

For Genetic Research microRNA Extractor[®] Kit for Purified EV

【Introduction】

This kit is for RNA extraction, including micro RNA, from purified Extracellular Vesicle (EV) derived from cell culture supernatants, serum, and plasma. microRNAs can be easily and efficiently obtained from EVs by using a proteolytic enzyme, a chaotropic agent, and spin columns. There is no need to use toxic chemicals such as phenol or chloroform.

This product is intended for laboratory use only.

【Features】

- Optimal for RNA extraction from purified EV solution
- Excellent RNA recovery
- Phenol and chloroform are not required
- Extracted RNA can be used for real-time quantitative PCR, microarrays, and next-generation sequencing

【Kit contents (for 20 extractions)】

This kit consists of 9 components.

| | |
|-------------------|-----------------|
| Lysis Solution | 9 mL × 1 tube |
| Reducing Agent | 80 μL × 1 tube |
| Protease Solution | 200 μL × 1 tube |
| Enhancer | 200 μL × 1 tube |
| Wash Solution I | 5 mL × 1 tube |
| Wash Solution II | 5 mL × 2 tubes |
| Elution Buffer | 1 mL × 2 tubes |
| Spin Column | 20 tubes |
| Collection Tube | 20 tubes |

【Other materials required】

Reagent :

- (1) 2-Propanol (Code No. 168-21675)
- (2) Ethanol (99.5) (Code No. 054-07225)
- (3) 1-Butanol (Code No. 022-16035)

Equipment :

- (1) 1.5 mL Micro centrifugation tube
- (2) Micropipette
- (3) Pipette tip
- (4) Cooling micro high-speed centrifuge
- (5) Vortex mixer

【Precautions】

1. Tools

Microcentrifugation tubes, pipette tips, and other experimental tools should be autoclaved, or use commercially available

RNase-free products. Plastic gloves and masks should be worn during the experiments to avoid contamination of RNase.

2. Reagents

Since the procedure mainly extracts RNA, handles the reagents with great care, and keeps the working reagents as sterile as possible.

3. Handling of samples and disposable tools used in the experiment

Handle the purified EV solution as infectious samples. Waste fluid generated during the RNA extraction protocol, pipette tips, microcentrifuge tubes, and other disposable tools used in the experiments should also be disposed of appropriately as infectious waste in accordance with the guidelines of your institution.

【Protocol】

Preparation of purified EV samples and precautions

Prepare 200 μL of purified EV solution in advance using the MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 (Code No. 290-84103) or by some other means^{*1}. This solution is used as the sample for extraction.

- *1 If the volume is less than 200 μL, make up the sample to 200 μL with the solvent used to prepare the purified EV solution.

Preparation of reagents

● Wash Solution I (+2-Pro)

Add 7.5 mL of 2-propanol to Wash Solution I and mix well.

● Wash Solution II (+Ethanol)

Add 15 mL of ethanol to Wash Solution II and mix well.

● Lysis Solution (+ reducing agent)

Immediately before use, add 8.0 μL of the reducing agent to 1.0 mL of the Lysis Solution^{*2} and mix with a vortex mixer^{*3}.

● Spin column^{*4}

Place the spin column into a collection tube in advance.

- *2 The components of the Lysis Solution may precipitate. If this occurs, warm the solution in a water bath of ~ 37°C, and make sure that the precipitate is completely dissolved before use.

- *3 The prepared solution can be stored refrigerated (2-10°C) for about one week. Since the required amount of Lysis Solution changes depending on the number of samples for extraction, calculate the required amount in advance, transfer the solution to microcentrifugation tubes or other containers, and then add the reducing agent.

- *4 Spin Column may have deposits of filling material and scratches on then, but there is no problem with its performance of it.

Protocol of microRNA extraction

- (1) Transfer 10 μL of Protease Solution to a sterile 1.5 mL mi-

crocentrifugation tube.

