

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-b  
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 17034 及び ISO/IEC 17025 の要求事項に適合するマネジメントシステムに基づいて生産された 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。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、定量装置及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】

本標準物質の認証値は 5 種類の RNA 水溶液（RNA500-A、-B、-C、RNA1000-A、-B）について、それぞれに含まれる 25 °C における総 RNA（塩基の数や配列によらず、試料中に含まれる全ての RNA）の質量濃度である。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	総RNAとしての濃度	
	認証値 質量濃度 (ng/μL)	拡張不確かさ 質量濃度 (ng/μL)
RNA500-A	33.4	2.6
RNA500-B	32.3	2.6
RNA500-C	32.1	3.1
RNA1000-A	68.2	5.8
RNA1000-B	64.1	5.5

RNA500-A、-B、-C、RNA1000-A、-B は、それぞれ参考情報の図 1 の RNA として設計、調製された RNA の水溶液である。

## 【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（リボヌクレオチド測定及びりん測定）において求められたリボヌクレオチドまたはりんの定量値を基に目的 RNA の質量分率を算出した。算出した RNA の質量分率に対して、振動式密度計により求めた試料の密度を用いて質量濃度に変換して決定したものである。

## (1) 同位体希釈質量分析法（IDMS）によるリボヌクレオチド測定

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）を用いたリボヌクレオチド測定によってリボヌクレオチドの質量分率を得た。その後、りん酸ジエステル結合部分の脱水を考慮した各リボヌクレオチド質量分率を算出し、それらの総和から 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）によるりん測定

試料中 RNA を酸分解した後、ICP-MS を用いた測定によって得られたりんの質量分率と目的 RNA に含まれるりんの個数から 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 IDMS によるリボヌクレオチド測定と ICP-MS によるりん測定により決定した。IDMS によるリボヌクレオチド測定においては、NMIJ において定量 NMR により濃度評価したリボヌクレオチド標準液を用いた。定量 NMR ではフタル酸水素カリウム認証標準物質(NMIJ CRM 3001-b)で校正された内標準物質を用いた。ICP-MS によるりん測定では、JCSS りん酸イオン標準液を用いた。振動式密度計による密度測定では、JCSS 密度標準液（純水）を用いた。従って、本標準物質の認証値は国際単位系(SI)にトレーサブルである。

**【参考値】**

本標準物質の参考値は、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 の物質濃度である。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	対象とする RNA 分子としての濃度	
	参考値 物質濃度 (pmol/μL)	拡張不確かさ 物質濃度 (pmol/μL)
RNA500-A	0.195	0.014
RNA500-B	0.188	0.014
RNA500-C	0.187	0.017
RNA1000-A	0.205	0.015
RNA1000-B	0.193	0.014

**【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6ヶ月間有効である。

**【物質に関する情報】**

本標準物質は 533 塩基または 1033 塩基からなるリボ核酸 (RNA) を滅菌水に溶解することにより調製した水溶液であり、常温では無色透明の液体である。核酸低吸着プラスチック製バイアルに 300 μL 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脱気封入され、さらにアルミニウムラミネート袋に密封されている。

**【保存に関する注意事項】**

-30 °C から -20 °C 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 25 °C ± 5 °C 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、完全に均一化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】**

安全データシート (SDS) を参考にして取り扱うこと。

**【製造等】**

本標準物質は、産業技術総合研究所生命工学領域バイオメディカル研究部門において設計された、特定の遺伝子をコードしない 533 塩基と 1033 塩基からなる 5 種類の人工 RNA であり、同部門で調製・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。各精製 RNA 水溶液は滅菌水で希釈した後、核酸低吸着プラスチック製バイアルに約 300 μL ずつ

分注した。試料5本を1セットとしてナイロン-直鎖状低密度ポリエチレン袋に脱気封入され、さらにアルミニウムラミネート袋で密封した。

### 【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の分子量と酵素転写反応に用いた鋳型DNAの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 UUGCAACAUU ACGGCGUUA
  61 GAUUGCGGGA GUGCAGUUUC CGAUUCUCAC AUCAAUCGCC AAUAAGGCCU UGUCGCAUA
 121 UAGACUCAAC GGUUCUAGUA GCUGAUCGGU AUUACGUGAC GCAACCGAUU AGACAUGCAC
 181 AAUUCUUGG UCGCUAUACU ACGGAAUUCG UCAGGUACUA UAACCGGUCG CAGGCCUAU
 241 ACGUGUCGUC ACAUCGCCAA CCUAUCGUCA GUCGGAAAGA CGUUGCUGUC UACCAUCGAA
 301 ACUAAUUACC GCUCCGAGAU UCACGAGUAC GAACUCACGA GGAAGUUGCC CUAUGJAAGG
 361 UAUCACUCCA 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（6204-a-500-1という名称で登録）

