

製品コード RC452A

研究用

---

**TaKaRa**

**Spike-In Control RNA**

---

説明書

v202308Da

---

Spike-In Control RNA は、核酸抽出工程またはリアルタイム RT-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 RNA です。

抽出工程または RT-PCR 工程で添加し、専用の Primer/Probe Mix で検出することにより、RNA 抽出操作の確認や RT-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 RNA                       $6 \times 10^5$  copies/ $\mu$ l                      500  $\mu$ l

\*：抽出工程で添加する場合の回数です。

## II. 保存                      - 80℃

## 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 RNA (製品コード 740955.10/.50/.250)
  - NucleoSpin RNA Blood (製品コード 740200.10/.50) 等
- ・リアルタイム RT-PCR 試薬
  - One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix, with UNG (製品コード RR601A/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 RNA 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 - 80℃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 RNA を抽出工程で添加する場合

#### 【検査材料から RNA の抽出】

例として NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250) を用いた場合の操作方法を以下に示します。

1. Lysis Buffer と Spike-In Control RNA の混合  
350  $\mu$ l の Buffer RA1 (2-ME または 1 M (~2 M) DTT 3.5  $\mu$ l を添加) に対し、10  $\mu$ l の Spike-In Control RNA (1 検体あたり) を予め混合しておく。
2. サンプルの準備  
5  $\times$  10<sup>6</sup> 個の培養細胞を遠心で回収する。
3. サンプルの溶解  
Spike-In Control RNA 添加済み Buffer RA1 を 360  $\mu$ l 添加し、均一にホモジナイズする。
4. サンプル溶液のろ過
  - 1) NucleoSpin Filter (紫のリング) を Collection Tube (2 mL) にセットする。
  - 2) 3. の溶液をフィルターに添加し、11,000  $\times$  g、1 分間遠心する。
5. エタノールの添加  
フィルターを廃棄して、ろ液にエタノール (70%) を 350  $\mu$ l 添加し、よく混合する。
6. カラムへの吸着
  - 1) NucleoSpin RNA Column (水色のリング) を Collection Tube (2 mL) にセットする。
  - 2) 5. の溶液をカラムに添加し、11,000  $\times$  g、30 秒間遠心する。
  - 3) 新しい 2 ml の Collection Tube にカラムをセットする。
7. 脱塩
  - 1) MDB を 350  $\mu$ l 添加し、11,000  $\times$  g、1 分間遠心する。
  - 2) 新しい 2 ml の Collection Tube にカラムをセットする。
8. rDNase 反応液の調製
  - 1) 溶解済みの rDNase 溶液 10  $\mu$ l、Reaction Buffer for rDNase 90  $\mu$ l (1 抽出あたり) を混合する。
  - 2) 95  $\mu$ l を 7. のカラムに添加し、室温で 15 分間インキュベートする。
9. メンブレンの洗浄
  - 1 回目の洗浄
    - 1) Buffer RAW2 をカラムに 200  $\mu$ l 添加し、11,000  $\times$  g、30 秒間遠心する。
    - 2) 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 RA3 をカラムに 700  $\mu$ l 添加し、11,000  $\times$  g、30 秒間遠心する。
    - 2) ろ液を捨てた後、再び同じ Collection Tube にカラムをセットする。
  - 3 回目の洗浄
    - 1) Buffer RA3 をカラムに 250  $\mu$ l 添加し、11,000  $\times$  g、2 分間遠心する。
    - 2) 新しい 1.5 ml の Collection Tube にカラムをセットする。
10. RNA の溶出
  - 1) RNase-free H<sub>2</sub>O を 60  $\mu$ l 添加し、11,000  $\times$  g、1 分間遠心し、RNA を溶出させる。
  - 2) 溶出された RNA 溶液は、-20°C または -70°C で保存する。

---

### 【リアルタイム RT-PCR 反応】

One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix, with UNG (製品コード RR601A/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 +  $\alpha$  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\*1 >

[ 1 反応分のマスターミックス ]

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

\* 1 : 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\*2 >

[ 1 反応分のマスターミックス ]

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

\* 2 : 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  $\mu$ l ずつ分注する。

#### 3. 鋳型の添加 (エリア 3 で実施)

サンプル RNA、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  $\mu$ l 添加し、しっかりとふたをする。

