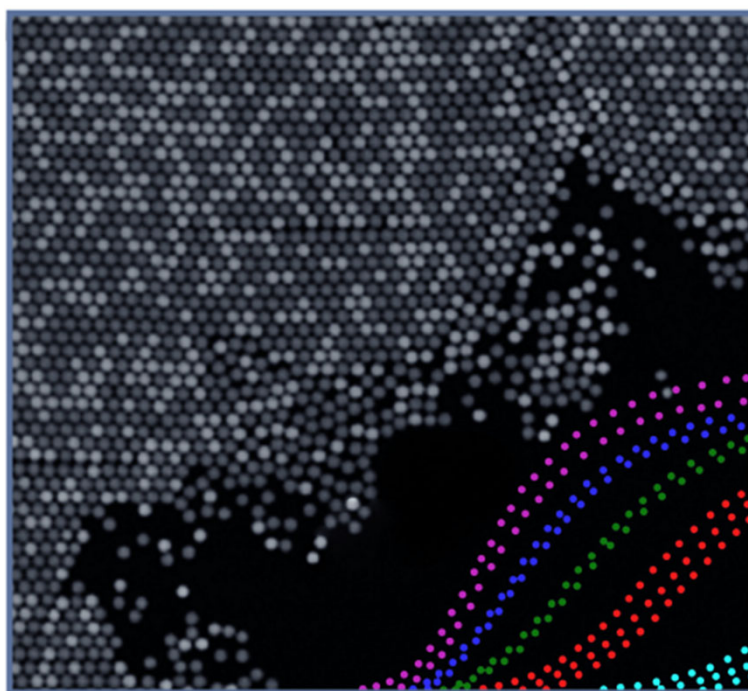




阻害物質の影響

Crystal dPCR vs qPCR



富士フイルム 和光純薬株式会社

PCRベースの定量化における阻害剤の影響

PCRの反応を阻害する化学物質は何千もあります。最初のサンプルに含まれるこれらの化合物は、DNAと一緒に精製される可能性があり、取り除くのが難しい場合があります。

リアルタイムPCR (qPCR) とCrystal Digital PCRを使用した定量化の対比

リアルタイムPCRの定量化は、未知のサンプルと既知量のDNAを含む標準品との間のCq値の比較に基づいています。従って、適切な定量化は、分析されたサンプルと標準品間のPCR効率に依存しています。しかし、サンプル中に特定の物質の阻害剤が存在する場合、標準品とサンプルでPCR効率が異なるため、定量化に偏りが生じます(図1A)。Crystal Digital PCRでは、ドロップレットは正または負のいずれかとして特徴付けられ、2つの集団を分離する蛍光の振幅はPCRの効率を示します。阻害物質が原因でPCR効率が低下した場合でも、正確な定量化が可能です(図1B)。

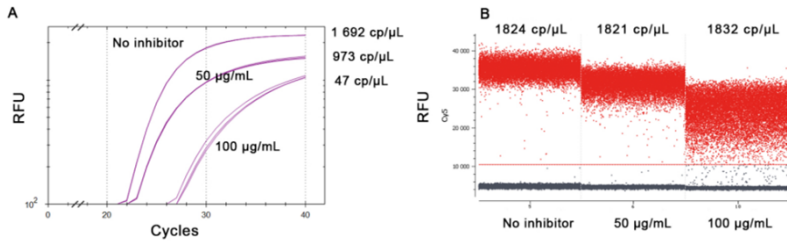


図1. リアルタイムPCR (A) およびCrystal Digital PCR (B) におけるフミン酸の影響。qPCRまたはCrystal Digital PCRのPCR反応液全てに、1x PerfeCta Multiplex qPCR ToughMix、100 nMフルオレセイン、500 nMのALB遺伝子用フォワードおよびリバースプライマー、増幅産物を検出する250 nMのCy5標識加水分解プローブ、および5.4 ng/mLのヒトゲノムDNAが含まれています。これらの反応には、0、50、100 μg/mL のフミン酸を添加しました。

