

## For Genetic Research RNA Quantification Kit for Purified EV

### [Introduction]

This kit enables highly sensitive quantification of trace amounts of total RNA contained in a sample by using RNA-binding fluorescent dyes. It can be used to quantify total RNA extracted from purified extracellular vesicles (EVs) derived from cell culture supernatants, serum, or plasma.

This kit can be used to quantify trace amounts of RNA derived from EVs extracted using the microRNA Extractor™ Kit for Purified EV (Code No. 294-84601).

This product is intended for laboratory use only.

### [Features]

- Quantification of trace amounts of RNA samples  
Sample volume required for measurement : 1 - 20  $\mu$ L
- High sensitivity (Quantification Range : 0.1 - 10 ng/ $\mu$ L)  
Ideal for quantifying trace amounts of RNA, such as RNA extracted from purified EV solutions
- Short measurement time  
Fluorescence-based measurement method with a reaction time of only 5 minutes

### [Kit contents (for 1,000 assays)]

This kit consists of 3 components.

| Item                           | Amount                      |
|--------------------------------|-----------------------------|
| Control RNA                    | 100 $\mu$ L $\times$ 1 vial |
| Fluorescent Reagent            | 100 $\mu$ L $\times$ 1 vial |
| Dilution Buffer (20 $\times$ ) | 2.5 mL $\times$ 1 vial      |

### [Other materials required]

- Nuclease-free water (Code No. 314-09291)
- 96-well plates
- Micropipettes
- Pipette tips
- Microplate shaker (if available)
- Microplate reader for 96-well plates (for fluorescence measurement)

### [Precautions]

#### 1. Tools

Microcentrifugation tubes, PCR 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 primarily involves RNA quantification, handle all the reagents with great care, and strive to maintain the sterility of the working reagents during use.

### [Protocol]

Preparation of RNA samples derived from purified EVs and precautions

Prepare a purified EV solution in advance using the MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 (Code No. 290-84103) or by some other means. This solution is used as the sample for extraction. Next, prepare a quantitative RNA sample using a MicroRNA Extractor™ Kit for purified EV (Code No. 294-84601) or by some other means.

#### Preparation of reagents

##### 1. 1 $\times$ Dilution Buffer

Add nuclease-free water to Dilution Buffer (20 $\times$ ) at a ratio of 1 : 20 and mix well.

##### 2. Fluorescent Buffer

Add 1 $\times$  Dilution Buffer to the Fluorescent Reagent at a ratio of 1 : 2,000 and mix well\*1.

##### 3. Control RNA Solution

Dilute the Control RNA (100 ng/ $\mu$ L) stepwise as shown below to prepare Control RNA Solutions of each concentration\*2.

| Concentration of the Control RNA Solution (ng/ $\mu$ L) | Volume of the Control RNA Solutions       | Volume of 1 $\times$ Dilution Buffer |
|---|---|--------------------------------------|
| 100   | Stock Control RNA : 100 $\mu$ L           | —                                    |
| 1   | 100 ng/ $\mu$ L solution : 2 $\mu$ L      | 198 $\mu$ L                          |
| 0.5   | 1 ng/ $\mu$ L solution : 50 $\mu$ L       | 50 $\mu$ L                           |
| 0.25  | 0.5 ng/ $\mu$ L solution : 50 $\mu$ L     | 50 $\mu$ L                           |
| 0.125   | 0.25 ng/ $\mu$ L solution : 50 $\mu$ L    | 50 $\mu$ L                           |
| 0.0625  | 0.125 ng/ $\mu$ L solution : 50 $\mu$ L   | 50 $\mu$ L                           |
| 0.03125   | 0.0625 ng/ $\mu$ L solution : 50 $\mu$ L  | 50 $\mu$ L                           |
| 0.015625  | 0.03125 ng/ $\mu$ L solution : 50 $\mu$ L | 50 $\mu$ L                           |

\*1 Protect from light by wrapping in aluminum foil, etc.

\*2 The table shows an example of stepwise dilution. Adjust the dilution concentration of the Control RNA Solutions for each sample.

