

FUJIFILM

< For Research Use Only >

Wako

Code No. 295-71701

For Genetic Research
microRNA Extractor[®] SP Kit

[Introduction]

microRNA Extractor[®] SP Kit is designed for the extraction of microRNA from serum and plasma of human and rodents (rat etc.). The extraction method of this kit is based on the procedure using chaotropic reagent, which allows for a safe extraction without hazardous phenol/chloroform, and spin column. This kit is useful microRNA extraction kit for circulating microRNA in serum and plasma.

[Features]

- microRNA extraction from serum and plasma of human and rodents
- Safe procedure without hazardous phenol/chloroform
- Easy protocol by using protease, chaotropic reagent and spin column
- Preparation of RNA fraction for real-time qPCR (TaqMan[®] MicroRNA Assay)

[Kit contents] (50 reactions)

This kit includes a total of 9 components.

(1) Lysis Solution	19 mL	× 1 bottle
(2) Reducing Agent	50 μ L	× 1 vial
(3) Protease Solution	500 μ L	× 1 vial
(4) Enhancer	500 μ L	× 1 vial
(5) Wash Solution I	12 mL	× 1 bottle
(6) Wash Solution II	21 mL	× 1 bottle
(7) Elution Solution	5 mL	× 1 bottle
(8) Spin Column		50 columns
(9) Collection Tube		50 tubes

[Additional materials required]

Reagents :

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

Equipment :

- 1) 1.5mL Micro centrifugation tube
- 2) Micro pipette
- 3) Pipette tip
- 4) High speed micro-centrifuge (Max > 14,500 rpm, 20,000 × G)
- 5) Vortex mixer

[Important information before experiment]

1. Equipment

PCR tube, micro centrifugation tube, pipette tip must be sterilized by autoclave. There is no problem with using commercially available RNase free products. We recommend that you must use gloves and a mask to avoid contamination of RNase.

2. Reagents

Please use RNase free reagents for RNA extraction procedure.

3. Handling of infectious wastes

Please correctly handle human serum, plasma, extraction equipment after the procedure as an infectious waste.

[Procedure]

Preparation of serum and plasma sample

- 1) Add enough volume of serum or plasma^{※1} into 1.5 mL microtube.
- 2) Centrifuge at 20,000 × G for 5 min at 4 °C.
- 3) Collect 200 μ L of supernatant after centrifugation. (**[SAMPLE]**)
The 200 μ L is appropriate volume for an extraction.

※1 : We recommend you use EDTA or citric acid as an anticoagulant. We can NOT recommend to use heparin, because heparin will inhibit PCR after RNA extraction. To avoid RNA degradation by RNases, serum and plasma sample has been handled on ice until addition of Lysis solution.

Preparation of reagents

- **[Wash Solution I (+2-Pro)]**
Add 18 mL of 2-Propanol into the bottle of Wash Solution I and mix gently.
- **[Wash Solution II (+Eth)]**
Add 63 mL of Ethanol into the bottle of Wash Solution II and mix gently.
- **[Lysis Solution (+Reducing Agent)]**
Add 2.6 μ L of Reducing Agent into 1 mL of Lysis Solution^{※2} and mix by vortex mixer^{※3}. The required volume of Lysis Solution will be changed by the number of samples.

Therefore, please calculate the required volume of Lysis Solution and transfer this into a centrifugation tubes before mix with Reducing Agent.

※2 : The precipitants will be appeared in Lysis Solution during the storage.
In this case, the precipitants have to be completely dissolved on 37 °C by water bath etc.

※3 : **[Lysis Solution (+Reducing Agent)]** is stable in 2~10 °C for 1 week.