また、同じソースDNAからの異なるターゲットの定量化において、阻害物質が様々な影響を与える可能性があることを覚えておくことは重要です(図2)。Naica Systemの3カラー検出は、目的の遺伝子またはゲノムの異なる領域をターゲットにして、そのような偏りをチェックできます。

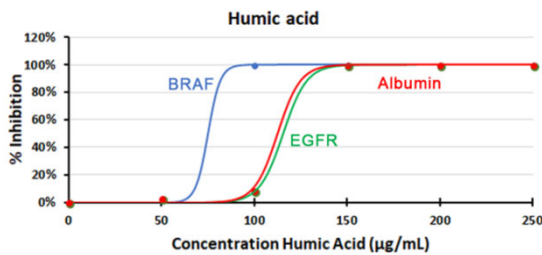


図2. 3つの異なるターゲットに対するCrystal Digital PCRでのフミン酸阻害の影響。マルチプレックスCrystal Digital PCR反応は、PerfeCta Multiplex qPCR ToughMix、ALB遺伝子 (Cy5標識プローブ)、EGFR遺伝子 (HEX標識プローブ) およびBRAF遺伝子 (FAM標識プローブ) をターゲットとするプライマープローブ、同量のヒトゲノムDNAを含み、フミン酸濃度を増加させて添加しました(シグモイド曲線でプロット)。阻害パーセンテージは、阻害物質なしのDNA定量値を0%阻害として計算されます。

qPCRおよびCrystal Digital PCRの阻害物質への耐性比較

リアルタイムPCRとCrystal Digital PCRのDNA定量において、2つの既知阻害剤である、土壌サンプルに含まれるフミン酸と、採血サンプルの抗凝固剤として使用されるヘパリンの影響を比較しました。リアルタイムPCRと比較して、Crystal Digital PCRを使用すると、どちらの阻害剤も高濃度で存在しても正確な定量化が可能であることがわかりました(図3)。

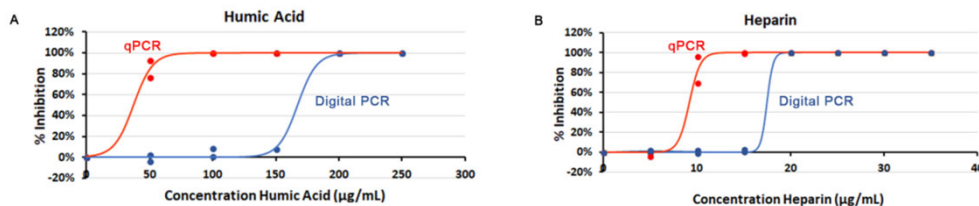


図3. リアルタイムPCR (qPCR) およびCrystal Digital PCRにおけるフミン酸(A)とヘパリン(B)の濃度依存性阻害効果。qPCRまたはCrystal digital PCRの反応には、PerfeCta Multiplex qPCR ToughMix、同量のヒトゲノムDNA、およびフミン酸をテストする場合はBRAF遺伝子、ヘパリンをテストする場合はEGFR遺伝子のいずれかをターゲットとするプライマーとプローブが含まれていました。すべてのサンプルは、3複製でN=2の実験で測定されました(シグモイド曲線でプロット)。阻害パーセンテージは、阻害剤なしのDNA定量値を0%阻害として計算されます。

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: 06-6203-2759 (機器システム部)
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: 03-3270-8124 (機器システム部)

- 九州営業所 TEL: 092-622-1005 (代)
- 中国営業所 TEL: 082-569-8095 (代)
- 東海営業所 TEL: 052-772-0788 (代)
- 筑波営業所 TEL: 029-858-2278 (代)
- 東北営業所 TEL: 022-222-3072 (代)
- 北海道営業所 TEL: 011-271-0285 (代)
- 横浜営業所 TEL: 045-225-8041 (代)

URL : <http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/kiki/index.htm>