図1-(a) 試料RNA500-A 中に含まれるRNAの塩基配列

```

BASE COUNT      163 A      130 C      130 G      110 U
ORIGIN
   1 GGGAGACUAA AUCUCGGCGU CGGUUCAUAC GCGCGAUCGU UUGCUGUCAG GGCAUACUCG
  61 AAUCCGGACU CCGACAAUUA UAGGCCAUCC UGAAUAGCCG AUCAUGCGAG UCACGUAUAG
 121 GCAGGCUCUG CGAUAUCCCG AUUACUGGA GAAGCUGAAU CCCACCUAGA GCGAACUGUC
 181 AGAGGAUCGA CCUCAGGCUC GCUAUCAUCA UAACGGCGGA CGACCUGUGU CACAUUCCGA
 241 ACGCUACGUG ACGAUUUUUA CUGUCGAAAG GCAUAGAACG CCGGUCAAUA UCCUGCGGCA
 301 UUCUCUUUUA CACCGGCUAU AACUACUAGG UUCCGCAGAU AUAGACUGCG CACGGAACAU
 361 GUAGAUAGAU CGAGUAGGGU AGCGAUUUUA CGACUCGACU UACAGACAGA GACGUAGAAC
 421 GUCAGACGAG UGGUAGGCC ACCAGAGGCG AUACAGGCGU UACCUGCGUA GCACUAGAGU
 481 CGUGCGUCAU GCGGACCCUA UCUAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA

```

//

分子量: 171 906.1

アクセッションナンバー：AB610940（CRM6204-a-500-2という名称で登録）

図1-(b) 試料RNA500-B 中に含まれるRNAの塩基配列

BASE COUNT 171 A 126 C 116 G 120 U

ORIGIN

```

1 GGGACUAAAC GCACUGAAUA CCGUACUACA ACAGACGAAG UUGUAAAUAAG CCGUGGUAUU
61 UAUGAACGAA UAUGGCAUG UGUCCGCUAA UCCGCGGUAC UAGCCAGUUA GCAACUGCAC
121 CAAUCGCUCA CGUCAGUGGU UCUAUGCAAU AUGCUCCAGU ACCCUGUAAG UUCGCAAUCA
181 AUAGACGCGC CUUACUCCUC UCAAGAAGGG UAUCUGCAUG AGCCGACACA UCAAGACCCA
241 AUGGACGUUU GAGCGAGUGG CUUGGAGAGU AUUAACGCAC UAACUCUUCG AAGGCUUACU
301 UCGGCAAUUC CGCGAGCUCC ACUUAUAACA UGCCAAUACG ACAGGAUCAU UUCUGCGACU
361 GCACGACCGA AUUAUGCACC UACUUGUGA GGCACGAGAU UCGUCUUGCA GCUAUUUAAA
421 GGGUUCGAGC UUAUGGAUAG GCGACUCUUC AGUGCGUAAU AAAGCAACGC CCAAUCGGCA
481 UGUUACCGGA UAGUACGGGC GAUAAAAAAA AAAAAAAA AAA

```

//

分子量: 171 547.8

アクセッションナンバー : AB610942 (6204-a-500-4という名称で登録)

図 1-(c) 試料 RNA500-C 中に含まれる RNA の塩基配列

BASE COUNT 283 A 258 C 257 G 235 U

ORIGIN

```

1 GGGCGAUUCG AAGAGGUACG AGUGGACGCG UAAGCGAAUG ACCUAGACCU CGGCGUUAUU
61 UAGGACCCUC UAAUCGCAA CUCGACUCUC GUCCCAAUCC AAUGGAUGUC CAGUGCUCGG
121 UAGCAUGAUC GUAUGAUGCG UAUCGCGCG AGUAGAGGCC GACAAGUAGA CCGGUGCGAA
181 UUUGGAGGUA CUUAGCCUCA UAUGAGAGCG CCUUGAAUUC ACCCAGUGCC GAUCGUAGCG
241 GAAGAUUACU AGACUCCGCA GGGAAAUCCC ACCUGUAACG ACGGAAGAGC GUCACGAUAG
301 CCUCUAAUA UCCGGUUCGC GACUAUCCGC UUAUGUGCCU CCACCUAAUG UGAGAGUICA
361 CCGAGGCAA UGAUCUGUCA ACCGGUGUGA UCAGGACAUA CGCUUAAUUC CGUAGAAGCC
421 CGUAAGCUCU CCGCCUUUA AGAGGUUGUA GACGGCAGUU CUAAGGUCGU CGGGUCUAUG
481 CCUUGCGACC UAAUAAUACG ACCGUGUGCU UAUGCGGACU GUCCUCUAAU GAAUUAUCGU
541 UGUCCUAAGC UGGCGGUACU AGUGCUUAGG AUCGCACACC UCACCACAGU GCGCAUUUAA
601 CCCUGUAGAU AACAUUGUAG ACACCGGUAU AUCGCGUUCG AAUUUCGCC AAUCGAAGGC
661 CCACAUCACU ACGUCGCCUG UAUUCUGAAC CUUGCGCUGC ACGUAGCAUA UAGAGCGUAC
721 AUUCAUUAU CAGUUGCCU CCGACUGAAG UCGGCUAGCG UAUGACAUAG CGAGCUCUUA
781 GUUCGGUGAC UACUUCUAGC ACUCCCAAU CAAGCUCUGC GUUAUCAGGG UCGGAAGGUU
841 AGGUUCGAU UUCGACAGG UAACAGAGCG AUAAGUGAUG AAUCCGCUCC GGGAGCAUCU
901 AGACAAUAAC CGCGGUUAAG AGAAGGGCG CAUAAGCGCG GGUGUCAACG UUCAAACCG
961 UUGUAGCCAU CGCGAUUACC CGUUGGGAU CUGAGGCGAC CUAAAAAAA AAAAAAAA
1021 AAAAAAAA AAA

