

# Naica Systemアプリケーションノート Crystal Digital PCRによるmRNAの定量

## COLO201 Total RNAからmRNAの抽出

ヒト結腸腺癌由来のCOLO201細胞より、全RNAを抽出したものをを用いてmRNAの定量を行った。mRNA中のハウスキーピング遺伝子(*GAPDH*, *RPL13A*, *IGF2R*)を選択的に検出するTaqManプローブを用い、逆転写反応後に、Naica System(dPCR)およびリアルタイムPCR (qPCR) を用いて測定を行った。

### 逆転写反応

COLO201 Total RNA  
(10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg) 19.5  $\mu$ L  
RT Primer 1.5  $\mu$ L

72°C  
2 min

5  $\times$  RT Buffer 6.0  $\mu$ L  
10mM dNTPs 1.5  $\mu$ L  
Rnase Inhibitor 0.5  $\mu$ L  
ReverTraAce 1.0  $\mu$ L

42°C  
20min

スピнкаラム法にてcDNAを抽出

### PCR反応

#### <dPCR>

each cDNA 4.0  $\mu$ L  
RCR Primer (12.5  $\mu$ M) 2.5  $\mu$ L  
Fluorescence Probe (12.5  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ L  
Fluorescein (1  $\mu$ M: Uranine) 2.5  $\mu$ L  
PerfeCTa Multiplex qPCR Tough Mix 5.0  $\mu$ L  
Water 13.5  $\mu$ L

#### <qPCR>

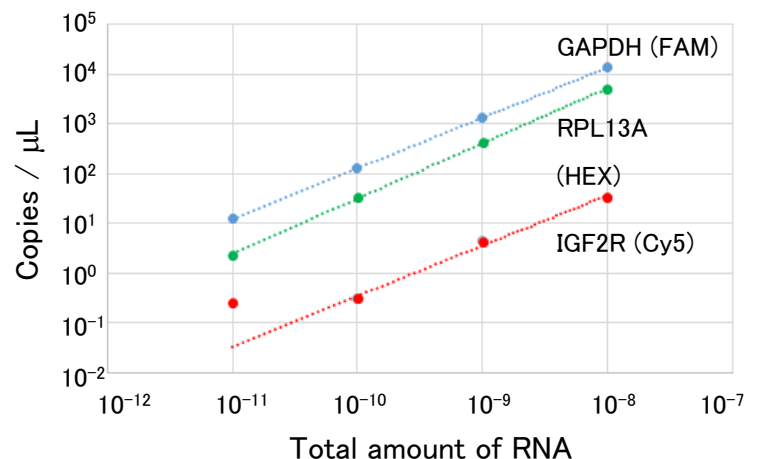
each cDNA 4.0  $\mu$ L  
RCR Primer (12.5  $\mu$ M) 2.5  $\mu$ L  
Fluorescence Probe (12.5  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ L  
PerfeCTa Multiplex qPCR Tough Mix 5.0  $\mu$ L  
Water 16.0  $\mu$ L

## dPCRによるmRNAの定量

含有量別のCOLO201 Total RNAを用いて*GAPDH*, *RPL13A*, *IGF2R*を定量したところ、*GAPDH*および*RPL13A*は発現量が多いことから、Total RNAが10pgでも問題なく定量することができた。

*IGF2R*は発現量が少なく、十分な精度が得られるのは100pg程度までであるが、10pgでも検出されることが確認できた。

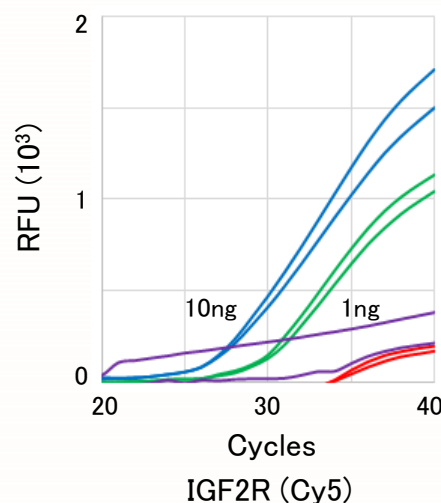
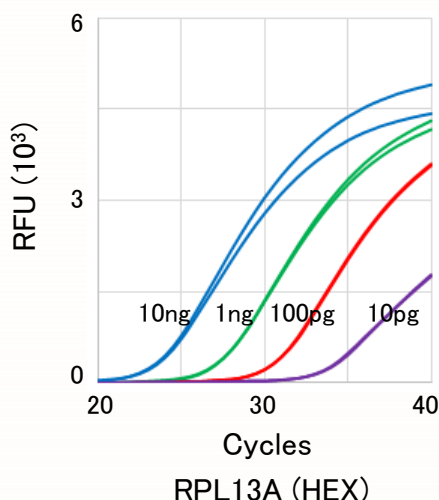
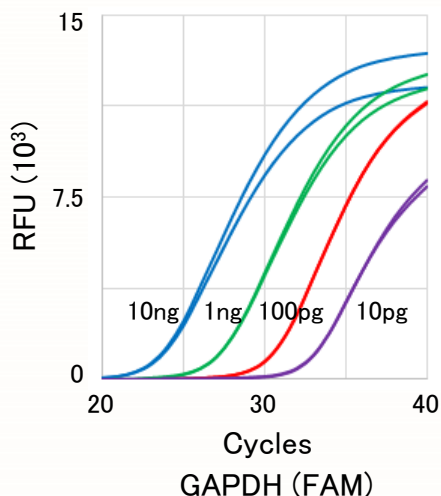
Naica Systemの検出限界である0.2copies /  $\mu$ Lまで十分な精度で定量することが可能であることが示された。



## qPCRによるmRNAの定量

qPCRでも10pgまで *GAPDH* および *RPL13A* の検出を行うことができた。しかし、低発現量である *IGF2R* については1ngまでしか検出できず、これはdPCRに比べて2logほど感度が劣ることがわかった。

また、本実験ではスタンダード遺伝子を用いていないため、発現量の相対的な定量は行っていない。dPCRについては、ドロップレット数に対してcopies数をカウントしているため、スタンダード遺伝子を用いなくても絶対的な定量が可能である。



## まとめ

mRNAの逆転写反応を用いてCOLO201細胞のハウスキーピング遺伝子である *GAPDH*, *RPL13A*, *IGF2R* をdPCRおよびqPCRで検出することができた。また、dPCRはqPCRに比べて2 logほど検出限界が優れていることがわかった。

このように、dPCRはqPCRに比べて検出感度が非常に高く、低発現量のmRNAを検出することが可能である。また、従来のqPCRではスタンダードによる検量線が必要だが、dPCRではスタンダードなしでも絶対定量が可能である。これにより、今後の癌診断などの用途で、様々な癌を絶対的に定量できる可能性を秘めている。

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 I 特定毒物 I II 毒物 I II III 劇物 毒薬 劇薬 危険物 向精神薬 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。覚  
 国民保護法...生物・毒素兵器の製造、使用防止のため、「毒素等」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、弊社試験サイト (<https://labchem-wako.fujifilm.com>) をご参照下さい。

- 本文に記載しております試験は、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  
 試験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