

FUJIFILM

Wako

Code No. 297-74201

For genetic research
MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2

Table of Contents	Page
Introduction	p.1
Outline of kit	p.1
Features	p.1
Kit contents	p.2
Storage	p.2
Outline of kit procedures	p.2
Additional materials required	p.2
Precautions for use	p.3
Procedure	p.3
Example of use	p.7
Patent	p.7
Related products	p.7

[Introduction]

MicroRNAs are endogenous non-coding RNAs of approximately 22-nucleotides, which play important roles in post-transcriptional regulation of gene expression by base-pairing to their target mRNAs. There are 1,000 or more kinds of microRNAs in humans and mice, and many researchers are identifying unknown microRNAs and investigating the function of microRNAs related to various disorders worldwide. Recently, microRNAs are reported to exist in not only intracellular but also extracellular body fluid such as blood and are noted as a candidate molecule for the clinical markers of disorders such as cancer. After being transcribed and processed, mature microRNAs are incorporated into Argonaute subfamily proteins of the core component of the RNA-induced silencing complex (RISC) for targeting mRNAs based on sequence complementation in 3'UTRs. In mouse, the Argonaute subfamily consists of four members (Ago1, Ago2, Ago3 and Ago4). Among them, Ago2 is the most abundant in a variety of cells and plays a major role in the microRNA pathway.

[Outline of kit]

MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2 can easily isolate Ago2-binding microRNAs and target mRNAs from mouse cell or tissue samples, by immunoprecipitation using an anti-mouse Ago2 monoclonal antibody. This kit also enables isolation of Ago2-binding microRNAs from biological fluids. (e.g., plasma, serum, and conditioned cell culture medium.) This kit also can isolate Ago2-binding microRNAs and target mRNAs from rat cell or tissue samples.

[Features]

- 1) Almost all reagents required for immunoprecipitation and purification of Ago2-binding microRNAs and target mRNAs are contained in MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2.
- 2) Because anti-mouse Ago2 antibody immobilized magnetic beads are adopted, handling of immunoprecipitation is improved from the preexisting kit (microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2, Code No. 292-67301).
- 3) Two protocols for the RNA purification step are selectable - a one-step method for obtaining high-yield microRNAs by a simple procedure or a spin-column method for obtaining high-purity microRNAs.
- 4) Optimized protocols are configured for isolating microRNAs from cell, tissue, and biological fluids sample.
- 5) Since isolated RNAs using this kit contain Ago2-binding microRNAs and target mRNAs, the RNAs can be used in a variety of downstream applications, including identification or expression profiling of microRNAs and target mRNAs.

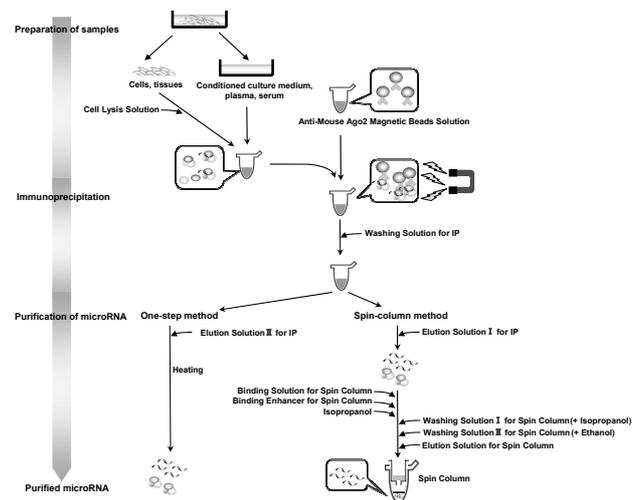
- 1/16 -

[Kit contents] (10 Reactions)

	Content
(1) Anti-Mouse Ago2 Magnetic Beads Solution	600 μ L × 1 tube
(2) Cell Lysis Solution	20 mL × 1 tube
(3) Washing Solution for IP	40 mL × 1 tube
(4) Elution Solution I for IP	500 μ L × 1 tube
(5) Elution Solution II for IP	500 μ L × 1 tube
(6) Binding Solution for Spin Column	2 mL × 1 tube
(7) Binding Enhancer for Spin Column	100 μ L × 1 tube
(8) Washing Solution I for Spin Column	3 mL × 1 tube
(9) Washing Solution II for Spin Column	4 mL × 1 tube
(10) Elution Solution for Spin Column	1 mL × 1 tube
(11) Spin Column/Collection Tube	10 tubes

[Storage]

Store at 2~10 °C.

[Outline of kit procedures]**[Additional materials required]**

1. Equipment
 - 1) High speed micro centrifuge (Max > 20,000 g)
 - 2) Vortex mixer
 - 3) Tabletop centrifuge
 - 4) Magnetic stand
 - 5) Tube rotator
 - 6) Tube mixer
 - 7) Block heater
 - 8) Micro centrifugation tube (1.5 mL)
 - 9) Micro pipette
 - 10) Pipette tip
2. Reagents
 - 1) Isopropanol (Code No. 166-21671)
 - 2) Ethanol (Code No. 052-07221)

- 2/16 -

[Precautions for use]

1. Equipment

PCR tubes, microcentrifugation tubes, and pipette tips must be sterilized by autoclave. There is no problem with using commercially available RNase free products. We recommend the use gloves and a mask to avoid contamination of RNase.

