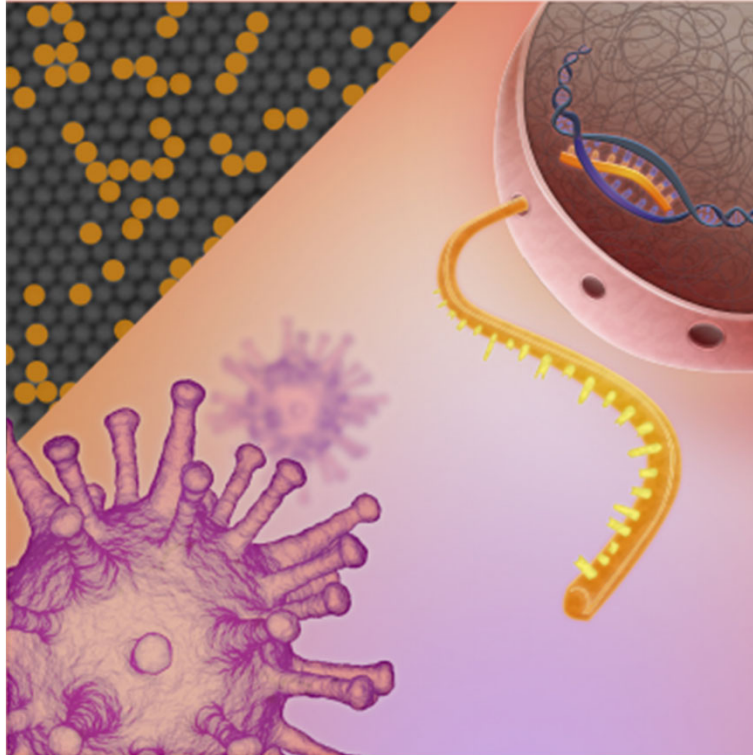




Crystal RT-dPCR RNA定量



富士フイルム 和光純薬株式会社

Crystal RT-dPCRによるターゲットのマルチプレックス化

逆転写PCR (RT-PCR) は、遺伝子発現やウイルス検出などのRNA分析に広く使用されており、ライフサイエンス研究から診断まで、多くの分野に応用されています。Crystal RT-dPCRは、ターゲット(リファレンス、または目的遺伝子の転写産物)のマルチプレックス化、標準曲線が必要としないウイルスRNAの絶対定量を可能にし、遺伝子発現の微小な違いを精巧に検出できます。3カラーのCrystal RT-dPCRにより、3つの異なるメッセンジャーRNA (mRNA) を1回の1-step反応で分析でき、遺伝子発現の1.5倍の違いを簡単かつ正確に定量できることが実証されました(図1)。

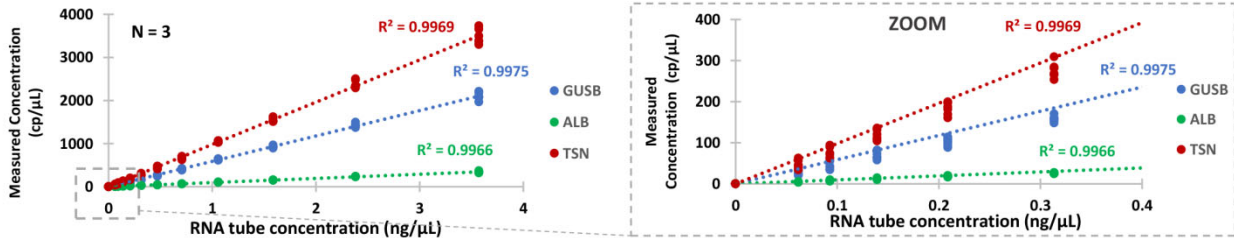


図1: 1-step Crystal RT-dPCRを使用したtotal RNAでのmRNA絶対定量

β -グルクロニダーゼ (GUSB)、アルブミン (ALB) およびトランスリン (TSN) mRNA を3カラー Crystal RT-dPCRによって定量しました。ヒトTotal RNAを0.06~3.6 ng/ μ L の範囲で、それぞれの比が1.5となるよう連続希釈して測定しています。1x qScript™ XLT One-Step RT-PCR Toughmix®、およびFAM、HEX、Cy5標識TaqMan™ プローブを使用して、サファイアチップでアッセイを実施しました。3つの複製の結果は、各ターゲットの異なるレベルの発現に対して優れた直線性、精度、再現性を示しています。回帰直線の傾き: GUSB = 588.8 cp/ng, ALB = 96.5 cp/ng, TSN = 980.6 cp/ng

低レベル転写物の定量化

Total RNAの高いバックグラウンドで少量の転写産物を検出するのは困難な場合があります。Naica Systemを用いた定量では、転写産物の少ないサンプルでも優れた直線性と再現性が示されています(図2A)。反応効率は蛍光振幅(シグナルの差)によって評価しましたが、高濃度のTotal RNA存在下でも安定しています(2 μ g - 図2B)。

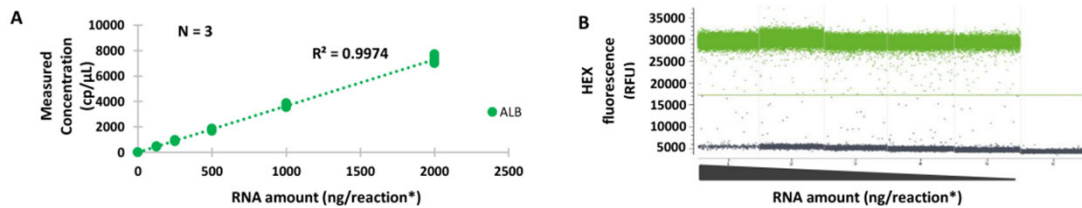


図2: 1-step Crystal RT-dPCRを使用した大量のトータルRNA下でのmRNAの絶対定量

アルブミン (ALB) mRNAは、各ポイント間の比率が2、1反応あたり2 μ g から125 ng の範囲のヒトTotal RNAの連続希釈で、Crystal RT dPCRによって定量化されました。1x qScript™ XLT One-Step RT-PCR Toughmix® とHEX標識TaqMan™ プローブを使用して、サファイアチップでアッセイを実施しました。線形プロットは、3つの複製の正確で再現性のある結果を示し(A)、蛍光のドットプロットでは効率の低下は観察されていません(B)。

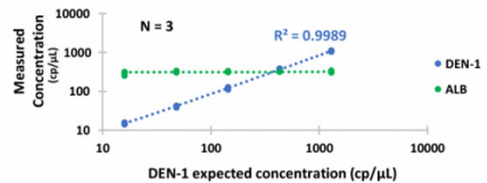
RFU: 相対蛍光ユニット * 1反応あたり27 μ L

ウイルスRNAの絶対定量

デング熱ウイルス1 (DEN-1) と他の3つの密接に関連する血清型は、デング出血熱やデングショック症候群などの致命的な症状を引き起こす可能性があります。Crystal Digital RT-PCRは、標品での検量線は不要で、2時間30分未満で、全てのラボやワークフローに適した、ユーザーフレンドリーな方法でウイルスの定量を可能にします。

図3: 1-step Crystal RT dPCRを使用したDengue-1 RNAの絶対定量

Dengue-1 RNAは、参照として300コピーのALB mRNAとなるTotal RNAを用いて、Crystal RT-dPCRによって定量化されました。1x qScript™ XLT One-Step RT-PCR Toughmix® とFAMおよびHEX標識TaqMan™ プローブを使用して、サファイアチップでアッセイを実施しました。対数プロットは想定濃度と再現性のある結果との良好な一致を示しています。



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>