

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 6204 - a  
No. +++



定量解析用リボ核酸 (RNA) 水溶液

Ribonucleic Acid (RNA) Solutions for Quantitative Analysis

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 5 種類の異なる塩基配列のリボ核酸 (RNA) 水溶液のセットである。各試料溶液は 533 塩基または 1033 塩基の 1 本鎖 RNA を含む。本標準物質は、DNA マイクロアレイ (DNA チップ) や定量的 RT-PCR (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応)、次世代シーケンサー等を用いた RNA 定量解析において、定量装置および分析法の評価や精度管理に用いることができる。また、DNA チップの評価のための RNA 標準物質の値付けに用いることができる。

【認証値】

5 本の試料 (RNA500-A、-B、-C、RNA1000-A、-B) についての 25 °C における総 RNA (配列によらず、試料中に含まれる全ての RNA) 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。

試料名称	総 RNA の質量濃度	
	認証値 (ng/μL)	拡張不確かさ (ng/μL)
RNA500-A	30.6	3.1
RNA500-B	27.3	2.4
RNA500-C	32.4	3.2
RNA1000-A	58.3	4.9
RNA1000-B	59.5	5.3

【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 RNA の質量分率を振動式密度計による試料の密度を用いて質量濃度に変換したものである。

(1) 同位体希釈質量分析法

試料中 RNA を酵素分解した後、液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC/MS) を用いた測定によって得られたリボヌクレオチドの質量分率から総 RNA の質量分率を得た。

(2) 誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS)

試料中 RNA を酸分解した後、ICP-MS 測定によって得られたりん (P) の質量分率から総 RNA 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、差数法と ICP-発光分光分析法によるりん測定により純度決定した標品を用いた同位体希釈質量分析法によるリボヌクレオチド定量と、JCSS りん酸イオン標準液を用いた ICP-MS によるりん定量により決定されたものであり、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 RNA 分子の塩基組成を用いて算出した 25 °C における RNA の物質質量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。

試料名称	RNA の物質濃度	
	参考値 (pmol/μL)	拡張不確かさ (pmol/μL)
RNA500-A	0.178	0.019
RNA500-B	0.159	0.016
RNA500-C	0.189	0.020
RNA1000-A	0.175	0.015
RNA1000-B	0.179	0.018

**【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3ヶ月間有効である。

**【形状等】**

本標準物質は、常温では無色透明液体で、プラスチック製バイアルに300μLずつ分注された試料5本がナイロン-直鎖状低密度ポリエチレン袋に吸気密封され、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】**

小分けした約110個の試料からランダムに10個取り出し、吸光度分析法でRNAの測定を行い、均質性を反映した試料間のばらつきを評価した。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】**

本標準物質は、NMIJにおいて安定であることを確認した。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。NMIJにおいては、安定性のモニタリングを継続的に実施する。

**【保存に関する注意事項】**

到着後直ちに-20℃以下の冷凍庫に保存すること。

**【使用に関する注意事項】**

使用前に常温（20℃付近）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上で十分に混和した後に使用すること。解凍後はすみやかに使い切ること。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RNA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。

**【取り扱いにおける注意事項】**

Safety Data Sheet(SDS)に従って取り扱うこと。

**【製造方法等】**

本標準物質は、(独)産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門において設計された、533塩基と1033塩基からなる5種類の人工RNAであり、同グループで調製・小分けされた。上記の鋳型となる塩基配列DNAをプラスミドへ挿入し、大腸菌内で複製した後にプラスミドを抽出、精製し、対象となる塩基配列を制限酵素で切断した後に酵素転写反応により鋳型DNAに相補的なRNAを合成、精製したものである。

**【参考情報】****① 塩基配列・分子量情報**

各試料に含まれるRNAは、図1の塩基配列として設計・調製した。各RNAの分子量と塩基配列に関するデータベース（DDBJ/GenBank/EMBL）のアクセッションナンバーを併せて示す。調製したRNAについて、RNAの相

