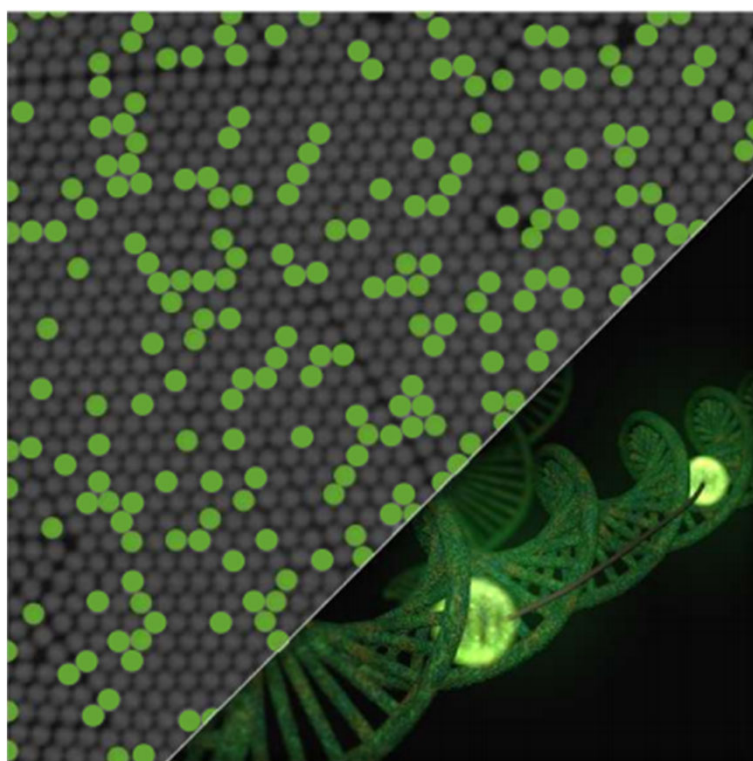




Crystal Digital PCR™

EvaGreen®



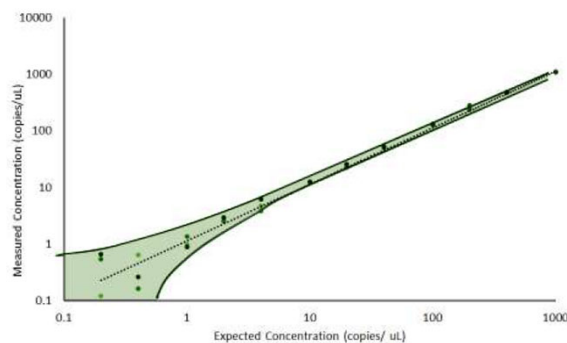
富士フイルム 和光純薬株式会社

Crystal Digital PCR™ におけるEvaGreen® での定量

EvaGreenは、Crystal Digital PCRと互換性のある非変異原性、非細胞毒性のDNA結合色素です。

EvaGreenは、溶液中で遊離すると非蛍光性であり、配列に依存することなく二本鎖DNA(dsDNA)に結合すると強い蛍光性を示します。発生したシグナルは、フルオレセインに使用されるものと同じフィルターを使用して容易に検出できます。

Crystal Digital PCRと組み合わせることで、EvaGreenはプライマーペアを使用してターゲットの絶対定量を可能にします。サファイアチップを使用したEvaGreenベースのアッセイでは、0.2 copies/μL までの信頼性の高い定量が可能です。



EvaGreenを使用したゲノムDNAの絶対定量

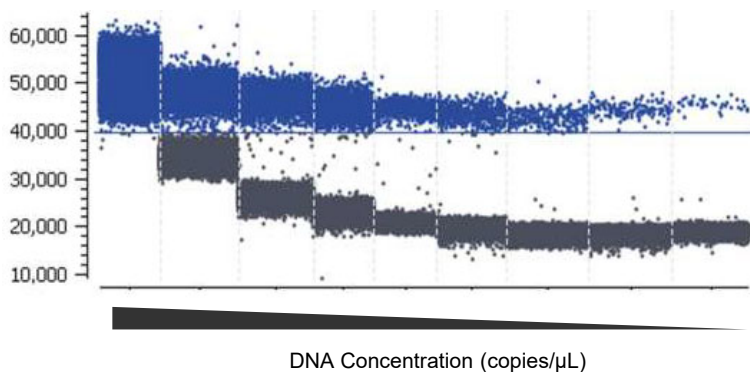
0.2~1000 copies/μL 範囲の断片化していないヒトゲノムDNAの連続希釈系列をCrystal Digital PCRで定量した。1.5X EvaGreen、0.75X Perfecta UNG Toughmix、およびオリゴヌクレオチドを使用し、EGFR遺伝子の104 bp断片を増幅しました。

N=3の測定で再現性があり、正確な定量が得られました ($R^2 = 0.9977$)。テンプレートのないコントロールでは、ポジティブドロップレットは観察されませんでした。

EvaGreen® 実験系のセットアップ

EvaGreenを使用して実験をセットアップする場合、PCRミックスに最初に存在する高濃度のdsDNAがより高い蛍光バックグラウンドをもたらすことを知っておくのが重要です。さらに、EvaGreenはdsDNAに対してより高い親和性を持っていますがオリゴヌクレオチドに対しても低い親和性で結合できるため、蛍光バックグラウンドに影響します。

定量化したいDNAのタイプ、アッセイの特性に応じて、実際のダイナミックレンジを評価する必要があります。EvaGreen実験のセットアップ方法の詳細については、www.stillatechnologies.comをご覧ください。



EvaGreen実験での散布図

0.2~1000 copies/μL 範囲の断片化していないヒトゲノムDNAの連続希釈系列をCrystal Digital PCRで定量した。1.5X EvaGreen、0.75X Perfecta UNG Toughmix、およびオリゴヌクレオチドを使用し、EGFR遺伝子の104 bp断片を増幅しました。

ネガティブドロップレットは灰色で表され、ポジティブドロップレットは青で表されます。



デジタルPCRの詳細については、StillaのデジタルPCRラーニングセンターを参照ください。

www.gene-pi.com

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>