#### Assay Procedure

- Dispense 200  $\mu$ L of Fluorescent Buffer into each well.
- Dispense 10  $\mu$ L of Control RNA Solution into the wells designated for standards.  
Add 10  $\mu$ L of 1 $\times$  Dilution Buffer to the blank.
- Dispense 1 - 20  $\mu$ L of pretreated-RNA samples into the wells designated for samples.
- Agitate the mixture in each well using a microplate shaker or by pipetting.
- Incubate at room temperature for 5 minutes in the dark.
- Determine the fluorescent intensity using the 96-well microplate reader (Excitation wavelength : 492 nm, Emission wavelength : 540 nm).

#### Calculation Method

- (1) Create a standard curve by plotting the concentration of Control RNA amount (ng) on the X-axis against the fluorescent intensity value on the Y-axis.
- (2) Read the concentration (ng) corresponding to the fluorescent intensity of the diluted sample.
- (3) Multiply the read concentration by the sample dilution factor to obtain the measured concentration.

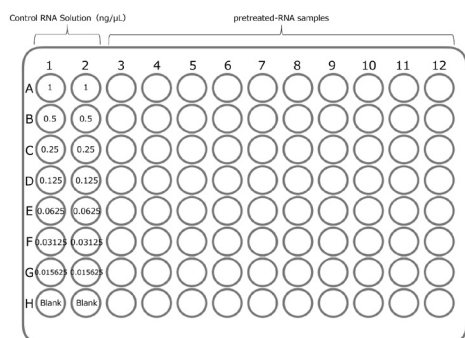


Figure 1. Example of dispensing Control RNA Solution to a multiwell plate

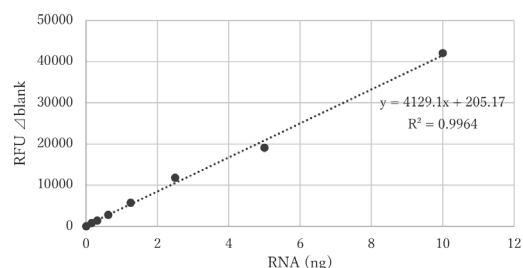


Figure 2. Standard curve (an example)

#### 【Storage】

Store at -20℃

#### 【Package】

| Code No.  | Package size     |
|-----------|------------------|
| 297-97901 | For 1,000 assays |

### 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://fwk.fujifilm.co.jp>

Group Companies



Distributors



Code No. 297-97901

## 遺伝子研究用 精製 EV 用 RNA 定量キット

#### 【はじめに】

本キットは、RNA 結合性の蛍光色素を利用して、溶液に含まれる微量の total RNA を高感度に定量することができるキットです。細胞培養上清や血清・血漿より精製したエクソソーム (EV) 溶液から抽出した total RNA を定量することができます。また、本キットは、精製 EV 用 マイクロ RNA エキストラクター™ キット (コード No. 294-84601) で抽出した EV 由来の微量 RNA の定量に使用することができます。この製品は、研究用途でご使用下さい。

#### 【特長】

- ・少量の RNA 検体を定量可能  
測定に必要な検体量は 1 ~ 20  $\mu\text{L}$
- ・高感度 (定量範囲: 0.1 ~ 10ng/ $\mu\text{L}$ )  
精製 EV 溶液から抽出した RNA など、微量 RNA の定量に最適
- ・短時間測定  
蛍光ベースの測定法で、反応時間はわずか 5 分

#### 【キット内容 (1,000 回用)】

本キットは 3 つの構成部材からなります。

| 構成品        | 容量                      |
|------------|-------------------------|
| コントロール RNA | 100 $\mu\text{L}$ × 1 本 |
| 蛍光試薬       | 100 $\mu\text{L}$ × 1 本 |
| 希釈液 (20×)  | 2.5mL × 1 本             |

#### 【キット以外に準備するもの】

- ・ヌクレアーゼフリー水 (コード No. 314-09291)
- ・96 ウェルプレート
- ・マイクロピペット
- ・ピペットチップ
- ・マイクロプレート振とう器 (あれば好ましい)
- ・96 ウェルプレートリーダー (蛍光測定用)

