

独立行政法人 産業技術総合研究所
計量標準総合センター 標準物質認証書



認証標準物質

NMIJ CRM 6203 - a
No. +++



定量分析用デオキシリボ核酸 (DNA) 水溶液

Deoxyribonucleic Acid (DNA) Solutions for Quantitative Analysis

本標準物質は、ISO GUIDE 34:2000 および ISO/IEC 17025:2005 に適合するマネジメントシステムに基づき生産された異なる塩基配列のデオキシリボ核酸 (DNA) 水溶液 (4 種類) である。各試料溶液中の 600 塩基対 DNA は 300 塩基座位の塩基が全て異なる。本標準物質は、DNA マイクロアレイ (DNA チップ) を用いた DNA 定量分析において、DNA チップの評価や精度管理のための DNA の値付けに用いることができる。また、定量的 PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 等の DNA 定量装置および分析法の精度管理や妥当性確認等に用いることができる。

【認証値】

4 本の試料 (D001-600-A、-C、-G、-T) についての 20 °C における総 DNA (塩基対の数や配列によらず、試料中に含まれる全ての DNA) の質量濃度の認証値は以下の通りである。認証値の不確かさは、合成標準不確かさと包含係数 $k=2$ から決定された拡張不確かさであり、約 95 % の信頼の水準をもつと推定される区間を示す。

試料名称	総 DNA の質量濃度	
	認証値 (ng/μL)	拡張不確かさ (ng/μL)
D001-600-A	12.4	0.8
D001-600-C	11.9	1.0
D001-600-G	12.4	1.1
D001-600-T	13.0	1.4

【認証値の決定方法】

本標準物質の認証値は、各々の試料について、以下の 2 つの方法により得られた総 DNA の質量分率を振動式密度計による試料の密度を用いて質量濃度に変換したものである。

(1) 同位体希釈質量分析法 (ID-MS)

試料中 DNA を酵素分解した後、液体クロマトグラフ質量分析装置 (LCMS) を用いた測定によって得られたデオキシリボヌクレオチドの質量分率から総 DNA の質量分率を得た。

(2) 誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS)

試料中 DNA を酸分解した後、ICP-MS 測定によって得られたりん (P) の質量分率から総 DNA の質量分率を得た。

【計量計測トレーサビリティ】

本標準物質の認証値は、(独)産業技術総合研究所計量標準総合センター (NMIJ) で純度決定したデオキシリボヌクレオチド標品を用いた一次標準測定法である同位体希釈質量分析法によるデオキシリボヌクレオチド定量と、JCSS りん酸イオン標準液を用いたりん定量により決定されたものであり、国際単位系 (SI) にトレーサブルである。

【安定性】

本標準物質は、約 1 年間の安定性試験を行い、安定であることを確認した。NMIJ においては、約半年に 1 回安定性のモニタリングを実施する。

【有効期限】

本標準物質の有効期限は、未開封で下記の【保存に関する注意事項】の条件の下で、出荷日の2ヶ月後である。

【形状等】

本標準物質は、常温では無色透明液体で、プラスチック製バイアルに50 µLずつ分注された試料4本がアルミニウムラミネート袋に密封されている。

【均質性】

小分けした約80個の試料からランダムに6個取り出し、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）でDNAの測定を行い、均質性を反映した試料間のばらつきを評価し、認証値の不確かさに加えた。

【保存に関する注意事項】

到着後直ちに-20℃以下の冷凍庫に保存すること。

【使用に関する注意事項】

使用前に常温（20℃付近）に置き、自然解凍（加熱厳禁）し、十分に溶解する。キャップのねじが十分締まっていることを確認した上で十分に混和し、完全に均一化した後に使用すること。解凍後はすみやかに使い切ること。一度解凍した試料は、再利用してはならない。

試料を採取する際に試料低吸着型およびDNA分解酵素を含まないピペットチップや容器を使用すること。試験・研究用以外には使用しないこと。

【製造方法等】

本標準物質は、(独)産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門バイオメジャー研究グループにおいて開発された人工DNA塩基配列CRM 6203-a-Tを基本配列とし、300塩基座位を塩基置換した4種類の配列を用いたものであり、同グループで調製・小分けされた。上記の特定の遺伝子をコードしないランダムな塩基配列をプラスミドへ挿入し、大腸菌内で複製した後にプラスミドを抽出、精製した。対象となる塩基配列を制限酵素で切断した後に精製したものである。