- (2) Add 200 μL of the prepared **sample for extraction** to the microcentrifugation tube prepared in step (1).
- (3) Add 200 μL of the prepared **Lysis Solution (+ reducing agent)**^{*5}, mix with a vortex mixer, and spin down using a tabletop centrifuge.
- (4) Incubate the solution in a block incubator at 37°C for 30 minutes and spin down using a tabletop centrifuge.
- (5) Add 200 μL of 1-butanol^{*6} and mix with a vortex mixer.
- (6) Add 10 μL of Enhancer and mix with a vortex mixer.
- (7) Add 300 μL of 2-propanol and mix with a vortex mixer.
- (8) Spin down the solution using a tabletop centrifuge for about 2-3 seconds^{*7}.
- (9) Mix the solution by pipetting^{*8} and load half of the solution on the spin column.
- (10) Centrifuge the spin column at 8,000 $\times g$ for 1 minute at room temperature, remove the spin column, and discard the solution (filtrate) in the collection tube.
- (11) Mix the remaining solution by pipetting^{*8} and load the solution on the spin column.
- (12) Repeat step (10).
- (13) Load 500 μL of the **Wash Solution I (+2-Pro)** on the spin column.
- (14) Repeat step (10).
- (15) Load 700 μL of the **Wash Solution II (+Ethanol)** on the spin column.
- (16) Repeat step (10).
- (17) Repeat steps (15) and (16).
- (18) Set the spin column on a sterile 1.5 mL tube^{*9} and centrifuge the column at 8,000 $\times g$ for 3 minutes at room temperature to remove the washing solution altogether.
- (19) Set the spin column on a new sterile 1.5 mL tube.
- (20) Carefully load 20 μL of Elution Buffer^{*10} on the center of the membrane of the spin column and let it stand for 5 minutes at room temperature.
- (21) Centrifuge the column and tube at 8,000 $\times g$ for 1 minute at room temperature; the solution eluted into the 1.5 mL tube can be used as the RNA sample^{*11}.

*5 Do not add the **Lysis Solution (+ reducing agent)** directly to the proteolytic enzyme. The order of addition must be as follows : **Protease Solution** \rightarrow **sample for extraction** \rightarrow **Lysis Solution (+ reducing agent)**.

*6 If 1-butanol is not available, 2-propanol can be used instead. However, if 2-propanol is used, the recovered RNA fraction will be contaminated by more protein; therefore, 1-butanol should be used whenever possible

*7 Do not spin down for a prolonged period; removing the solution at the top of the microcentrifugation tube is sufficient.

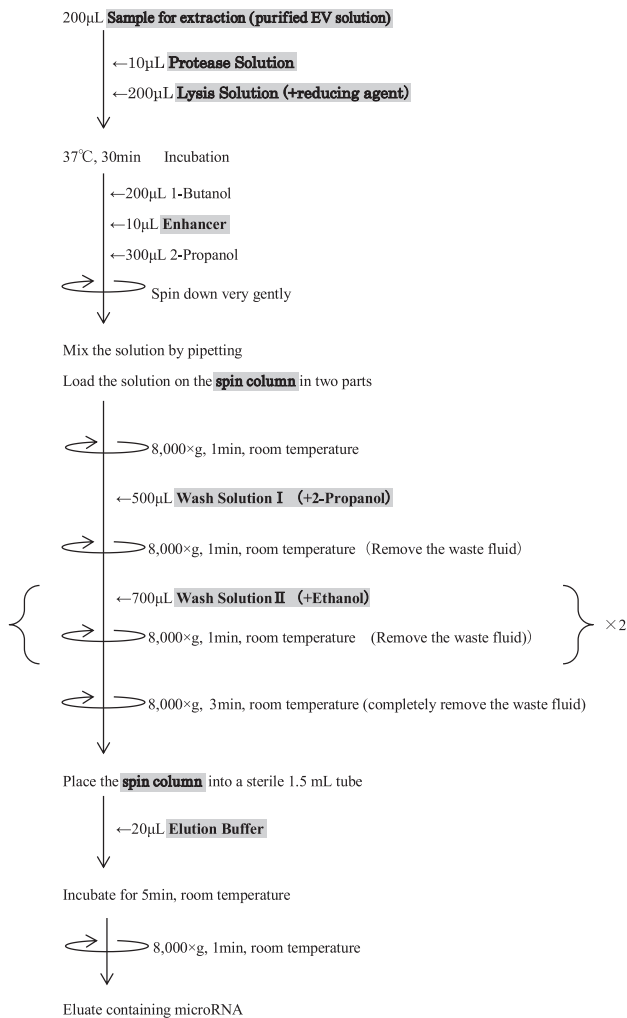
*8 As microRNA may precipitate, be sure to mix the solution by pipetting.

*9 The collection tube can also be used continuously, but a new sterile 1.5 mL microcentrifuge tube is recommended to avoid contaminating the RNA sample with alcohol.

*10 The recovery rate may increase slightly when more Elution Buffer is loaded, but the RNA concentration in the eluate will decrease. The amount of Elution Buffer to be loaded should be between 6 and 100 μL , depending on the application after extraction.

*11 Store the collected RNA sample at -80°C until use in subsequent analysis.

[Extraction flowchart]



[Storage]

Store at 2~10°C.

