

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 6×10^5 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 - 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 μ l の Buffer RA1 (2-ME または 1 M (~2 M) DTT 3.5 μ l を添加) に対し、10 μ 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 10⁶ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ l、Reaction Buffer for rDNase 90 μ l (1 抽出あたり) を混合する。
 - 2) 95 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 H₂O を 60 μ 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 + 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*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 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

* 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 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

* 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 μ 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 μ 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 μ l
Spike-In Control Primer/Probe Mix (10 \times)	2.5 μ l
Spike-In Control RNA (6 \times 10 ⁵ copies/ μ l)	1.0 μ l
滅菌精製水	7.0 μ l
Total	23 μ 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 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 RNA (6 \times 10 ⁵ copies/ μ l)	1.0 μ l
滅菌精製水	6.5 μ l
Total	23 μ 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 μ 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 μ 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。

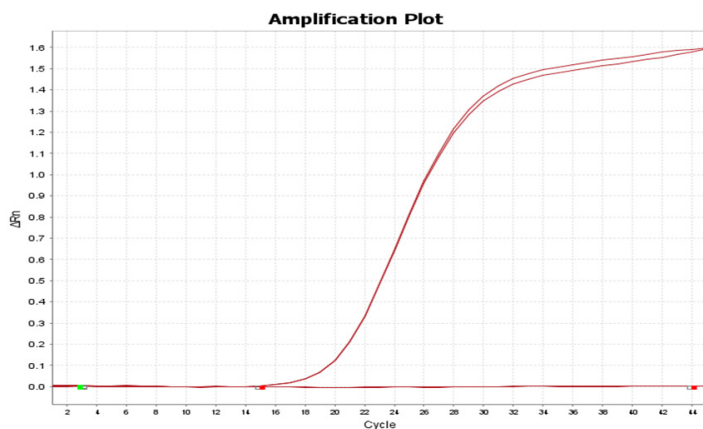
※ Thermal Cycler Dice Real Time System III では、Speed は Fast を選択し、解析する際に正規化補正を OFF にしてください。正規化設定変更方法は、弊社ウェブサイトをご参照ください (<https://catalog.takara-bio.co.jp>)。

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

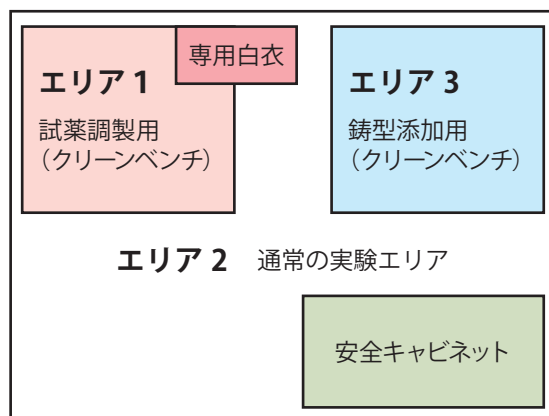
VII. 反応例

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