【参考情報】

① 塩基配列解析結果

本標準物質は、以下の図1に示す塩基配列（代表例：CRM 6203-a-T）を有し、図中点線丸印で示す300塩基座位の塩基が異なる4種類（D001-600-Aではアデニン(A)、D001-600-Cではシトシン(C)、D001-600-Gではグアニン(G)、D001-600-Tではチミン(T)）として設計・調製した。調製した本標準物質について自動塩基配列決定装置を用いて測定した結果、4種類全ての標準物質で想定される塩基配列を有することが確認された。

```

LOCUS          CRM 6203-a-T
ORIGIN
1  ATTCGAAGGG TGATTGGATC GGAGATAGGA TGGGTCAATC GTAGGGACAA TCGAAGCCAG
61 AATGCAAGGG TCAATGGTAC GCAGAATGGA TGGCACTTAG CTAGCCAGTT AGGATCCGAC
121 TATCCAAGCG TGTATCGTAC GGTGTATGCT TCGGAGTAAC GATCGCACTA AGCATGGCTC
181 AATCCTAGGC TGATAGGTTT GCACATAGCA TGCCACATAC GATCCGTGAT TGCTAGCGTG
241 ATTCGTACCG AGAACTCACG CCTTATGACT GCCCTTATGT CACCGTTAT GTCTCCCGAT
301 ATCACACCCG TTATCTCAGC CCTAATCTCT GCGGTTTAGT CTGGCCTTAA TCCATGCCTC
361 ATAGCTACCC TCATACCATC GCTCATACCT TCCGACATTG CATCCGTCAT TCCAACCCTG
421 ATTCCTACGG TCTAACCTAG CCTCTATCCT ACCCAGTTAG GTTGCCTCTT AGCATCCCTG
481 TTACGTACGC TCTTACCATG CGTCTTACCT TGGCACTATC GATGGGAGTA TGGTAGCGAG
541 TATGGAACGG ACTAACGTAG GCAGTAAGCT AGGGTGTAAG GTTGGGACTA AGGATGCCAG

```

//

図1 CRM 6203-a-Tの塩基配列（D001-600-T）

② ゲル電気泳動解析結果

本標準物質について、ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびマイクロチップ型ゲル電気泳動により泳動解析を行ったところ、600塩基対付近に単一のバンドが確認され、想定される塩基対の数と整合する結果が得られた。

③ 密度測定結果

本標準物質について、振動式密度計を用いて 20 °Cにおける密度測定を行い、以下の結果と拡張不確かさを得た。
D001-600-A:0.9978 ± 0.0005 g/cm³, D001-600-C:0.9983 ± 0.0005 g/cm³, D001-600-G:0.9981 ± 0.0005 g/cm³,
D001-600-T:0.9983±0.0005 g/cm³

④ 定量的PCR法を用いた混入DNAの評価結果

本標準物質の調製時に混入することが考えられるプラスミド由来DNAと大腸菌由来DNAについて、各DNAに対応するプライマーセットを利用した定量的PCR法による評価を行った。その結果、プラスミド由来DNAの混入率が1%未満、大腸菌由来DNAの混入率が0.03%であった。

【生産担当者】

本標準物質の生産に関する技術管理者は高津章子、生産責任者は藤井紳一郎、値付け担当者は藤井紳一郎、柴山祥枝、稲垣和三、成川知弘、関口勇地、川原崎守、吉岡真理子である。

【情報の入手】

本標準物質に関して認証値の変更等、重要な改訂があった場合は購入者に通知する。購入者は下記ホームページから「標準物質ユーザー登録」を行うことにより、上記の通知を入手できる。なお、本標準物質に関する技術情報は、下記連絡先より入手できる。

【認証書の複製について】

本認証書を複製する場合は、複製であることが明瞭にわかるようにしなければならない。

【付記】

本標準物質は、(独)新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の委託事業「DNAチップの互換性向上のためのSIトレーサブルな核酸標準物質作成・評価技術の研究開発」(2008-2010年度)の研究成果に基づくものであり、(独)産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門との研究協力により開発された。

2011年4月13日

独立行政法人 産業技術総合研究所
理事長 野間口 有

本標準物質に関する質問等は以下にご連絡ください。

独立行政法人 産業技術総合研究所 計量標準総合センター
計量標準管理センター 標準物質認証管理室
〒305-8563 茨城県つくば市梅園 1-1-1

電話 : 029-861-4059、ファックス : 029-861-4009、ホームページ : <http://www.nmij.jp/service/C/>