#### 【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下さい。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下さい。

##### 2. 試薬類

主として RNA を定量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下さい。

#### 【操作】

##### 精製 EVs 由来の RNA 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 溶液を用意する。

次に、精製EV用 マイクロRNA エキストラクター<sup>TM</sup>キット(コード No. 294-84601)などを用いて定量用 RNA サンプルを用意する。

試薬の準備

1. 1×希釈液

希釈液(20×)にヌクレアーゼフリー水を1:20となるよう添加し、よく混合する。

2. 蛍光溶液

蛍光試薬に1×希釈液を1:2,000となるよう添加し、よく混合する<sup>※1</sup>。

3. コントロール RNA 溶液

コントロール RNA (100ng/μL)を下記に示すように段階希釈し、各濃度のコントロール RNA 溶液を調製する<sup>※2</sup>。

| 濃度 (ng/μL) | コントロール RNA 溶液の容量       | 1×希釈液  |
|------------|------------------------|--------|
| 100        | コントロール RNA 原液: 100 μL  | —      |
| 1          | 100ng/μL 溶液: 2 μL      | 198 μL |
| 0.5        | 1ng/μL 溶液: 50 μL       | 50 μL  |
| 0.25       | 0.5ng/μL 溶液: 50 μL     | 50 μL  |
| 0.125      | 0.25ng/μL 溶液: 50 μL    | 50 μL  |
| 0.0625     | 0.125ng/μL 溶液: 50 μL   | 50 μL  |
| 0.03125    | 0.0625ng/μL 溶液: 50 μL  | 50 μL  |
| 0.015625   | 0.03125ng/μL 溶液: 50 μL | 50 μL  |

※1 アルミホイルを巻くなどして遮光して下さい。

※2 上記の表は希釈の一例となります。サンプルに合わせてコントロール RNA 溶液の濃度を調整して下さい。

測定操作

- (1) 96 ウェルプレートの使用する各ウェルに蛍光溶液を 200 μL ずつ分注する。
- (2) 標準品測定ウェルに希釈調製した各濃度のコントロール RNA 溶液を 10 μL ずつ分注する。  
ブランクには 1×希釈液を 10 μL 分注する。
- (3) 検体測定ウェルに測定用 RNA 検体を 1 ~ 20 μL ずつ分注する。
- (4) マイクロプレート振とう器もしくはピペッティング操作で各ウェルの混合液を攪拌する。
- (5) 遮光し、室温で5分間インキュベートする。
- (6) プレートリーダーを使用して蛍光(励起波長 492nm, 蛍光波長 540nm)を測定する。

計算方法

- (1) X 軸をコントロール RNA 量 (ng)、Y 軸をブランクの蛍光強度を差し引いた蛍光強度の標準曲線を作成する。
- (2) 希釈検体の蛍光強度に対応する RNA 量 (ng) を読み取る。
- (3) 読み取った RNA 量 (ng) に検体希釈率をかけて測定値とする。

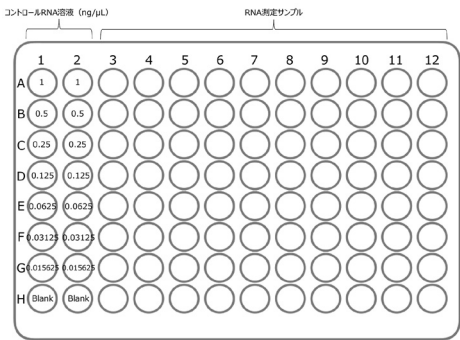


図1. 溶液のマルチウェルプレートへの添加例

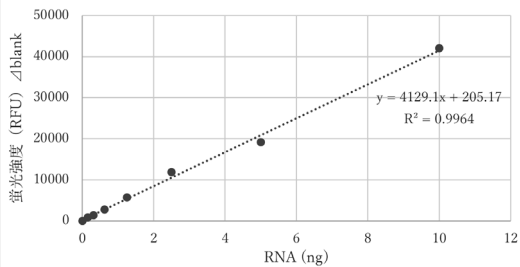


図2. 標準曲線の例

【保存】

本キットは冷凍(-20℃)で保存して下さい。

【包装】

| コード No.   | 容量       |
|-----------|----------|
| 297-97901 | 1,000 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