

解析報告書

○ お客様情報

2024年〇月〇日

プロジェクト ID:			
お名前:	ファスマック太郎様	ご所属:	株式会社ファスマック バイオ研究支援事業部

○ プロジェクト情報

解析種別:	リアルタイムPCRによる環境DNA(eDNA)の検出
ターゲット:	アユ(Plecoglossus altivelis) Cytb遺伝子(mtDNA)
サンプル形態:	Raw Sample
サンプル数:	4
サンプル調製:	Genome Extraction, qPCR

○ DNA抽出

各環境水1Lから、DNeasy Blood and Tissue Kitを用いてDNAを抽出し、最終的に、200 μ lの滅菌水で溶出しました。
Nanodropで濃度測定した各サンプルの結果は以下の通りです。

No.	Sample name	Nanodrop	
		ng/ μ l	μ l
1	PointA	2.39	200
2	PointB	11.04	200
3	PointC	22.15	200
4	PointD	91.08	200

○ qPCR反応ならびにプライマー/プローブ条件

抽出したDNA2 μ lを鋳型とし、THUNDERBIRD qPCR Probe Mixを用いてPCR反応を行いました。
サーマルサイクラーには、Roche社のLight Cycler96を使用し、各サンプルを3反復にてPCRしました。
PCR反応条件ならびに、使用したプライマー/プローブの配列は以下の通りです。

・試薬組成

試薬	使用量(μ l)
サンプル	2
プライマー-F	1.8
プライマー-R	1.8
プローブ	0.25
qPCR Probe Mix	10
滅菌水	4.15
合計	20

・温度条件

温度($^{\circ}$ C)	時間(秒)	サイクル数
95	60	1
95	5	50
50	60	

・プライマー/プローブ配列

Name	Sequence(5'→3')	出展
Paa-CytB-Forward(※)	CCTAGTCTCCCCTGGCTTTATCTCT	1*
Paa-CytB-Reverse	GTAGAATGGCGTAGGCGAAAA	1*
Paa-CytB-Probe	FAM-ACTTCACGGCAGCCAACCCCC-TAMRA	1*

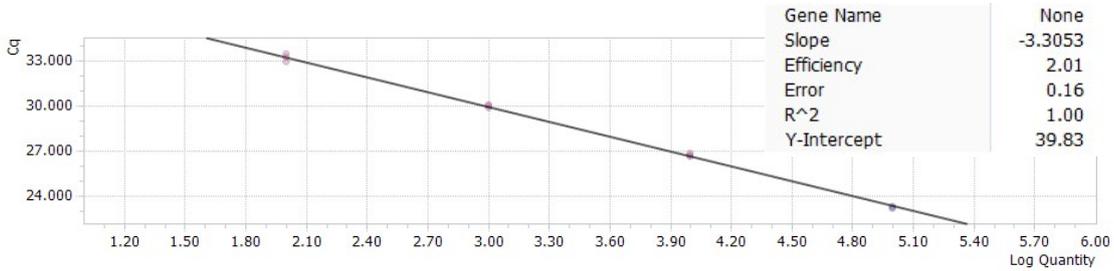
1* The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity
(Hiroki Yamanaka, Toshifumi Minamoto, 2015)より引用

○ スタンドアードの増幅曲線について

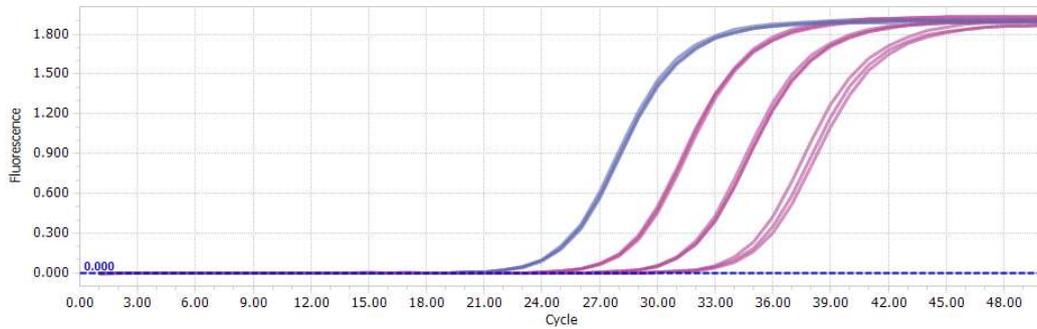
ターゲットに対するスタンダードは弊社で合成し、スタンダードカーブから各サンプルのコピー数を算出いたしました。各スタンダードは、(100コピー、1000コピー、10000コピー、100000コピー)の四点で検量線を作成し、その増幅効率は2.01(101%)でした。