補的 DNA (cDNA) を合成し、自動塩基配列決定装置を用いて塩基配列を解読した結果、図 1 に示す塩基配列を有することを確認した。

```

BASE COUNT      165 a   127 c   121 g   120 u
ORIGIN
   1 GGGCUCGACU AGUUAUACG GUACAGGAUA ACCGAUCGGC UUGCAACAUA ACGGCGUUA
  61 GAUUGCGGGA GUGCAGUUUC CGAUUCUCAC AUCAAUCGCC AAUAAGGCCU UGUCGCAUA
 121 UAGACUCAAC GGUUCUAGUA GCUGAUCGGU AUUACGUGAC GCAACCGAUU AGACAUGCAC
 181 AAUCCUUGG UCGCUAUACU ACGGAAUUCG UCAGGUACUA UAACCCGUCG CAGGCCUAAU
 241 ACGUGUCGUC ACAUCGCCAA CCUAUCGUCA GUCGGAAAGA CGUUGCUGUC UACCAUCGAA
 301 ACUAUUUACC GCUCCGAGAU UCACGAGUAC GAACUCACGA GGAAGUUGCC CUAUGUAAGG
 361 UAUCAUCUCCA GGUACUGCGC CGAUAGUACC AGGUGAUCAA ACGGUUGCAA GAAGGCCACG
 421 ACGUAUCGGG CUCUUUAGAC GUACGCUCGA GAUUAACGC GCACUGAUUC ACUUUAGCCC
 481 GGAUUGUCUC GGUGCGAUGU AGAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA
    
```

//

分子量: 171 603.8

アクセッションナンバー : AB610939 (500-1 という名称で登録)

図 1-(a) 試料 RNA500-A

```

BASE COUNT      163 a   130 c   130 g   110 u
ORIGIN
   1 GGGAGACUAA AUCUCGGCGU CGGUUCAUAC GCGCGAUCGU UUGCUGUCAG GGCAUACUCG
  61 AAUCCGGACU CCGACAUAUA UAGGCCAUCC UGAUJAGCCG AUCAUUCGAG UCACGUAUAG
 121 GCAGGCUCUG CGAUAUCCCG AUUJACUGGA GAAGCUGAAU CCCACCUAGA GCGAACUGUC
 181 AGAGGAUCGA CCUCAGGCUC GCUAUCAUCA UAACGGCGGA CGACCUUGU CACAUUCCGA
 241 ACGCUACGUG ACGAUUUUAU CUGUCGAAAG GCAUAGAACG CCGGUCAUA UCCUGCGGCA
 301 UUCUCUUUAU CACCGGCUAU AACUACUAGG UUCCGCAGAU AUAGACUGCG CACGGAACAU
 361 GUAGAUJAGU CGAGUJAGGU AGCGAUUUAA CGACUCGACU UACAGACAGA GACGUJAGAC
 421 GUCAGACGAG UGGUJUGCCC ACCAGAGGCG AUACAGGCUG UACCUJCGUA GCACUJAGAGU
 481 CGUGCGUCAU GCGGACCCUA UCUAUUUUUU AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA
    
```

//

分子量: 171 906.1

アクセッションナンバー : AB610940 (500-2 という名称で登録)