2. Reagents

Additional reagents excluding kit must be sterilized by autoclave or filtration.

3. Handling of biohazardous waste

Please deal with human serum, human plasma, and the human tissue samples as a susceptibility infectious sample. This includes waste liquid and equipment such as PCR tubes, microcentrifugation tubes, pipette tips and gloves after experiment. These biohazardous wastes are must be disposed of according to the guidelines of the institution which belongs.

[Procedure]

1. Preparation of sample

1-A In the case of adherent cells

- 1) Culture the cells ($5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ cells).^{※1}
- 2) Remove the medium from culture dishes and wash cultured cells twice with PBS (-).
- 3) Dissociate the cells using a cell scraper or trypsin-EDTA solution from dishes and transfer the cell suspension into a new 1.5 mL centrifugation tube. In the case of trypsin-EDTA solution, add the medium including serum to the cell suspension immediately for suppressing damage by trypsin.
- 4) Centrifuge the cell suspension at $200 \times g$ for 5 minutes at 4 °C.
- 5) Remove the supernatant.
- 6) After adding 1 mL of PBS (-) and suspending the cell pellet, transfer the cell suspension into a new 1.5 mL centrifugation tube.
- 7) Centrifuge the cell suspension at $200 \times g$ for 5 minutes at 4 °C.
- 8) Remove the supernatant.
- 9) After adding 1 mL of PBS (-) and resuspending the cell pellet, centrifuge the cell suspension at $200 \times g$ for 5 minutes at 4 °C.
- 10) Remove the supernatant.
- 11) Add 1 mL of Cell Lysis Solution to the cell pellet ($5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ cells) and suspend cells by pipetting.^{※2}
- 12) Incubate on ice for 10 minutes.
- 13) Centrifuge the cell lysate at $20,000 \times g$ for 20 minutes at 4 °C.^{※3}
- 14) Transfer the supernatant into a new 1.5 mL micro centrifugation tube. ... [Cell lysate]

1-B In the case of suspension cultured cells

- 1) Culture the cells ($5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ cells).^{※1}
- 2) Centrifuge the culture solution at $200 \times g$ for 5 minutes at 4 °C.
- 3) Remove the supernatant.
- 4) After adding 1 mL PBS (-) and suspending the cell pellet, transfer the cell suspension into a new 1.5 mL centrifugation tube.
- 5) Centrifuge the cell suspension at $200 \times g$ for 5 minutes at 4 °C.
- 6) Remove the supernatant.
- 7) After adding 1 mL of PBS (-) and re-suspending the cell pellet, centrifuge the cell suspension at $200 \times g$ for 5 minutes at 4 °C.
- 8) Remove the supernatant.
- 9) Add of 1 mL of Cell Lysis Solution to the cell pellet ($5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ cells) and suspend cells by pipetting.^{※2}
- 10) Incubate on ice for 10 minutes.
- 11) Centrifuge the cell lysate at $20,000 \times g$ for 20 minutes at 4 °C.^{※3}
- 12) Transfer the supernatant into a new 1.5 mL micro centrifugation tube. ... [Cell lysate]

1-C In the case of tissues

- 1) After adding 1 mL of Cell Lysis Solution to the piece of frozen tissue (25 ~ 50 mg), homogenize the tissue by Teflon-lined homogenizer etc.^{※4}
- 2) Transfer the homogenized suspension into a new 1.5 mL centrifugation tube, and incubate it on ice for 10 minutes.
- 3) Centrifuge the cell lysate at $20,000 \times g$ for 20 minutes at 4 °C.^{※3}
- 4) Transfer the supernatant into a new 1.5 mL micro centrifugation tube. ... [Cell lysate]

1-D In the case of plasma or serum

- 1) Transfer the human plasma or serum (about 300 μ L) into a new 1.5 mL centrifugation tube.
- 2) Centrifuge at $20,000 \times g$ for 10 minutes at 4 °C.
- 3) Transfer the 200 μ L of supernatant into a new 1.5 mL micro centrifugation tube. ... [Plasma or Serum sample]

1-E In the case of conditioned culture medium

- 1) Culture the cells.^{※5}
- 2) Transfer the 1 mL of conditioned culture medium into a new 1.5 mL centrifugation tube and centrifuge at $200 \times g$ for 5 minutes at 4 °C.
- 3) Transfer the supernatant into a new 1.5 mL centrifugation tube and centrifuge at $1,200 \times g$ for 10 minutes at 4 °C.
- 4) Transfer the supernatant into a new 1.5 mL centrifugation tube and centrifuge at $20,000 \times g$ for 10 minutes at 4 °C.
- 5) Transfer the supernatant into a new 1.5 mL centrifugation tube.^{※6} ... [Conditioned culture medium sample]

- ※1 Please examine appropriate culture conditions according to cell lines.
- ※2 Maximum cell numbers are about $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$.
- ※3 If a white floating layer appears in supernatant after centrifugation, please filtrate it using a centrifuge tube filter (pore size : 0.45 μ m).
- ※4 Please examine appropriate homogenizing condition according to the tissue. Maximum tissue weight is about 50 mg.
- ※5 Please examine appropriate culture conditions according to the cell lines. In order to avoid the contamination of microRNA in bovine serum, we recommend cultivation by using a serum-free medium.
- ※6 If there are few amounts of microRNAs in a culture supernatant, we recommend to condense a culture supernatant using a centrifugal type ultrafiltration filter (molecular weight 30000 cut) etc.