[Package]

| Code No. | Package size |
|-----------|----------------|
| 294-84601 | 20 extractions |

遺伝子研究用 精製 EV 用マイクロ RNA エキストラクター[®] キット

【はじめに】

本キットは、細胞培養上清や血清・血漿から精製したエクソソーム (EV) 溶液から microRNA を抽出するキットです。フェノールやクロロホルム等の劇物を使用せず、タンパク質分解酵素とカオトロピック剤、スピнкаラムを組み合わせて EV から microRNA を簡便かつ高効率に取得することができます。

【特長】

- ・精製 EV 溶液からの RNA 抽出に最適化
- ・高い RNA 回収率を実現
- ・フェノールおよびクロロホルム不要
- ・抽出 RNA はリアルタイム定量 PCR、マイクロアレイ、次世代シーケンズに使用可能

【キット内容 (20 回用)】

本キットは9つの構成部材からなります。

| | |
|------------|-------------------|
| 溶解液 | 9mL × 1 本 |
| 還元剤 | 80 μ L × 1 本 |
| タンパク質分解酵素液 | 200 μ L × 1 本 |
| 促進剤 | 200 μ L × 1 本 |
| 洗浄液 I | 5mL × 1 本 |
| 洗浄液 II | 5mL × 2 本 |
| 溶出液 | 1mL × 2 本 |
| スピнкаラム | 20 本 |
| コレクションチューブ | 20 本 |

【キット以外に準備するもの】

試薬：

- (1) 2-プロパノール (コード No. 168-21675)
- (2) エタノール (コード No. 054-07225)
- (3) 1-ブタノール (コード No. 022-16035)

器具：

- (1) 1.5mL マイクロチューブ
- (2) マイクロピペット
- (3) ピペットチップ
- (4) 冷却式微量高速遠心機
- (5) ボルテックスミキサー

【操作前の注意点】

1. 器具類

マイクロチューブ、ピペットチップなどはオートクレーブ処理または市販の RNase フリー製品を使用してください。また、実験中はプラスチック手袋およびマスクを着用し、RNase の混入には最新の注意を払ってください。

2. 試薬類

主として RNA を抽出する操作を行いますので、試薬の取扱い

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : + 81-6-6203-3741
Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://www.wako-chem.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : + 1-804-271-7677
Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : + 49-2131-311-0
Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

には十分注意し、使用する試薬類は可能な限り無菌状態を保つよう心掛けてください。

3. 試料および実験に使用した消耗品の取扱い

精製 EV 溶液は感染性試料として取り扱ってください。また、RNA 抽出操作中に発生した廃液、実験に用いたピペットチップやマイクロチューブ等は感染性廃棄物として、所属施設のガイドラインに従って適切に廃棄してください。

【操作】

精製 EVs サンプルの準備と注意点

MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 (コード No. 290-84103) などを用いてあらかじめ精製 EVs 溶液 200 μ L を用意する^{*1}。これを抽出用サンプルとする。

※ 1 容量が 200 μ L 未満の場合は精製 EVs 溶液の溶媒で 200 μ L になるように調製してください。

試薬の準備

● 洗浄液 I (+2-Pro)

洗浄液 I に 2-プロパノール 7.5mL を添加し、よく混合する。

● 洗浄液 II (+Etha)

洗浄液 II にエタノール 15mL を添加し、よく混合する。

● 溶解液 (+還元剤)

使用直前に溶解液^{*2} 1.0mL に対し、還元剤 8.0 μ L を添加し、ボルテックスミキサーで混合^{*3}する。

● スピнкаラム^{*4}

スピнкаラムはあらかじめコレクションチューブにセットしておく。

※ 2 溶解液の成分が析出する場合があります。析出した場合は、37℃ 程度の湯浴などで温めて完全に溶解したことを確認してから使用してください。

※ 3 調整後の溶液は、冷蔵 (2-10℃) で約 1 週間保存可能です。また溶解液の必要量は抽出する検体数によって変わるため、あらかじめ溶解液の必要量を算出し、マイクロチューブ等に移した後に、還元剤を添加してください。