microRNA extraction procedures

- 1) Add 10 μ L of Protease Solution into a new 1.5 mL micro centrifugation tube.
- 2) Add 200 μ L of **[SAMPLE]** into a tube of step 1).
- 3) Add 200 μ L of **[Lysis Solution (+Reducing Agent)]**^{※4} and mix by vortex mixer and spin down by mini centrifuge.
- 4) Incubate for 30 minutes on heat block at 37 °C and spin down by mini centrifuge.
- 5) Add 200 μ L of 1-Butanol^{※5} and mix by vortex mixer.
- 6) Centrifuge at 12,000 × G for 10 minutes at 4 °C^{※6}.
- 7) Add 10 μ L of Enhancer into a new 1.5 mL micro centrifugation tube and transfer the all of supernatant of step 6) into this tube by decantation.
- 8) Add 300 μ L of 2-Propanol and mix by vortex mixer.
- 9) Spin down for 2-3 seconds by mini centrifuge^{※7}.
- 10) Mix by pipetting^{※8} and transfer a half volume of the sample solution into Spin Column.
- 11) Centrifuge at 8,000 × G for 1 minute at room temperature. Remove the filtrated solution from Collection Tube by decantation.
- 12) Mix by pipetting^{※8} and add the remaining sample solution into Spin Column.

- 13) Repeat Step 11).
- 14) Add 500 μL of **Wash Solution I (+2-Pro)** into Spin Column.
- 15) Repeat Step 11).
- 16) Add 700 μL of **Wash Solution II (+Ethanol)** into Spin Column.
- 17) Repeat Step 11).
- 18) Repeat Step 16) and Step 11).
- 19) Set the Spin Column into Collection Tube^{®9} and centrifuge at $8,000 \times G$ for 3 minutes at room temperature. Remove the Wash Solution completely.
- 20) Set the Spin Column into a new 1.5 mL micro centrifugation tube.
- 21) Add 50 μL ^{®10} of Elution Solution into the center of Spin Column membrane and incubate for 5 minutes at room temperature.
- 22) Centrifuge at $8,000 \times G$ for 1 minute at room temperature. Remove the Spin Column from 1.5 mL micro centrifugation tube. This sample is final RNA fraction^{®11}.

※4 : Do NOT add the **Lysis Solution (+Reducing Agent)** into Protease Solution directly. We recommend you add these reagents by the following.

Protease Solution \rightarrow **SAMPLE** \rightarrow **Lysis Solution (+Reducing Agent)**

※5 : If you could not prepare 1-Butanol, you can use 2-Propanol as an alternative reagent. In the case of using 2-Propanol, the quantity of contaminating protein will be increased in final RNA fraction. We recommend you use 1-Butanol as much as possible.

※6 : The centrifuge has to be set up from 4°C to room temperature for the following procedure.

※7 : Avoid the spin down for a long time.

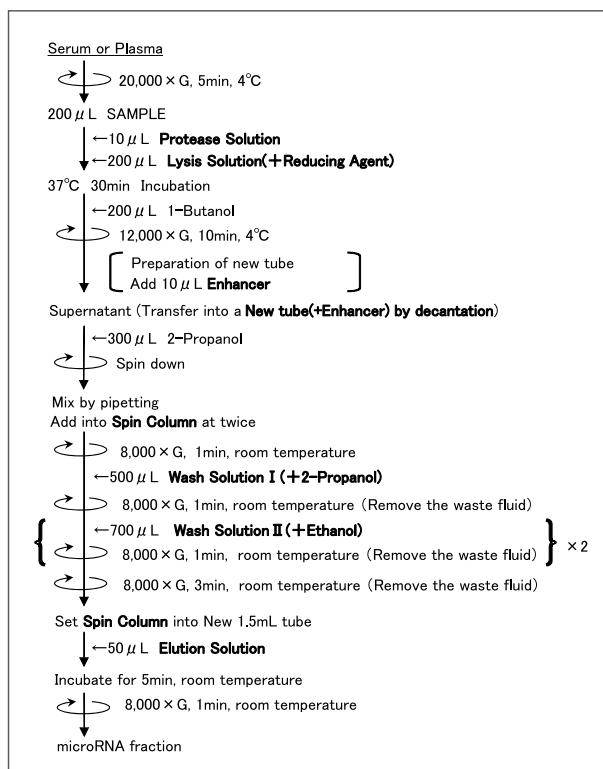
※8 : This pipetting procedure is necessary.

※9 : To avoid the contamination of alcohol in final RNA fraction, we recommend you use a new 1.5 mL micro centrifugation tube.

※10 : In the case of using 100 μL of Elution Solution, recovery efficiency of microRNA will be increased 10~30% more than standard procedure. However, the concentration of microRNA will be decreased. Please optimize the adding volume of Elution Solution to your following experiment.

