

製品コード RC451A

研究用

TAKARA

Spike-In Control DNA

説明書

v202308Da

Spike-In Control DNA は、核酸抽出工程またはリアルタイム PCR での検出工程において、任意のタイミングでスパイクできる既知濃度のコントロール用 DNA です。

抽出工程または PCR 工程で添加し、専用の Primer/Probe Mix で検出することにより、DNA 抽出操作の確認や PCR 阻害の有無を確認することができます。

I. 内容 (50 回分*)

● Spike-In Control DNA 3×10^5 copies/ μ l 500 μ l

*：抽出工程で添加する場合の回数です。

II. 保存 - 20°C

III. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器など (主なもの)

【試薬】

- ・核酸抽出キット
 - NucleoSpin Virus (製品コード 740983.10/.50/.250) 等
- ・リアルタイム PCR 試薬
 - Probe qPCR Mix, with UNG (製品コード RR392S/A/B)
- ・Spike-In Control Primer/Probe Mix (製品コード RC450A)

【器具】

- ・マイクロピペット
- ・マイクロピペット用チップ (疎水性フィルター付)
- ・リアルタイム PCR 用チューブ 等

【機器】

- ・リアルタイム PCR 装置
 - Thermal Cycler Dice® Real Time System III (製品コード TP950/TP970)
 - QuantStudio 5 Real-Time PCR System (96-well, 0.2 mL block)
(Thermo Fisher Scientific 社)

IV. 使用に際して

本製品を使用する際の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

1. 使用目的： 本製品は研究用試薬です。
2. 廃棄： 試料は感染性を有するものとして、各施設の安全規定に従って廃棄してください。
作業区域は常に清潔に保ち、サンプルまたは検査に用いた器具等は高圧蒸気滅菌器を用いて 121℃で 20 分間以上加熱滅菌処理、または次亜塩素酸ナトリウム液で処理を行った上、各施設の感染性廃棄物処理マニュアルに従って処理してください。試薬を廃棄する際は多量の水で流してください。プラスチックなどの試薬容器ならびに器具は、廃棄物の処理および清掃に関する法律に従って処理してください。

V. 操作上の注意

1. Spike-In Control DNA は溶解後、よく混合し、軽くスピンドウンしてからご使用ください。融解した試薬はただちに氷上に置いてください。使用後は - 20℃に保存してください。
2. 試薬の分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを防止してください。
3. 万一、サンプルやプライマー／プローブが核酸分解酵素（ヌクレアーゼ）の混入により分解されると、正確な検出ができません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、作業過程ごとにディスポーザブルの手袋着脱およびマスク着用など、操作には細心の注意を払ってください。
4. コンタミネーション防止のため、リアルタイム PCR 反応液の調製は操作毎にエリア分けして、物理的に隔離することを推奨します。「VIII. 補足：エリア分けについて」をご参照ください。どのエリアにおいても、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。
 - エリア 1： 反応液の調製を行います。
 - エリア 3： 反応液と鋳型の混合を行います。本製品では増幅反応と検出をリアルタイムで行うため、反応後の増幅産物を電気泳動などで解析する必要はありません。実験室内の核酸のコンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。
5. リアルタイム PCR 装置の取り扱い、それぞれの装置の取扱説明書に従ってください。
6. 本製品はリアルタイム PCR 装置での解析によって結果判定を行います。リアルタイム PCR 装置の各種 Auto 機能が適正に働かなかった場合、誤判定の原因になります。必要に応じてリアルタイム PCR 装置の取扱説明書に従い、Manual 設定を行ってください。

VI. 操作

VI-1. Spike-In Control DNA を抽出工程で添加する場合

【検査材料からの DNA 抽出】

例として NucleoSpin Virus (製品コード 740983.10/.50/.250) を用いた場合の操作方法を以下に示します。

1. サンプルの準備
血清、血漿などの無細胞生体液 190 μ l を Collection Tube (1.5 ml : ふた付き) に分取する。
2. Spike-In Control DNA の添加
Spike-In Control DNA を 10 μ l 添加する。
3. サンプルの溶解
 - 1) Proteinase K 溶液を 5 μ l 添加する。
 - 2) Buffer VL を 200 μ l 加え、ボルテックスで緩やかに混合する。
4. エタノールの添加
 - 1) エタノール(96 ~ 100%)を 200 μ l 添加し、ボルテックスで 10 ~ 15 秒混合する。
 - 2) 室温で 5 分間放置する。
5. カラムへの吸着
 - 1) NucleoSpin Virus Column を Collection Tube (2 mL) にセットする。
 - 2) 4. の溶液をカラムに添加し、4,000 $\times g$ 、3 分間遠心する。^{*1}
 - 3) ろ液を捨てた後、新しい 2 ml の Collection Tube にカラムをセットする。