図 1-(b) 試料 RNA500-B

```

BASE COUNT      171 a   126 c   116 g   120 u
ORIGIN
   1 GGGACUAAAC GCACUGAAUA CCGUACUACA ACAGACGAAG UUGUAAAUJAG CCGUGGUAU
  61 UAUGAACGAA UAUGGCCAUG UGUCCGCUAA UCCGCGGUAC UAGCCAGUUA GCAACUGCAC
 121 CAUUCGCUCA CGUCAGUGGU UCUAUGCAAU AUGCUCCAGU ACCCUGUAAG UUCGCAAUCA
 181 AUAGACGCGC CUUACUCCUC UCAAGAAGGG UAUCUGCAUG AGCCGACACA UCAAGACCCA
 241 AUGGACGUUU GAGCGAGUGG CUUGGAGAGU AUUJACGCAC UAACUCUJCG AAGGCUUACU
 301 UCGGCAAUUC CGCGAGCUCC ACUJUUJACA UGCCAUJACG ACAGGAUCAA UUCUGCGACU
 361 GCACGACCGA AUUJUGCACC UACUJUGUGA GGCACGAGAU UCGUCUJGCA GCUJUUJAAA
 421 GGGUJCCAGC UJAUJGUAJG GCGACUCUJG AGUGCGUJAU AAAGCAACGC CCAUJCGGCA
 481 UGUJACCGGA UJGUJACGGGC GAUJUUUUUU AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA
    
```

//

分子量: 171 547.8

アクセッションナンバー : AB610942 (500-4 という名称で登録)

図 1-(c) 試料 RNA500-C

BASE COUNT      283 a      258 c      257 g      235 u  
 ORIGIN  
 1 GGGCGAUUCG AAGAGGUACG AGUGGACGCG UAAGCGAAUG ACCUAGACCU CGGCGUUAAU  
 61 UAGGACCCUC UAAUCGAAA CUCGACUCUC GUCCCAAUCC AAUGGAUGUC CAGUGCUCGG  
 121 UAGCAUGAUC GUAUGAUGCG UAUCGUCGCG AGUAGAGGCC GACAAGUAGA CCGGUCGAA  
 181 UUGGAGGUA CUUAGCCUCA UAUGAGAGCG CCUUGAAAUC ACCCAGUGCC GAUCGUAGCG  
 241 GAAGAUUACU AGACUCCGCA GGGAAAUCCC ACCUGUAACG ACGGAAGAGC GUCACGAUAG  
 301 CCUCUAACUA UCCGGUUCGC GACUAUCCGC UUAUGUGCCU CCACCUAAUG UGAGAGUUCA  
 361 CCGAGGCAA UGAUCUGUCA ACCGGUGUGA UCAGGACAUU CGCUUAAUGC CGUAGAAGCC  
 421 CGUAAGCUCU CCGCCUUUA AGAGGUUGUA GACGGCAGUU CUAAGGUCGU CGGGUCUAG  
 481 CCUUGCGACC UAAUAAUACG ACCGUGUGCU UAUGCGGACU GUCCUCUAAU GAAUAUCGCU  
 541 UGUCUUAAGC UGGCGGUACU AGUGCUUAGG AUCGCACACC UCACCACAGU GCGCAUUUAA  
 601 CCCUAGAUU AACAUUGUAG ACACCGGUAA AUCGCGUUCG AAUUUCGCC AAUCGAAGGC  
 661 CCACAUACU ACGUCGCCUG UAUUCUGAAC CUUGCGUCG ACGUAGCAUA UAGAGCGUAC  
 721 AUJCAAUCUA CCAGUUGCCU CCGACUGAAG UCGGCUAGCG UAUGACAUAG CGAGCUCUUA  
 781 GUJCGGUGAC UACUUCUAGC ACUCCCAAU CAAGCUCUGC GUUAUCAGGG UCGGAAGGUU  
 841 AGGUUCGAU UUCGACAGGC UAACAGAGCG AUAAGUGAUG AAUCCGCUCC GGGAGCAUCU  
 901 AGACAAUAC CGCGUUAAG AGAAGGGCGA CAUAGCGCG GGUGUCAACG UUCAACCAG  
 961 UUGUAGCCAU CGCGAUUACC CGUUGGAAU CUGAGGCGAC CUAAAAAAAAA AAAAAAAAAA  
 1021 AAAAAAAAA AAA

//

分子量: 332 585.9

アクセッションナンバー : AB610946 (1000-3 という名称で登録)