2. Prewashing of Anti-Human Ago2 Magnetic Beads

- 1) Transfer 60 μ L of Anti-Human Ago2 Magnetic Beads Solution into a new 1.5 mL centrifugation tube.^{※7}
- 2) Place this tube on the magnetic separation stand for 30 seconds to 1 minute.
- 3) After confirming the separation of beads and solution, discard the supernatant using a micro pipette.
- 4) Add 1 mL of Washing Solution for IP to magnetic beads and suspend it by vortexing.
- 5) After spin down of the solution, place this tube on the magnetic separation stand for 30 seconds to 1 minute.
- 6) After confirming the separation of beads and solution, discard the supernatant using a micro pipette. ... [Prewashed magnetic beads]

- ※7 Please use Anti-Human Ago2 Magnetic Beads Solution after completely suspending.

3. Immunoprecipitation

3-A In the case of cells or tissues

- 1) Add 1 mL of [Cell lysate] to [Prewashed magnetic beads] and suspend by vortexing.
- 2) Incubate with rotation for 2 hour or more at 4 °C.
- 3) After spin down of the solution, place this tube on the magnetic separation stand for 30 seconds to 1 minute.
- 4) After confirming the separation of beads and solution, discard the supernatant using a micro pipette.
- 5) Add 1 mL of Washing Solution for IP to beads and suspend by vortexing.
- 6) After spin down of the solution, place this tube on the magnetic separation stand for 30 seconds to 1 minute.
- 7) After confirming the separation of beads and solution, discard the supernatant using a micro pipette.
- 8) Repeat 5)-7) steps twice. ... [Immunoprecipitated magnetic beads]

3-B In the case of plasma or serum or conditioned culture medium

- 1) Add 200 μ L of [Plasma or Serum sample] or [Conditioned culture medium sample] to [Prewashed magnetic beads] and suspend by vortex mixer.
- 2) Incubate with rotation by tube mixer for 2 hours or more at 4 °C.※8
- 3) After spin down of the solution, place this tube on the magnetic separation stand for 30 seconds to 1 minute.
- 4) After confirming the separation of beads and solution, discard the supernatant using a micro pipette.
- 5) Add 1 mL of Washing Solution for IP to beads and suspend by vortexing.
- 6) After spin down of the solution, place this tube on the magnetic separation stand for 30 seconds to 1 minute.
- 7) After confirming the separation of beads and solution, discard the supernatant using a micro pipette.
- 8) Repeat 5)-7) steps twice. ... [Immunoprecipitated magnetic beads]

※8 Please adjust the appropriate rotating speed of a tube mixer as checking that beads are well suspended. (Indication : 1,200~1,400 rpm) Moreover, although the tube rotator can also be used, the yield of microRNA decreases compared with tube mixer.

4. Purification of microRNA from immunoprecipitated magnetic beads

4-A Spin-column method

This is a protocol for purifying the high purity RNA from immunoprecipitated magnetic beads.

Please prepare the following reagents in advance.

● [Washing Solution I for Spin Column (+ Isopropanol)]

Add 4.5 mL of isopropanol to Washing Solution I for Spin Column and mix it well.※9

● [Washing Solution II for Spin Column (+ Ethanol)]

Add 12 mL of ethanol to Washing Solution II for Spin Column and mix it well.※9

- 1) Add 50 μ L of Elution Solution I for IP to [Immunoprecipitated magnetic beads] and suspend by vortex mixer.※10
- 2) After spin down of the solution, place this tube on the magnetic separation stand for 30 seconds to 1 minute.
- 3) After confirming the separation of beads and solution, transfer the supernatant into a new 1.5 mL micro centrifugation tube.
- 4) Add 200 μ L of Binding Solution for Spin Column and 10 μ L of Binding Enhancer for Spin Column to the supernatant and mix them by vortexing.
- 5) Add 350 μ L of isopropanol to it and mix them by vortexing.
- 6) Add 50 μ L of Elution Solution for Spin Column into Spin Column/Collection Tube and centrifuge it at 8,000 \times g for 1 minute at room temperature.※11... [Pretreated column]