```

//

分子量: 332 585.9

アクセッションナンバー : AB610946 (6204-a-1000-3という名称で登録)

図 1-(d) 試料 RNA1000-A 中に含まれる RNA の塩基配列

BASE COUNT 267 A 262 C 245 G 259 U

## ORIGIN

1 GGGAUUCCUA GGACUGUACU CUCGGUGCGU UGACCAUACG UAAGGCGAUC CUUUGAGUGG  
61 AUCCCAUUAC UACGCGUCAC ACCUGCUUAC CCUCCCAUA GUUGGUUCAG UAGCUCUCAG  
121 CGGUUCUGGC AGAGUUCGGA UGAGUUUCUG CCUAUCAGUU CAUAGGUGCC CACGCAUUGG  
181 GUCCACUCCU CGCCAGAAUU UGCGCAUUGC ACCAUUACUA CAGGCGGCUU UGGUUGUACG  
241 UCUAACGUUC GCACCAACAG GAGUCUCAGC UGAUCAUAGG CCCGGACCCU CAAUGUUCGA  
301 UGCGAUUCGU AAGAGGGUGU UCGUGUAAGG CCCAAUACGU UGUCAUGCCG GCUUAGAAAC  
361 CCAGUCGGAC GCGUCUCUAA CACUCGGAUG UGCAGGUAAU AGCCUUUACC AGCGCUUCUG  
421 UACGACCAUA CUUAGAGCUC GAGAUGCCGA CAUGAAAGGA UUCCGGAGUA CUGACCUGAA  
481 UACACGUUA UAGCGUAAU CGGCCGAGAU UCAACUUUAC GGCACGGAUA CAGCUCCUCU  
541 ACCUAUUUCC GUCGAAGUCU CUCACGAUAG UCGCGUACAU UUAGUGGGCG GUACACACAG  
601 CACGUCAACG CCAUCGCACU CUGAGUJCCC ACUCCACGGU ACGUUCACAG CACGUUGCCU  
661 UAAUJAAGUA CUUCGGUJCC GAGCAGUCAA CCUACUGUUU CCGGGUJAGC GCUCJGAUCA  
721 GCACCCGUUU ACUGACACGA ACCGCUAUCG AAUACUGAGU AGGUCGUGUG CCAAUAAUJ  
781 UGGUJGCAGC UAAGCUAAUC GGACGGCGAC UUUJAGCAAGU AACUCAGCCG UAUJGUUJAGC  
841 CUGACCGUAA ACGACGUGAG CGAUJGUCGU AGGUJAGCCA UAACAUAAAG GUUJCCCGAA  
901 CGGUJAGCAUA GUJAGGCCUG UGUCCAGUCA GGUAAUJCGA GAGAGUAAUJ AACGCGAUJU  
961 AAUGAGAAGC CGUGCAUGUC GAUCCUJGUU ACGGGUGUGA AAUAAAAAAAA AAAAAAAAAA  
1021 AAAAAAAAA AAA

//

分子量: 331 744.9

アクセッションナンバー：AB610947 (6204-a-1000-4という名称で登録)

図 1-(e) 試料 RNA1000-B 中に含まれる RNA の塩基配列

## ② ゲル電気泳動解析結果

本標準物質について、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、山崎太一、関口勇地、野田尚宏、松倉智子、佐々木章、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、下記ホームページから「標準物質ユーザー登録」を行った購入者に通知する。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、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）および経済産業省委託事業平成27年度政府戦略分野に係る国際標準化活動「標準物質を用いた臨床検査機器の測定妥当性評価に関する国際標準化

出荷日：20xx.xx.xx

6204b00-160210-211223

・普及基盤構築」(株式会社三菱総合研究所からの再委託)の研究成果に基づくものであり、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。

2020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 石村 和彦

本標準物質に関する質問等は以下にお問い合わせをお願いします。

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://unit.aist.go.jp/qualmanmet/refmate/>