また、ネガティブコントロール(NTC)には滅菌水を使用し、いずれも未検出(陰性)でした。

• Standard curve



• 増幅曲線(スタンダード)



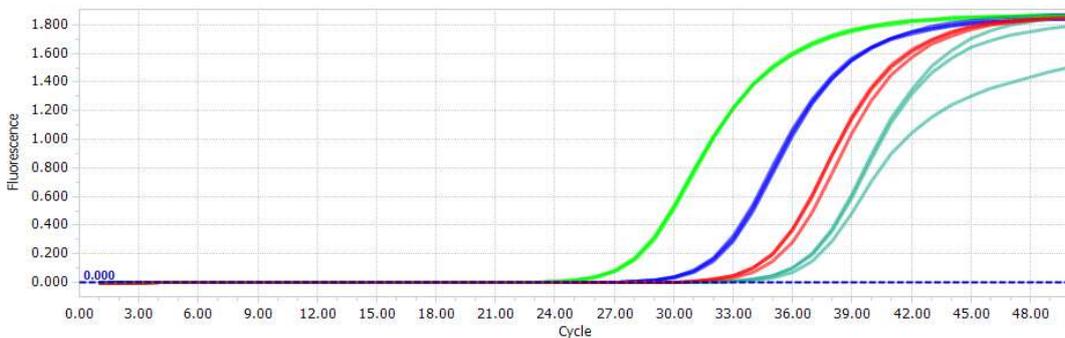
○ サンプルのCq値(Ct値)、および存在量の推定

解析は、1サンプル当たり3反復実施しました。またNTCはいずれの反復においても検出されませんでした。ターゲットの平均Cq値(3反復)、ならびに平均存在量(コピー数/抽出DNA1μl(3反復))は下記になります。

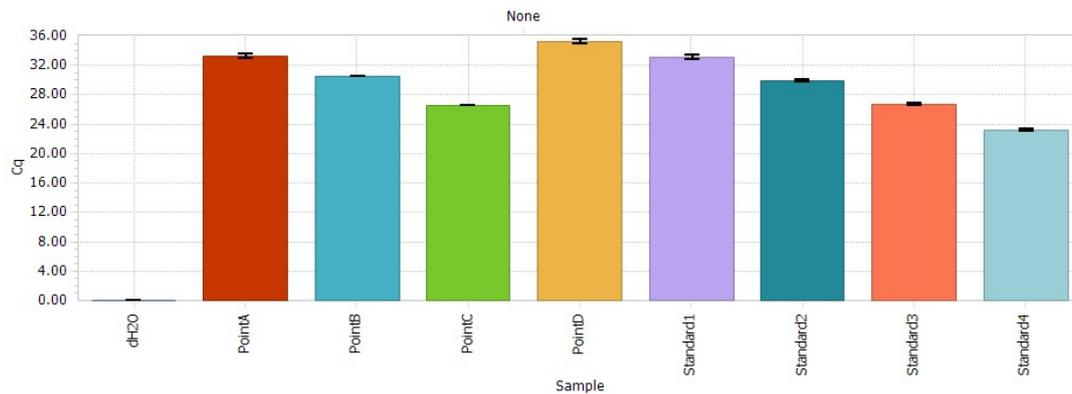
• Cq値ならびに推定される存在量(コピー数/抽出DNA1μl)

No.	Sample name	平均Cq値	コピー数/抽出DNA1μl (3反復)	標準誤差 (コピー数/抽出DNA1μl)
1	PointA	33.25	9.90E+01	1.89E+01
2	PointB	30.44	6.95E+02	5.33E+01
3	PointC	26.48	1.10E+04	5.27E+02
4	PointD	35.23	2.49E+01	4.34E+00

• 増幅曲線(サンプル)



・Cq値Barplot(スタンダード・サンプル)



株式会社ファスマック
〒243-0021
神奈川県厚木市岡田3088 ケーオービルA棟4階
TEL 046-281-9902
seqsupport@fasmac.co.jp
<http://fasmac.co.jp>