^{* 1} : この遠心操作ですべての溶液がカラムを通過しなかった場合は、高速遠心 (15,000 ~ 20,800 $\times g$) を 1 分間行ってください。それでも溶液がカラム上部に残っている場合は、新しい試料でやり直しを推奨します。
6. メンブレンの洗浄
 - 1 回目の洗浄
 - 1) Buffer VW1 をカラムに 400 μ l 添加し、11,000 $\times g$ 、30 秒間遠心する。
 - 2) ろ液を捨てた後、新しい 2 ml の Collection Tube にカラムをセットする。
 - 2 回目の洗浄
 - 1) Buffer VW2 をカラムに 400 μ l 添加し、11,000 $\times g$ 、30 秒間遠心する。
 - 2) ろ液を捨てた後、新しい 2 ml の Collection Tube にカラムをセットする。
 - 3 回目の洗浄
 - 1) Buffer VW2 をカラムに 200 μ l 添加し、最高速 (最大 20,000 $\times g$) で 5 分間遠心する。
 - 2) ろ液を捨てた後、新しい 1.5 ml の Collection Tube にカラムをセットする。
7. メンブレンの乾燥
カラムのふたを開けて 56°C で 5 分間乾燥させる。
8. DNA の溶出
 - 1) 70°C で予温した RNase-free H₂O を 30 μ l^{*2} 添加し、室温で 3 分間インキュベートする。20,000 $\times g$ 、3 分間遠心し、DNA を溶出させる。
 - 2) 溶出された DNA 溶液をすぐに使用しない場合は、- 20°C で保存する。

^{* 2} : マイクロピペットで吸引する前に、チップを数回プレリンスしてください。

【リアルタイム PCR 反応】

Probe qPCR Mix, with UNG (製品コード RR392S/A/B) および Spike-In Control Primer/Probe Mix (製品コード RC450A) を組み合わせて使用する場合の操作法を以下に示します。

[注意] 以下の操作は氷上で実施してください。また、調製後は速やかに反応を開始してください。

1. 反応液のマスターミックスの調製 (エリア 1 で実施)

以下の組成で、必要数 + α 分のマスターミックスを調製する。

< ROX Reference Dye II を使用しない場合*3 >

[1 反応分のマスターミックス]

試薬	使用量
Probe qPCR Mix, with UNG (2X)	12.5 μ l
Spike-In Control Primer/Probe Mix (10 \times)	2.5 μ l
滅菌精製水	8.0 μ l
Total	23 μ l

* 3 : 対象機種

- Thermal Cycler Dice Real Time System III (製品コード TP950/TP970)

< ROX Reference Dye II を使用する場合*4 >

[1 反応分のマスターミックス]

試薬	使用量
Probe qPCR Mix, with UNG (2X)	12.5 μ l
Spike-In Control Primer/Probe Mix (10 \times)	2.5 μ l
ROX Reference Dye II (50 \times)	0.5 μ l
滅菌精製水	7.5 μ l
Total	23 μ l

* 4 : 対象機種

- QuantStudio 5 Real-Time PCR System (96-well, 0.2 mL block)
(Thermo Fisher Scientific 社)

2. マスターミックスの分注 (エリア 1 で実施)

リアルタイム PCR 用のチューブにマスターミックスを 23 μ l ずつ分注する。

3. 鑄型の添加 (エリア 3 で実施)

サンプル DNA、陰性コントロール (滅菌精製水) を 2. で分注したマスターミックスに 2 μ l 添加し、しっかりとふたをする。

4. リアルタイム PCR 反応の実施

以下の条件で反応を実施する。

[注意] 反応前に必ずチューブやプレートをスピンドウンし、内壁への反応液の付着や気泡がないことを確認してください。気泡があると、蛍光検出に影響を及ぼす場合があります。

<反応条件>

初期変性

95℃ 30 秒

PCR：45 サイクル

95℃ 5 秒

60℃ 30 秒 (蛍光検出：FAM (/ROX)*5)

* 5：ROX Reference Dye II を使用した場合に設定してください。

※ Thermal Cycler Dice Real Time System III では、Speed は Fast を選択し、解析する際に正規化補正を OFF にしてください。正規化設定変更方法は、弊社ウェブサイトをご参照ください (<https://catalog.takara-bio.co.jp>)。

※ QuantStudio 5 Real-Time PCR System では、Run mode/Ramp speed の設定は Fast にしてください。

VI-2. Spike-In Control DNA を PCR 工程から添加する場合

Probe qPCR Mix, with UNG (製品コード RR392S/A/B)、Spike-In Control Primer/Probe Mix (製品コード RC450A) を組み合わせて使用する場合は操作法を以下に示します。

[注意]

- 以下では、Spike-In Control を Single で検出する例を示しますが、目的の対象遺伝子と Multiplex の系で検出する場合は、目的の対象遺伝子は FAM 以外の蛍光標識 probe で検出してください。
- 以下の操作は氷上で実施してください。また、調製後は速やかに反応を開始してください。

1. 反応液のマスターミックスの調製 (エリア 1 で実施)

以下の組成で、必要数 + a 分のマスターミックスを調製する。

< ROX Reference Dye II を使用しない場合*6 >

[1 反応分のマスターミックス]