- 7) After spin down of the mixture of step 5) for 2~3 seconds※12 and stir this solution by pipetting,※13 apply it all on [Pretreated column].
- 8) Centrifuge at 8,000 \times g for 1 minute at room temperature.
- 9) Remove the Spin Column and discard the flow-through from the Collection Tube.
- 10) Place the Spin Column on to the Collection Tube.
- 11) Add 500 μ L of [Washing Solution I for Spin Column (+ isopropanol)] to the Spin Column.
- 12) Centrifuge at 8,000 \times g for 1 minute at room temperature.
- 13) Remove the Spin Column and discard the flow-through from the Collection Tube.
- 14) Place the Spin Column onto the Collection Tube.
- 15) Add 700 μ L of [Washing Solution II for Spin Column (+ ethanol)] to the Spin Column.
- 16) Centrifuge at 8,000 \times g for 1 minute at room temperature.
- 17) Remove the Spin Column and discard the flow-through from the Collection Tube.
- 18) Place the Spin Column onto the Collection Tube.
- 19) Repeat 15)-18) steps.
- 20) Centrifuge at 8,000 \times g for 3 minutes at room temperature.
- 21) Place the Spin Column onto a new 1.5 mL micro centrifugation tube.
- 22) Add carefully 50 μ L of Elution Solution for Spin Column to the center of membrane.
- 23) Incubate for 5 minutes at room temperature.
- 24) Centrifuge at 8,000 \times g for 1 minute at room temperature.
- 25) Please use the eluate in the 1.5mL micro centrifugation tube as the purified RNA sample.※14, ※15

※9 Store the prepared solution at 2~8 °C.

※10 Please use the Elution Solution I for IP after confirming that the components are entirely dissolved, because components are crystallized at a cool temperature.

※11 Please be sure to perform this operation because the pre-treatment of Spin Column elevate recovery amount of RNA.

※12 Please avoid a prolonged spin down.

※13 Because there is a possibility that RNA is precipitated, please be sure to mix by pipetting.

※14 Store the RNA sample at -80 °C.

※15 Because the amount of microRNAs obtained from cell or tissue samples is trace, it cannot be measured by spectrophotometer (A260/A280) or bioanalyzer. We recommend the detection of microRNAs by silver staining after Urea-PAGE or by quantitative PCR. Moreover, because the amount of microRNAs obtained from plasma or serum or conditioned cell culture medium is more trace, we recommend the detection of microRNAs by quantitative PCR. Because there is the difference of the amount of microRNA isolated from each kind of sample, we recommend the confirmation of the amount of microRNA using above mentioned methods after isolation.

4-B One-step method

This is a protocol for obtaining a high-yield RNA from immunoprecipitated magnetic beads more easily.

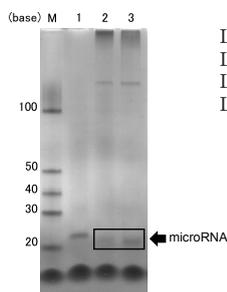
- 1) Add 50 μ L Elution Solution II for IP to [Immunoprecipitated magnetic beads] and suspend by vortexing.
- 2) Incubate for 90 seconds at 90 °C by using block heater immediately before beads are precipitated.※16
- 3) Place the incubated tube on ice for 1 minute or more.
- 4) After spin down of the solution, place this tube on the magnetic separation stand for 30 seconds to 1 minute.
- 5) After confirming the separation of beads and solution, transfer the supernatant into a new 1.5 mL micro centrifugation tube as the purified RNA sample.※14, ※15, ※17

- ※16 In the case of many specimen, we recommend the usage of Thermo Mixer.
 ※17 Although protein components are contained in the purified RNA sample, we have checked that it was satisfactory for quantitative PCR analysis.

【Example of use】

Purification of microRNAs from mouse P388D1 cells

Purification of microRNAs from mouse P388D1 cells (2×10^7 cells) was conducted by using MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2. The microRNA fraction purified by spin-column method or one-step method was detected by silver staining after Urea-PAGE.



Lane M: Molecular weight marker
 Lane 1 : Single strand RNA (23 base) 1ng
 Lane 2 : Purified RNA by Spin-column method
 Lane 3 : Purified RNA by One-step method

Figure : Detection of purified microRNAs from mouse P388D1 cells by silver staining

【Patent】

One-step method of the RNA purification is patent pending.

【Related Products】

Code No.	Product Name	Package
014-22023	Anti Mouse Ago2, Monoclonal Antibody	50 μ L
166-21671	2-Propanol	100 mL
052-07221	Ethanol (99.5%)	100 mL
316-90101	Distilled Water, Deionized, Sterile	100 mL
202-16931	0.05w/v% Trypsin-0.53 mmol/L EDTA ·4Na Solution with Phenol Red	100 mL
209-16941	0.25w/v% Trypsin-1 mmol/L EDTA ·4Na Solution with Phenol Red	100 mL
318-90041	5 \times TBE	1000 mL
194-15881	SuperSep™ RNA, 15%, 17well	5 gels
182-02711	R-Mark™ Small RNA Marker (20-50nt)	50 μ L

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>

Code No. 297-74201

遺伝子研究用

MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2

目次	ページ
はじめに	p.9
キット概要	p.9
特長	p.9
キット内容	p.10
保存	p.10
キット操作概要	p.10
キット以外に準備する物	p.10
操作前の注意点	p.11
操作	p.11
使用例	p.15
特許について	p.15
関連製品	p.15

