

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-a
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 GUIDE 34:2009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デオキシリボ核酸(DNA)水溶液(2種類)である。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などに用いることができる。

【認証値】

2種類の試料(DNA600-GおよびDNA600-T)それぞれに含まれる25 °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の半分の幅を表す。

試料名	総DNA	
	認証値 質量濃度 (ng/μL)	拡張不確かさ 質量濃度 (ng/μL)
DNA600-G	1.38	0.12
DNA600-T	1.09	0.10

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の水溶液である。

【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つの方法により得られた総DNAの質量分率を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ものである。

(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(LCMS/MS)を用いた核酸塩基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)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】

認証値をもとに、参考情報に示したDNA分子の塩基組成を用いて算出した25℃における600-bpのDNAとしての物質濃度を参考値として以下に示す。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	
	参考値 物質濃度 (fmol/μL)	拡張不確かさ 物質濃度 (fmol/μL)
DNA600-G	3.73	0.31
DNA600-T	2.97	0.27

【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。

【形状等】

本標準物質は、常温では無色透明液体で、核酸低吸着プラスチック製バイアルに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。

【均質性】

小分けした100本の試料からランダムに10本取り出し、高速液体クロマトグラフィーでDNAのピーク面積測定を行い、均質性を確認した。評価した均質性に起因する不確かさは、認証値の不確かさに含まれており、本標準物質は認証値の不確かさの範囲内で均質である。

【安定性】

-20℃での安定性試験を行い、安定性を確認している。評価した安定性に起因する不確かさは認証値の不確かさに含まれている。

【保存に関する注意事項】

-30℃から-20℃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℃±5℃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。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。

【取り扱いに関する注意事項】

安全データシート（SDS）に従って取り扱うこと。

【製造方法等】

本標準物質は産業技術総合研究所生命工学領域バイオメディカル研究部門において開発された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塩基座を塩基置換した2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DNAをプラスミドへ挿入し、大腸菌内で複製した後、プラスミドを抽出・精製し、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塩基配列解析結果及び分子量

本標準物質は、以下の図1 および図2 に示す塩基配列を有し、図中点線丸印で示す300塩基座位の塩基が異なる2種類（DNA600-Gではグアニン（G）、DNA600-Tではチミン（T））のDNAとして設計・調製した。調製した本標準物質の2種類の溶液について自動塩基配列決定装置を用いて測定した結果、想定される塩基配列を有することが確認された。DNA600-GおよびDNA600-Tの公共塩基配列データベースのアクセッションナンバーは、DNA600-GがAB610938、DNA600-TがAB610935である。また、分子量についてはDNA600-Gが370773.3、DNA600-Tが370772.3として計算した。

```

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 GTCTCCCGAG
301 ATCACACCCG TTATCTCAGC CCTAATCTCT GCGGTTTAGT CTGGCCTTAA TCCATGCCTC
361 ATAGCTACCC TCATACCATC GTCATACCT 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 6205-a DNA600-G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 GTCTCCCGAG
301 ATCACACCCG TTATCTCAGC CCTAATCTCT GCGGTTTAGT CTGGCCTTAA TCCATGCCTC
361 ATAGCTACCC TCATACCATC GTCATACCT 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2 CRM 6205-a DNA600-T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℃における密度測定を行った。その結果、DNA600-G、DNA600-Tともに、0.997 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高津章子、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、稲垣和三、山崎太一、関口勇地、野田尚宏、松倉智子、佐々木章、吉岡真理子である。

【情報の入手】

本標準物質に関し、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。

【付記】

本標準物質は、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）および経済産業省委託事業平成27年度政府戦略分野に係る国際標準化活動「標準物質を用いた臨床検査機器の測定妥当性評価に関する国際標準化・普及基盤構築」（株式会社三菱総合研究所からの再委託）の研究成果に基づくものである。

2016年 3月 9日

国立研究開発法人 産業技術総合研究所
理事長 中鉢 良治

本標準物質に関する質問等は以下にご連絡ください。

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