※11 : Store the final RNA fraction at -80°C until the analysis by real-time qPCR.

【Extraction flow chart】



【Storage】

Store at $2\sim 10^\circ\text{C}$.

【Products】

Code No.	Description	Package Size
295-71701	microRNA Extractor [®] SP kit	50 extractions
168-21675	2-Propanol	500 mL
054-07225	Ethanol(99.5)	500 mL
022-16035	1-Butanol	500 mL

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

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

(90 × 210mm Size)

Code No. 295-71701

遺伝子研究用 マイクロRNA エキストラクター[®] SP キット

【はじめに】

本キットは、主にヒトおよび実験動物(ラットなど)の血清・血漿から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、スピニングカラムを組み合わせて血清・血漿中のmicroRNAを簡便かつ高効率に取得することができます。

【特長】

- ヒトおよび実験動物(ラットなど)の血清・血漿からmicroRNAを抽出できる。
- フェノールやクロロホルム等の劇物を使用しない。
- タンパク質分解酵素、カオトロピック剤、スピニングカラムを組み合わせた簡便法。
- 抽出したmicroRNAはリアルタイム定量PCR (TaqMan[®] MicroRNA Assay)に使用できる。

【キット内容】(50回用)

本キットは9つの構成部材からなります。

(1) Lysis Solution	19 mL	×1本
(2) Reducing Agent	50 μ L	×1本
(3) Protease Solution	500 μ L	×1本
(4) Enhancer	500 μ L	×1本
(5) Wash Solution I	12 mL	×1本
(6) Wash Solution II	21 mL	×1本
(7) Elution Solution	5 mL	×1本
(8) Spin Column		50本
(9) Collection Tube		50本

【キット以外に準備する物】

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) 1.5 mL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の混入には細心の注意を払ってください。

- 5/8 -

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

ヒト血清、ヒト血漿は感染性試料として取扱ってください。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】

血液サンプルの準備と注意点

- 1) 十分量の血清・血漿^{※1}を1.5 mLのマイクロチューブに入れる。
- 2) 4℃、20,000 × Gで5分間遠心分離する。
- 3) 遠心上清200 μ L(抽出操作1回分)を「抽出用サンプル」とする。

※1: 血漿の抗凝固剤は、EDTAまたはクエン酸を使用してください。ヘパリンを使用すると、RNA抽出後のPCRによる検出を阻害することがあります。また、血清・血漿はRNaseが混入しています。Lysis Solutionを添加するまでは必ず氷上で取扱ってください。

試薬の準備

● Wash Solution I (+ 2-Pro)

Wash Solution Iに2-プロパノール18 mLを添加し、よく混合する。

● Wash Solution II (+ Etha)

Wash Solution IIにエタノール63 mLを添加し、よく混合する。

● Lysis Solution (+ Reducing Agent)

使用直前にLysis Solution^{※2} 1 mLに対し、Reducing Agent 2.6 μ Lを添加し、ボルテックスミキサーで混合^{※3}する。Lysis Solutionの必要量は、抽出する検体数によって変わります。よって、あらかじめLysis Solutionの必要量を算出し、マイクロチューブ等に移した後にReducing Agentを添加してください。

※2: Lysis Solution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: 調製後の溶液は、冷蔵(2~10℃)で約1週間保存可能です。

microRNA抽出操作

- 1) 滅菌済み1.5 mLマイクロチューブに、Protease Solution 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「Lysis Solution (+ Reducing Agent)」200 μ Lを添加し^{※4}、ボルテックスミキサーで混合し、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^{※5} 200 μ Lを添加し、ボルテックスミキサーで混合する。
- 6) 4℃、12,000 × Gで10分間遠心分離する^{※6}。
- 7) 新しい滅菌済み1.5 mLマイクロチューブにEnhancer 10 μ Lをあらかじめ添加し、工程6)の上清全量をデカントでチューブに移す。
- 8) 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。
- 9) 卓上遠心機で約2-3秒間スピンドウンする^{※7}。