試薬	使用量
Probe qPCR Mix, with UNG (2X)	12.5 μ l
Spike-In Control Primer/Probe Mix (10 \times)	2.5 μ l
Spike-In Control DNA (3×10^5 copies/ μ l)	2.0 μ l
滅菌精製水	6.0 μ l
Total	23 μ l

* 6 : 対象機種

- Thermal Cycler Dice Real Time System III (製品コード TP950/TP970)

< ROX Reference Dye II を使用する場合*7 >

[1 反応分のマスターミックス]

試薬	使用量
Probe qPCR Mix, with UNG (2X)	12.5 μ l
Spike-In Control Primer/Probe Mix (10 \times)	2.5 μ l
ROX Reference Dye II (50 \times)	0.5 μ l
Spike-In Control DNA (3×10^5 copies/ μ l)	2.0 μ l
滅菌精製水	5.5 μ l
Total	23 μ l

* 7 : 対象機種

- QuantStudio 5 Real-Time PCR System (96-well, 0.2 mL block)
(Thermo Fisher Scientific 社)

2. マスターミックスの分注 (エリア 1 で実施)

リアルタイム PCR 用のチューブにマスターミックスを 23 μ l ずつ分注する。

3. 鑄型の添加 (エリア 3 で実施)

サンプル DNA、陰性コントロール (滅菌精製水) を 2. で分注したマスターミックスに 2 μ l 添加し、しっかりとふたをする。

4. リアルタイム PCR 反応の実施

以下の条件で反応を実施する。

[注意] 反応前に必ずチューブやプレートをスピンドウンし、内壁への反応液の付着や気泡がないことを確認してください。気泡があると、蛍光検出に影響を及ぼす場合があります。

<反応条件>

初期変性

95°C 30 秒

PCR：45 サイクル

95°C 5 秒

60°C 30 秒 (蛍光検出：FAM (/ROX)*8)

* 8：ROX Reference Dye II を使用した場合に設定してください。

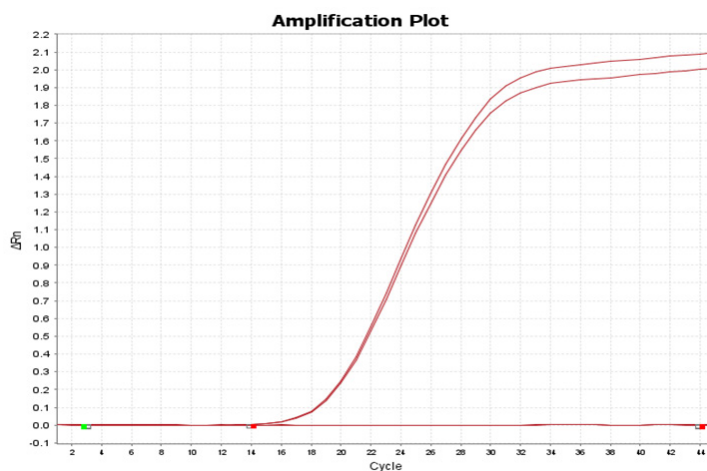
※ Thermal Cycler Dice Real Time System III では、Speed は Fast を選択し、解析する際に正規化補正を OFF にしてください。正規化設定変更方法は、弊社ウェブサイトをご参照ください (<https://catalog.takara-bio.co.jp>)。

※ QuantStudio 5 Real-Time PCR System では、Run mode/Ramp speed の設定は Fast にしてください。

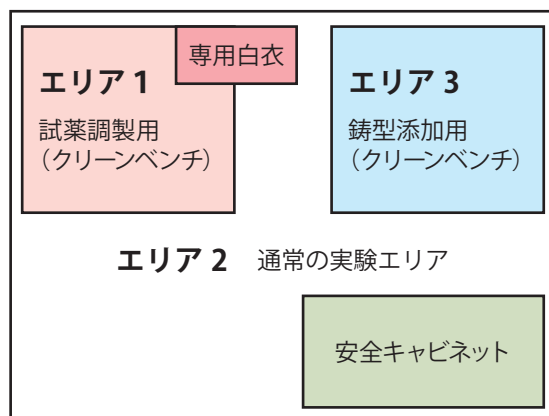
VII. 反応例

Spike-In Control DNA を 1 反応あたり 0 (陰性コントロール)、 6×10^5 コピー添加した場合の反応例を以下に示す。

※ リアルタイム PCR 装置は QuantStudio 5 Real-Time PCR System を使用。



VIII. 補足：エリア分けについて



- エリア 1：反応試薬のみを扱うエリア
リアルタイム PCR 反応液の調製、分注を行う。
(鋳型となる核酸は一切持ち込まない)
- エリア 2：通常の実験エリア
検体の取扱いや核酸調製を行う。
必要に応じて安全キャビネットを設置する。
- エリア 3：高濃度核酸を扱うエリア
分注済みの反応液への鋳型核酸の添加を行う。

IX. 関連製品

Probe qPCR Mix, with UNG (製品コード RR392S/A/B)
Spike-In Control Primer/Probe Mix (製品コード RC450A)
Spike-In Control RNA (製品コード RC452A)
Thermal Cycler Dice® Real Time System III (製品コード TP950/TP970)

X. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995
ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社