【はじめに】

microRNAは約22塩基からなる一群の機能性低分子RNAで、遺伝子発現を転写後レベルで制御するガイド分子として機能し、様々な生体機能を担っていることが報告されています。ヒトやマウスでは1,000種類以上のmicroRNAの存在が示唆されており、機能未知な新規microRNAの同定、疾患に関連するmicroRNAの機能解明などが世界中で盛んに進められています。また最近では、細胞内だけでなく血液などの体液中にもmicroRNAが存在することが報告され、がんなど疾患の臨床マーカーの候補分子としても注目を集めています。microRNAは細胞中で複数のステップを通して成熟化してRNA-induced silencing complex (RISC)と呼ばれるタンパク質複合体に取り込まれ、その主要コンポーネントであるArgonaute (Ago) サブファミリータンパク質と結合した後に標的mRNAと結合してmRNA鎖を分解する、あるいは翻訳を抑制すると考えられています。Agoサブファミリーはマウスで4種類(Ago1、Ago2、Ago3、Ago4)存在しますが、その中で発現量が最も多いのがAgo2で、microRNAパスウェイにおいて中心的な役割を担っていると考えられています。

【キット概要】

本キットは、抗マウスAgo2抗体を利用した免疫沈降法によりマウスの細胞や組織サンプルからAgo2に結合したmicroRNAおよびその標的mRNAを簡便に取得することができるキットです。また、血漿・血清・細胞培養上清サンプルなど細胞外に存在するAgo2結合型microRNAも同様に取得することができます。さらに本キットはマウスと同様にラットサンプルにも使用することができます。

【特長】

- 1) マウスやラットAgo2に取り込まれたmicroRNAおよびその標的mRNAを免疫沈降し、RNA精製するために必要な試薬がキット化されています。
- 2) 抗マウスAgo2抗体固定化磁気ビーズを採用しており、従来品(microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2、Code No.292-67301)よりも免疫沈降操作がより簡便になりました。
- 3) 免疫沈降操作後のRNA精製ステップでは、より簡便に高収量のRNAが得られるワンステップ法と、より高純度なRNAが得られるスピニング法を選択することができます。
- 4) 細胞株・組織サンプルと血漿・血清・培養上清サンプルそれぞれに最適化されたプロトコールが設定されています。
- 5) 本キットにより得られたRNAにはマウスやラットAgo2に結合したmicroRNAやその標的mRNAが高濃縮されており、microRNAやその標的mRNAの同定、発現解析などに利用することができます。

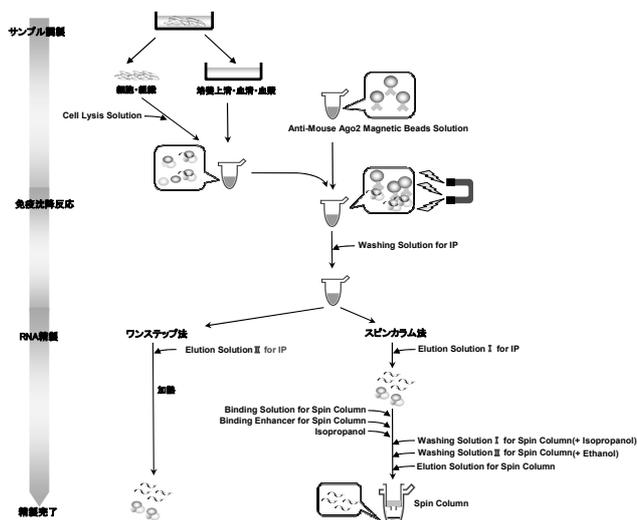
【キット内容】(10回用)

	容量
(1) Anti-Mouse Ago2 Magnetic Beads Solution	600 μ L × 1本
(2) Cell Lysis Solution	20 mL × 1本
(3) Washing Solution for IP	40 mL × 1本
(4) Elution Solution I for IP	500 μ L × 1本
(5) Elution Solution II for IP	500 μ L × 1本
(6) Binding Solution for Spin Column	2 mL × 1本
(7) Binding Enhancer for Spin Column	100 μ L × 1本
(8) Washing Solution I for Spin Column	3 mL × 1本
(9) Washing Solution II for Spin Column	4 mL × 1本
(10) Elution Solution for Spin Column	1 mL × 1本
(11) Spin Column/Collection Tube	10本

【保存】

本キットは、2~10℃で保存してください。

【キット操作概要】



【キット以外に準備する物】

器具:

- 1) 冷却式遠心分離機
- 2) ボルテックスミキサー
- 3) 卓上遠心機
- 4) 磁気スタンド
- 5) 回転式攪拌機(ローテーター)
- 6) チューブミキサー
- 7) ブロックヒーター
- 8) 1.5 mL容マイクロ遠心チューブ
- 9) マイクロピペット
- 10) ピペットチップ

試薬:

- 1) イソプロパノール(コードNo.166-21671)
- 2) エタノール(コードNo.052-07221)

〔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プ処理または市販の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。