---

#### 4. リアルタイム RT-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>

###### 逆転写反応

52℃ 5分

95℃ 10秒

###### PCR：45 サイクル

95℃ 5秒

60℃ 30秒 (蛍光検出：FAM (/ROX)\*3)

\* 3：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-TimePCR System では、Run mode/Ramp speed の設定は Fast にしてください。

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

One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix, with UNG (製品コード RR601A/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の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 \*4 >

[ 1 反応分のマスターミックス ]

試薬	使用量
One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix, with UNG (2X)	12.5 $\mu$ l
Spike-In Control Primer/Probe Mix (10 $\times$ )	2.5 $\mu$ l
Spike-In Control RNA (6 $\times$ 10 <sup>5</sup> copies/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
滅菌精製水	7.0 $\mu$ l
Total	23 $\mu$ l

\* 4 : 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 \*5 >

[ 1 反応分のマスターミックス ]

試薬	使用量
One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix, with UNG (2X)	12.5 $\mu$ l
Spike-In Control Primer/Probe Mix (10 $\times$ )	2.5 $\mu$ l
ROX Reference Dye II (50 $\times$ )	0.5 $\mu$ l
Spike-In Control RNA (6 $\times$ 10 <sup>5</sup> copies/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
滅菌精製水	6.5 $\mu$ l
Total	23 $\mu$ l

\* 5 : 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  $\mu$ l ずつ分注する。

### 3. 鋳型の添加 (エリア 3 で実施)

サンプル RNA、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  $\mu$ l 添加し、しっかりとふたをする。

#### 4. リアルタイム RT-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>

###### 逆転写反応

52°C 5分

95°C 10秒

###### PCR：45 サイクル

95°C 5秒

60°C 30秒 (蛍光検出：FAM (/ROX))\*6)

\* 6：ROX Reference Dye II を使用した場合に設定してください。

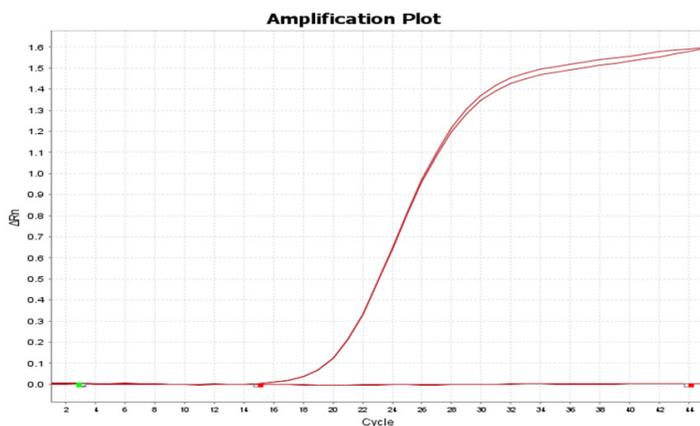
※ Thermal Cycler Dice Real Time System III では、Speed は Fast を選択し、解析する際に正規化補正を OFF にしてください。正規化設定変更方法は、弊社ウェブサイトをご参照ください (<https://catalog.takara-bio.co.jp>)。

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

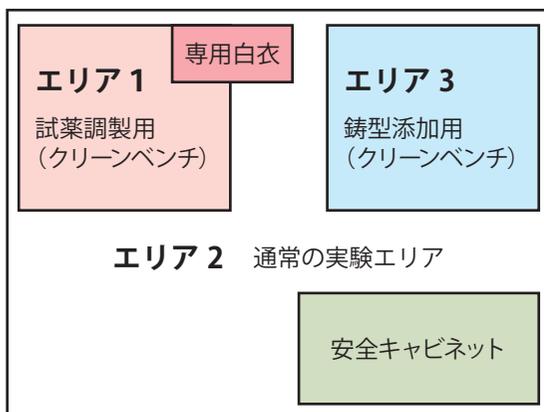
## VII. 反応例

Spike-In Control RNA を 1 反応あたり 0 (陰性コントロール)、 $6 \times 10^5$  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 RT-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

One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix, with UNG (製品コード RR601A/B)  
Spike-In Control Primer/Probe Mix (製品コード RC450A)  
Spike-In Control DNA (製品コード RC451A)  
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。PrimeScriptはタカラバイオ株式会社の商標です。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**