

国立研究開発法人 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 6205-b
No. +++

定量分析用デオキシリボ核酸 (DNA) 水溶液 (1 ng/μL、600 塩基対)

Deoxyribonucleic Acid (DNA) Solutions for Quantitative Analysis (1 ng/μL, 600-bp)

本標準物質は、ISO 17034 及び ISO/IEC 17025 の要求事項に適合したマネジメントシステムに基づいて生産された異なる塩基配列を持つデオキシリボ核酸 (DNA) をそれぞれに含む2種類の水溶液である。本標準物質は、主に DNA マイクロアレイ (DNA チップ) や定量的 PCR (ポリメラーゼ連鎖反応)、デジタル PCR 等の DNA 定量装置、及び分析法の精度管理や妥当性確認に用いることができる。

【認証値】

本標準物質の認証値は2種類の DNA 水溶液 (DNA600-G 及び DNA600-T) について、それぞれに含まれる 25 °C における総 DNA (配列の違いを区別しない、試料中に含まれる全ての DNA) としての質量濃度である。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の半分の幅を表す。

試料名	総 DNA としての濃度	
	認証値 質量濃度 (ng/μL)	拡張不確かさ 質量濃度 (ng/μL)
DNA600-G	0.88	0.07
DNA600-T	0.89	0.08

DNA600-G 及び DNA600-T は、それぞれ参考情報の図 1 及び図 2 の DNA として設計・調製された DNA を含む水溶液である。

【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 (核酸塩基測定及びりん測定) において求められたデオキシリボヌクレオチドまたはりんの定量値を基に目的 DNA の質量分率を算出した。算出した質量分率に対して、振動式密度計により求めた試料の密度を用いて質量濃度に変換して決定した。

(1) 同位体希釈質量分析法 (IDMS) による核酸塩基測定

試料中 DNA をぎ酸を用いた酸分解で核酸塩基に分解したのち、液体クロマトグラフ質量分析装置を用いた核酸塩基測定によってデオキシリボヌクレオチドの質量分率を得た。その後、りん酸ジエステル結合の際の脱水を考慮した各デオキシリボヌクレオチド濃度を計算し、それらの総和から 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) によるりん測定

試料中 DNA を酸分解した後、ICP-MS を用いた測定によって得られたりんの質量分率と目的の DNA に含まれるりんの個数から 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 IDMS による核酸塩基測定と ICP-MS によるりん測定により決定した。IDMS による核酸塩基測定においては、フタル酸水素カリウム認証標準物質 (NMIJ CRM 3001-b) で校正された内標準物質を用いた ^1H NMR により濃度評価したデオキシリボヌクレオチド標準液を用いた。ICP-MS によるりん測定では、JCSS り

ん酸イオン標準液を用いた。従って、本標準物質の認証値は国際単位系（SI）にトレーサブルである。

【参考値】

本標準物質の参考値は、認証値をもとに、参考情報に示した 600-bp の DNA 分子中に含まれる各核酸塩基の個数を用いて算出した。25 °C における 600-bp の DNA としての物質濃度である。参考値の不確かさは、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る。

試料名	600-bp の DNA としての濃度	
	参考値 物質濃度 (fmol/μL)	拡張不確かさ 物質濃度 (fmol/μL)
DNA600-G	2.37	0.17
DNA600-T	2.40	0.22

【有効期間】

本標準物質が未開封で下記の【保存に関する注意事項】の条件で保存された場合、本認証書は出荷日から 1 年間有効である。

【物質に関する情報】

本標準物質は、600-bp の合成二本鎖デオキシリボ核酸（DNA）を 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) に溶解することにより調製した水溶液である。核酸低吸着プラスチック製バイアルに約 200 μL ずつ分注された試料 2 本がナイロン-直鎖状低密度ポリエチレン袋に脱気封入され、さらにアルミニウムラミネート袋に密封されている。

【保存に関する注意事項】

本標準物質は、-30 °C から -20 °C 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 25 °C ± 5 °C 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うえで十分に混和し、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きること。

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及び 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。生体を用いた試験・研究には使用しないこと。

【取り扱いにおける注意事項】

安全データシート（SDS）を参考にして取り扱うこと。

【製造等】

本標準物質の設計、合成は産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門において行い、小分けは同所バイオメディカル研究部門及び物質計測標準研究部門で行った。本標準物質の塩基配列は特定の遺伝子をコードしないランダムな塩基配列を持つ人工 DNA 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。本標準物質に含まれる 2 種類の DNA は NMIJ CRM 6205-a DNA600-G/DNA600-T をそれぞれ鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応により大量合成した後、市販の簡易精製カラムにより精製した。各精製 DNA 水溶液は 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) で希釈した後、核酸低吸着プラスチック製バイアルに約 200 μL ずつ分注した。試料 2 本を 1 セットとしてナイロン製袋に脱気封入され、さらにアルミニウムラミネート袋で密封した。

【参考情報】

① 塩基配列・分子量情報

本標準物質は異なる塩基配列を持つ DNA をそれぞれに含む 2 種類の DNA 水溶液からなる。各水溶液に含まれる DNA の塩基配列は、図 1 及び図 2 に示すように図中点線丸印で示す 300 塩基座位の塩基のみが異なる。合成

した DNA について自動塩基配列決定装置を用いて塩基配列を解読した結果、図1及び図2に示したものと同一塩基配列を有することを確認した。各 DNA の分子量と DNA の塩基配列に関するデータベース (DDBJ/GenBank/EMBL) のアクセッションナンバーを併せて示す。

```

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 CACCGCTTAT GTCTCCCGA+
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 AGGGTGTAA GTTGGGACTA AGGATGCCAG

```

//

分子量: 370773.3

アクセッションナンバー: AB610938 (CRM 6203-a-G という名称で登録)

図1 DNA600-G 中に含まれる DNA の塩基配列

```

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 CACCGCTTAT GTCTCCCGA+
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 AGGGTGTAA GTTGGGACTA AGGATGCCAG

```

//

分子量: 370772.3

アクセッションナンバー: AB610935 (CRM 6203-a-T という名称で登録)

図2 DNA600-T 中に含まれる DNA の塩基配列

② 高速液体クロマトグラフィー解析結果

本標準物質について、サイズ排除カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーによる測定を行ったところ、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 25 °Cにおける密度測定を行った。その結果、DNA600-G 及び DNA600-T ともに、0.9975 g/cm³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加藤愛、生産責任者は柴山祥枝、値付け担当者は柴山祥枝、藤井紳一郎、朱彦北、山崎太一、野田尚宏、松倉智子、佐々木章、吉岡真理子、高木妙子である。

【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、下記ホームページから「標準物質ユーザー登録」

を行った購入者に通知する。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。

2021年12月23日

国立研究開発法人 産業技術総合研究所
理事長 石村 和彦

本標準物質に関する質問等は以下にお問い合わせをお願いします。

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 計量標準総合センター
計量標準普及センター 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、ホームページ：<https://unit.aist.go.jp/qualmanmet/refimate/>