図 1-(d) 試料 RNA1000-A

BASE COUNT      267 a      262 c      245 g      259 u  
 ORIGIN  
 1 GGGAUUCUA GGACUGUACU CUCGGUGCGU UGACCAUACG UAAGGCGAUC CUUUGAGUGG  
 61 AUCCCAUAC UACGGGUCAC ACCUGCUUAC CCUCCCAAUA GUJGUUCAG UAGCUCUCAG  
 121 CGGUUCUGGC AGAGUUCGGA UGAGUUUCUG CCUAUCAGUU CAUAGGUGCC CACGCAUUGG  
 181 GUCCACUCCU GCAGAGAAU UGCGCAUUGC ACCAUUACUA CAGGCGGCUU UGGUUGUACG  
 241 UCUAACGUUC GCACCAACAG GAGUCUCAGC UGAUCAUAGG CCCGGACCCU CAAUGUUCGA  
 301 UGCGAUJCGU AAGAGGGUGU UCGUGUAAGG CCCAAUACGU UGUCAUGCCG GCUJAGAAAC  
 361 CCAGUCGGAC GCGUCUCUAA CACUCGGAUG UGCAGGUAAU AGCCUUUACC AGCGCUUCUG  
 421 UACGACCAUA CUJAGAGCUC GAGAUJCGA CAUGAAAGGA UUCGCGAGUA CUGACCUJAA  
 481 UACACGUUCA UJAGGUAAU CGGCCGAGAU UCAACUUUAC GGCACGGUA CAGCUCUCU  
 541 ACCUAAUUC GUCGAAGUCU CUCACGAUAG UCGCGUACAU UUJAGGGCG GUACACACAG  
 601 CACGUACAAC CCAUCGACU CUGAGUJCCC ACUCCACGGU ACGUUCACAG CACGUUGCCU  
 661 UAAUAAGCUA CUJCGUJCC GAGCAGUCA CUAUCUGUU CCGGGUJAGC GCUCUGAUCA  
 721 GCACCCGUUU ACUGACACGA ACCGCUAUCG AAUACUGAGU AGGUCGUGUG CCAAUAACUU  
 781 UGGUJGACG UAAGCUAAUC GGACGGCGAC UUUJAGCAAG AACUCAGCCG UAUUGUJACG  
 841 CUGACCGUAA ACGACGUGAG CGAUJGUCGU AGGUJAGCCA UAACAUAAAG GUUJCCGAA  
 901 CGGUJAGCAU GUJAGGCCUG UGUCCAGUCA GGUAAUACGA GAGAGUAAU AACGCGAUCU  
 961 AAUGAGAAGC CGUJCAUGUC GAUCUUGUU ACGGGUGUGA AAUAAAAAAAA AAAAAAAAAA  
 1021 AAAAAAAAA AAA

//

分子量: 331 744.9

アクセッションナンバー : AB610947 (1000-4 という名称で登録)

図 1-(e) 試料 RNA1000-B

② ゲル電気泳動解析結果

本標準物質について、ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびマイクロチップ型ゲル電気泳動により泳動解析を行ったところ、533 塩基または1033 塩基付近に単一のバンドが確認された。

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 °Cにおける密度測定を行ったところ、全ての試料の密度は 0.9971 g/cm<sup>3</sup>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、生産責任者は藤井紳一郎、値付け担当者は藤井紳一郎、柴山祥枝、稲垣和三、成川知弘、関口勇地、川原崎守、吉岡真理子である。

【情報の入手】

本標準物質に関して認証値の変更等、重要な改訂があった場合は購入者に通知する。購入者は下記ホームページから「標準物質ユーザー登録」を行うことにより、上記の通知を入手できる。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、(独)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)の研究成果に基づくものであり、(独)産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門との研究協力により開発された。

2015 年 4 月 1 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/>

改訂履歴

2015.04.01 組織名称等の変更に伴い、関連する記載内容を変更した。