2. 試薬類

主としてRNAを精製する操作を行いますので、試薬の取り扱いには十分注意し、RNaseの混入には細心の注意を払ってください。

3. 試料および実験に使用した消耗品の取り扱い

ヒト血清、ヒト血漿、ヒト組織サンプルは感染性試料として取り扱ってください。また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〕

1. サンプルの準備

1-A接着系細胞株サンプルの場合

- 1) 目的のマウスまたはラット細胞株を $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 細胞になるように適切な条件下で培養する^{※1}。
- 2) 培養液を除いた後、PBS (-)で2回洗浄を行う。
- 3) トリプシン・EDTA溶液またはスクレーパーを用いて細胞をディッシュから剥がす。トリプシン・EDTA溶液を用いた場合、細胞を剥がした後に血清入り培地などを加え細胞のダメージを抑える。
- 4) 細胞懸濁液を4℃、 $200 \times g$ で5分間遠心分離し、上清を除く。
- 5) 細胞ペレットをPBS (-) 1 mLで懸濁後、1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す。
- 6) 4℃、 $200 \times g$ で5分間遠心分離し、上清を除く。
- 7) 細胞ペレットをPBS (-) 1 mLで再懸濁し、4℃、 $200 \times g$ で5分間遠心分離し、上清を除く。
- 8) 細胞ペレット ($5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 細胞)^{※2}にCell Lysis Solution 1 mLを加え、ピペッティングにより細胞を懸濁後、氷上で10分間静置する。
- 9) 4℃、 $20,000 \times g$ で20分間遠心分離する^{※3}。
- 10) 上清を1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す。…**細胞溶解液**

1-B浮遊系細胞株サンプルの場合

- 1) 目的のマウスまたはラット細胞株を $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 細胞になるように適切な条件下で培養する^{※1}。
- 2) 培養液を4℃、 $200 \times g$ で5分間遠心分離し、上清を除く。
- 3) 細胞ペレットをPBS (-) 1 mLで懸濁後、1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す。
- 4) 4℃、 $200 \times g$ で5分間遠心分離し、上清を除く。
- 5) 細胞ペレットをPBS (-) 1 mLで再懸濁し、4℃、 $200 \times g$ で5分間遠心分離し、上清を除く。
- 6) 細胞ペレット ($5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 細胞)^{※2}にCell Lysis Solution 1 mLを加え、ピペッティングにより細胞を懸濁後、氷上で10分間静置する。
- 7) 4℃、 $20,000 \times g$ で20分間遠心分離する^{※3}。
- 8) 上清を1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す。…**細胞溶解液**

1-C組織サンプルの場合

- 1) 凍結組織片 (25~50 mg)にCell Lysis Solution 1 mLを加え、テフロンホモジナイザーなどを用いて組織を破碎懸濁する^{※4}。
- 2) 破碎懸濁液を1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移し、氷上で10分間静置する。
- 3) 4℃、 $20,000 \times g$ で20分間遠心分離する^{※3}。
- 4) 上清を1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す。…**細胞溶解液**

1-D血漿・血清サンプルの場合

- 1) $300 \mu\text{L}$ 程度のマウスまたはラットの血漿または血清を1.5 mL容マイクロ遠心チューブに入れる。
- 2) 4℃、 $20,000 \times g$ で10分間遠心分離する。
- 3) 上清 $200 \mu\text{L}$ を1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す。…**血漿または血清サンプル**

1-E培養上清サンプルの場合

- 1) 目的のマウスまたはラット細胞株を適切な条件下で培養する^{※5}。
- 2) 培養液1 mLを1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移し、4℃、 $200 \times g$ で5分間遠心分離する。
- 3) 上清を新しい1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移し、4℃、 $1,200 \times g$ で10分間遠心分離する。
- 4) 上清を新しい1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移し、4℃、 $20,000 \times g$ で10分間遠心分離する。
- 5) 上清を新しい1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す^{※6}。…**培養上清サンプル**

※1 培地や培養細胞数などは目的の細胞株に応じて適切な条件をご検討ください。

※2 使用細胞数の上限は $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 細胞程度です。

※3 遠心分離後、上清に白濁浮遊層が現れることがあります。その際には、遠心フィルター(Millipore社、Ultrafree-MC $0.45 \mu\text{m}$ 、UFC30HV00など)を用いてろ過処理することで浮遊物をほぼ除去することができます。

※4 組織の破碎法はサンプルに応じて適切な条件をご検討ください。使用組織量の上限は50 mg程度です。

※5 培地や培養細胞数などは目的の細胞株に応じて適切な条件をご検討ください。牛血清中のmicroRNAの混入を避けるため無血清培地での培養を推奨しています。

※6 培養上清中のmicroRNA量が少ない場合は、遠心式限外ろ過フィルター(Sartorius社、VIVA SPIN、分子量30000カットなど)を利用して培養上清を濃縮することを推奨いたします。