- 6/8 -

- 10) ビベッティングで溶液を混合し※8、溶液の半量をSpin Columnに添加する。
- 11) 室温、8,000×Gで1分間遠心分離し、Spin Columnを取り外しCollection Tube内の溶液(ろ液)を捨てる。
- 12) 残りの溶液をビベッティング※8してSpin Columnに添加する。
- 13) Step 11)。
- 14) **Wash Solution I (+2-Pro)** 500 μLをSpin Columnに添加する。
- 15) Step 11)。
- 16) **Wash Solution II (+Ethanol)** 700 μLをSpin Columnに添加する。
- 17) Step 11)。
- 18) Step 16)、Step 11)。
- 19) Spin Column をCollection Tube※9にセットし、室温、8,000×Gで3分間遠心分離し、Wash Solutionを完全に除去する。
- 20) Spin Column を新しい滅菌済み1.5 mLマイクロチューブにセットする。
- 21) Elution Solution 50 μL※10をSpin Columnのメンブレン中央に添加し、室温で5分間静置する。
- 22) 室温、8,000×Gで1分間遠心分離し、Spin Columnを取り外してRNAサンプル※11とする。

※4 : Protease Solutionに **Lysis Solution(+Reducing Agent)** を直接添加しないでください。Protease Solution → **抽出用サンプル** → **Lysis Solution(+Reducing Agent)** の順で添加してください。

※5 : 1-ブタノールが準備できない場合、2-プロパノールが使用可能で、回収されるRNA画分は定量PCRに適用できることは確認しています。しかし、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量が増加するため、可能な限り1-ブタノールをご使用下さい。

※6 : Step 11) 以降は室温で遠心分離を行うため、遠心機を室温に戻して下さい。

※7 : 長時間のスピンダウンは避け、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下さい。

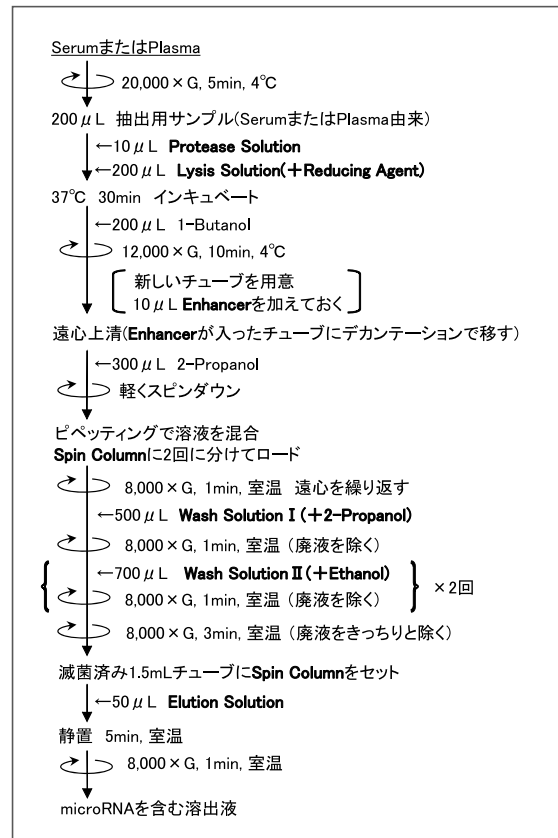
※8 : microRNAが沈殿している可能性があるため、必ずビベッティングによる混合操作を行って下さい。

※9 : Collection tubeはそのまま使用できますが、RNA試料へのアルコールの混入を避けるため、新しい滅菌済み1.5 mLマイクロチューブの使用を推奨致します。

※10 : Elution Solutionの添加量を100 μLにするとmicroRNAの回収率は10~30%ほど上昇します。ただし、回収されるmicroRNA濃度は低下しますので、抽出後の用途に応じてElution Solutionの添加量をご検討ください。

※11 : 回収したRNAサンプルは、定量PCR等の解析に使用するまでは-80℃で保管して下さい。

【抽出フローチャート】



【保存】

本キットは冷蔵(2℃~10℃)で保存して下さい。

【製品情報】

コード No.	品 名	容 量
295-71701	microRNA Extractor [®] SP kit	50回用
168-21675	2-Propanol	500 mL
054-07225	Ethanol(99.5)	500 mL
022-16035	1-Butanol	500 mL

製造発売元

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

1806KA1