※ 4 スピнкаラムに充てん剤の付着や傷等がある場合がございますが、性能には問題ございません。

microRNA 抽出操作

(1) 滅菌済み 1.5mL マイクロチューブにタンパク質分解酵素 10 μ L を添加する。

(2) (1) のマイクロチューブにあらかじめ準備しておいた抽出用サンプル 200 μ L を添加する。

(3) あらかじめ調製しておいた溶解液 (+還元剤) 200 μ L を添加し^{*5}、ボルテックスミキサーで混合後、卓上遠心機でスピンドウンする。

(4) 37℃ のブロックインキュベーターで 30 分間インキュベートし、卓上遠心機でスピンドウンする。

(5) 1-ブタノール^{*6} 200 μ L を添加し、ボルテックスミキサーで混合する。

(6) 促進剤 10 μ L を添加し、ボルテックスミキサーで混合する。

(7) 2-プロパノール 300 μ L を添加し、ボルテックスミキサーで混合する。

(8) 卓上遠心機で約 2-3 秒間スピンドウンする^{*7}。

(9) ピペッティングで溶液を混合し^{*8}、溶液の半量をスピнкаラムに添加する。

(10) 室温 8,000 \times g で 1 分間遠心分離し、スピнкаラムを取り外しコレクションチューブ内の溶液 (ろ液) を捨てる。

(11) 残りの溶液をピペッティング^{*8}して、スピнкаラムに添加する。

(12) 工程 (10) を繰り返す。

(13) 洗浄液 I (+2-Pro) 500 μ L をスピнкаラムに添加する。

(14) 工程 (10) を繰り返す。

(15) 洗浄液 II (+Etha) 700 μ L を添加し、スピнкаラムに添加する。

(16) 工程 (10) を繰り返す。

(17) もう 1 度、工程 (15)、(16) を行う。

(18) スピнкаラムを滅菌済 1.5mL チューブ^{*9} にセットし、室温、8,000 \times g で 3 分間遠心分離し、洗浄液を完全に除去する。

(19) スピнкаラムを新しい滅菌済 1.5mL チューブにセットする。

(20) 溶出液 20 μ L^{*10} をスピнкаラムのメンブレン中央に注意深く添加し、室温で 5 分間静置する。

(21) 室温、8,000 \times g で 1 分間遠心分離し、1.5mL チューブに溶出された溶液を RNA サンプル^{*11} とする。

※ 5 タンパク質分解酵素に溶解液 (+還元剤) を添加する場合は、直接添加せず、タンパク質分解酵素→抽出用サンプル→溶解液 (+還元剤) の順で添加してください。

※ 6 1-ブタノールが準備できない場合、2-プロパノールの使用が可能です。ただし、2-プロパノールを使用した場合、回収される RNA 画分に混入する夾雑タンパク質が増加するため、可能な限り 1-ブタノールをご使用ください。

※ 7 長時間のスピンドウンは避け、マイクロチューブ上部についた溶液を落とす程度で遠心してください。

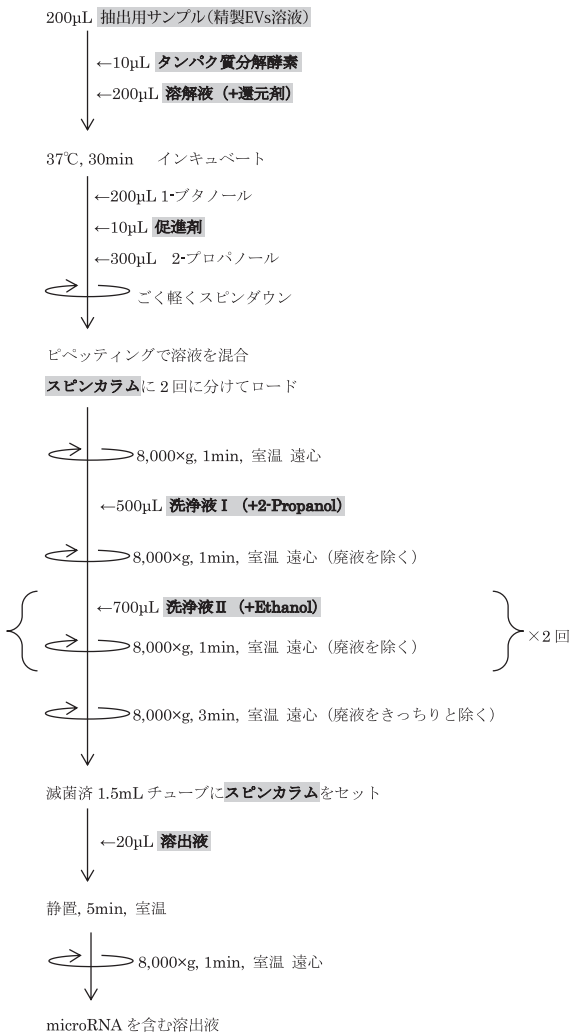
※ 8 microRNA が沈殿している可能性があるため、必ずピペッティングによる混合操作を行ってください。

※ 9 コレクションチューブをそのまま使用することも可能ですが、RNA 試料へのアルコール混入を避けるため、新しい滅菌済 1.5mL マイクロチューブのご使用を推奨いたします。

※ 10 溶出液の添加量を多くすると回収率が多少上昇することがありますが、回収される RNA 濃度は低下いたしますので、抽出後の用途に応じて、6 ~ 100 μ L の間で添加量をご検討ください。

※ 11 回収した RNA サンプルは、その後の解析に使用するまで 80℃ で保管してください。

【抽出フローチャート】



【保存】

本キットは冷蔵 (2-10 $^{\circ}$ C) で保存してください。

【包装】

| コード No. | 容量 |
|-----------|-------|
| 294-84601 | 20 回用 |

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社
大阪市中央区道修町三丁目1番2号
Tel : 06-6203-3741