2. 抗体ビーズの使用前洗浄

- 1) Anti-Mouse Ago2 Magnetic Beads Solution $60 \mu\text{L}$ を1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す^{※7}。
- 2) チューブを専用磁気スタンドにセットし、磁気ビーズが完全に器壁に付着したのを確認後、上清をマイクロピペットで除く。
- 3) ビーズにWashing Solution for IP 1 mLを加え、ボルテックスミキサーで懸濁する。
- 4) チューブを卓上遠心機でスピンドウンした後、専用磁気スタンドにセットし、磁気ビーズが完全に器壁に付着したのを確認後、上清をマイクロピペットで除く。…**洗浄済みビーズ**

※7 Anti-Mouse Ago2 Magnetic Beads Solutionがしっかりと懸濁されたのを確認してから使用してください。

3. 免疫沈降反応

3-A細胞株・組織サンプルの場合

- 1) **細胞溶解液**を**洗浄済みビーズ**に添加し、ボルテックスミキサーで混合する。
- 2) 冷蔵でローテーターにより転倒混和しながら2時間以上反応させる。
- 3) チューブを卓上遠心機でスピンドウンした後、専用磁気スタンドにセットし、磁気ビーズが完全に器壁に付着したのを確認後、上清をピペットで除く。
- 4) ビーズにWashing Solution for IP 1 mLを加え、ボルテックスミキサーで懸濁する。

- 5) チューブを卓上遠心機でスピンドアウンした後、専用磁気スタンドにセットし、磁気ビーズが完全に器壁に付着したのを確認後、上清をマイクロピペットで除く。
- 6) 4)~5)の操作をさらに2回繰り返す。
- 7) チューブを卓上遠心機でスピンドアウンした後、専用磁気スタンドにセットし、磁気ビーズが完全に器壁に付着したのを確認後、上清をマイクロピペットで完全に取り除く。…**【免疫沈降ビーズ】**

3-B血漿・血清・培養上清サンプルの場合

- 1) **【血漿または血清サンプル】**または**【培養上清サンプル】**200 μ Lを**【洗浄済みビーズ】**に添加し、ボルテックスミキサーで混合する。
- 2) 冷蔵でチューブミキサー^{※8}により攪拌混和しながら2時間以上反応させる。
- 3) チューブを卓上遠心機でスピンドアウンした後、専用磁気スタンドにセットし、磁気ビーズが完全に器壁に付着したのを確認後、上清をピペットで除く。
- 4) ビーズにWashing Solution for IP 1 mLを加え、ボルテックスミキサーで懸濁する。
- 5) チューブを卓上遠心機でスピンドアウンした後、専用磁気スタンドにセットし、磁気ビーズが完全に器壁に付着したのを確認後、上清をマイクロピペットで除く。
- 6) (4)~(5)の操作をさらに2回繰り返す。
- 7) チューブを卓上遠心機でスピンドアウンした後、専用磁気スタンドにセットし、磁気ビーズが完全に器壁に付着したのを確認後、上清をマイクロピペットで完全に取り除く。…**【免疫沈降ビーズ】**

※8 チューブミキサーの回転数はビーズが攪拌されていることを確認しながら調整してください(目安: 1,200~1,400 rpm)。また、ローテーターによる転倒混和反応も可能ですが、チューブミキサーによる攪拌混和反応に比べmicroRNAの収量が低下します。

4. 免疫沈降ビーズからのRNA精製

4-Aスピニング法

免疫沈降ビーズから高純度なRNAを精製するためのプロトコルです。以下の試薬を事前に準備してください。

- **【Washing Solution I for Spin Column(+イソプロパノール)】**
Washing Solution I for Spin Columnにイソプロパノール4.5 mLを添加し、よく混合する^{※9}。
- **【Washing Solution II for Spin Column(+エタノール)】**
Washing Solution II for Spin Columnにエタノール12 mLを添加し、よく混合する^{※9}。

- 1) **【免疫沈降ビーズ】**にElution Solution I for IP^{※10} 50 μ Lを添加し、ボルテックスミキサーで懸濁する。
- 2) チューブを卓上遠心機でスピンドアウンした後、専用磁気スタンドにセットし、磁気ビーズが完全に器壁に付着したのを確認後、上清を新しい1.5 mL容マイクロ遠心チューブに移す。
- 3) 2)の上清にBinding Solution for Spin Column 200 μ LとBinding Enhancer for Spin Column 10 μ Lを添加し、ボルテックスミキサーで混合する。
- 4) イソプロパノール 350 μ Lを添加し、ボルテックスミキサーで混合する。
- 5) Spin Column/Collection TubeにElution Solution for Spin Column 50 μ Lを添加し、室温、8,000 \times gで1分間遠心を行う^{※11}。…**【前処理済みカラム】**
- 6) 4)の混合液を卓上遠心機で2~3秒間スピンドアウンした後^{※11}、ピペッティングで溶液を混合し^{※12}、**【前処理済みカラム】**に全量をアプライする。

- 7) 室温、8,000 \times gで1分間遠心分離し、Spin Columnを取り外し、Collection Tube内の溶液(濾液)を取り除く。
- 8) Spin Column/Collection Tubeに**【Washing Solution I for Spin Column(+イソプロパノール)】**500 μ Lを添加する。
- 9) 室温、8,000 \times gで1分間遠心分離し、Spin Columnを取り外し、Collection Tube内の溶液(濾液)を取り除く。
- 10) Spin Column/Collection Tubeに**【Washing Solution II for Spin Column(+エタノール)】**700 μ Lを添加する。
- 11) 室温、8,000 \times gで1分間遠心分離し、Spin Columnを取り外し、Collection Tube内の溶液(濾液)を取り除く。
- 12) 10)~11)の操作をもう1回繰り返す。
- 13) Spin Column/Collection Tubeを室温、8,000 \times gで3分間遠心分離する。
- 14) Spin Columnを新しい1.5 mL容マイクロ遠心チューブにセットし、メンブレンの中央に注意深くElution Solution for Spin Column 50 μ Lを添加し、室温で5分間静置する。
- 15) 室温、8,000 \times gで1分間遠心を行い、1.5 mL容マイクロ遠心チューブに溶出された溶液をRNAサンプルとして回収する^{※14, ※15}。

※9 調製後の溶液は、冷蔵(2~10 $^{\circ}$ C)で保存してください。
 ※10 Elution Solution I for IPは冷蔵保存により成分が析出しますので、使用前に室温に戻し、ボルテックスミキサーで懸濁後、成分が完全に溶解していることを確認してから使用してください。
 ※11 このカラム前処理操作を行うことでRNAの回収効率が上昇しますので、必ずこの操作を行ってください。
 ※12 長時間のスピンドアウンは避け、マイクロ遠心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。
 ※13 RNA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。
 ※14 回収したRNAサンプルは-80 $^{\circ}$ Cで保存してください。
 ※15 回収したRNAサンプルに含まれるmicroRNA量は微量のため、分光光度計(A260/A280)やバイオアナライザーでは測定できません。細胞株・組織サンプルから回収したmicroRNA量の測定には、Urea-PAGE後の核酸銀染色検出または定量PCRによる検出を推奨しています。また、血漿・血清・培養上清サンプルから回収したmicroRNAはさらに微量のため、定量PCRによる検出を推奨しています。回収されるmicroRNA量は実験に使用したサンプルによって異なるため、回収後に上記方法によって回収量を確認することを推奨しています。

4-Bワンステップ法

免疫沈降ビーズから簡便に高収量のRNAが取得できるプロトコルです。

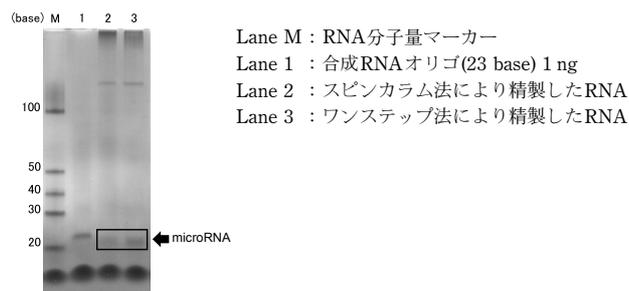
- 1) **【免疫沈降ビーズ】**にElution Solution II for IP 50 μ Lを添加しボルテックスミキサーで懸濁後、ビーズが沈殿しないよう速やかにブロックヒーターを用いて90 $^{\circ}$ Cで90秒間インキュベーションする^{※16}。
- 2) チューブを氷上に移して1分間以上静置した後、卓上遠心機でスピンドアウンする。
- 3) チューブを専用磁気スタンドにセットし、磁気ビーズが完全に器壁に付着したのを確認後、上清(溶出液)を新しい1.5 mL容マイクロ遠心チューブに回収する^{※14, ※15, ※17}。

※16 多検体を処理したい場合はサーモミキサーを使用して攪拌しながらインキュベーションすることを推奨しています。
 ※17 回収したRNAサンプルには若干のタンパク質成分が含まれますが、Urea-PAGE後の核酸銀染色検出や定量PCR検出には問題ないことを確認しています。

【使用例】

マウスP388D1細胞からのmicroRNAの精製

MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Human Ago2を用いて、マウスP388D1細胞(2×10^7 cells)からスピнкаラム法またはワンステップ法で精製したmicroRNA画分をUrea-PAGEにより分離し、銀染色によって検出した。



図：マウスP388D1細胞から精製したmicroRNAの銀染色による検出

【特許について】

RNA精製におけるワンステップ法は、特許出願中です。

【関連製品】

コード No.	品 名	容 量
014-22023	Anti Mouse Ago2, Monoclonal Antibody	50 μ L
166-21671	2-Propanol	100 mL
052-07221	Ethanol (99.5%)	100 mL
316-90101	Distilled Water, Deionized, Sterile	100 mL
202-16931	0.05w/v% Trypsin-0.53 mmol/L EDTA ·4Na Solution with Phenol Red	100 mL
209-16941	0.25w/v% Trypsin-1 mmol/L EDTA ·4Na Solution with Phenol Red	100 mL
318-90041	5 \times TBE	1000 mL
194-15881	SuperSep™ RNA, 15%, 17well	5 枚
182-02711	R-Mark™ Small RNA Marker (20-50nt)	50 μ L

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

1802KA1