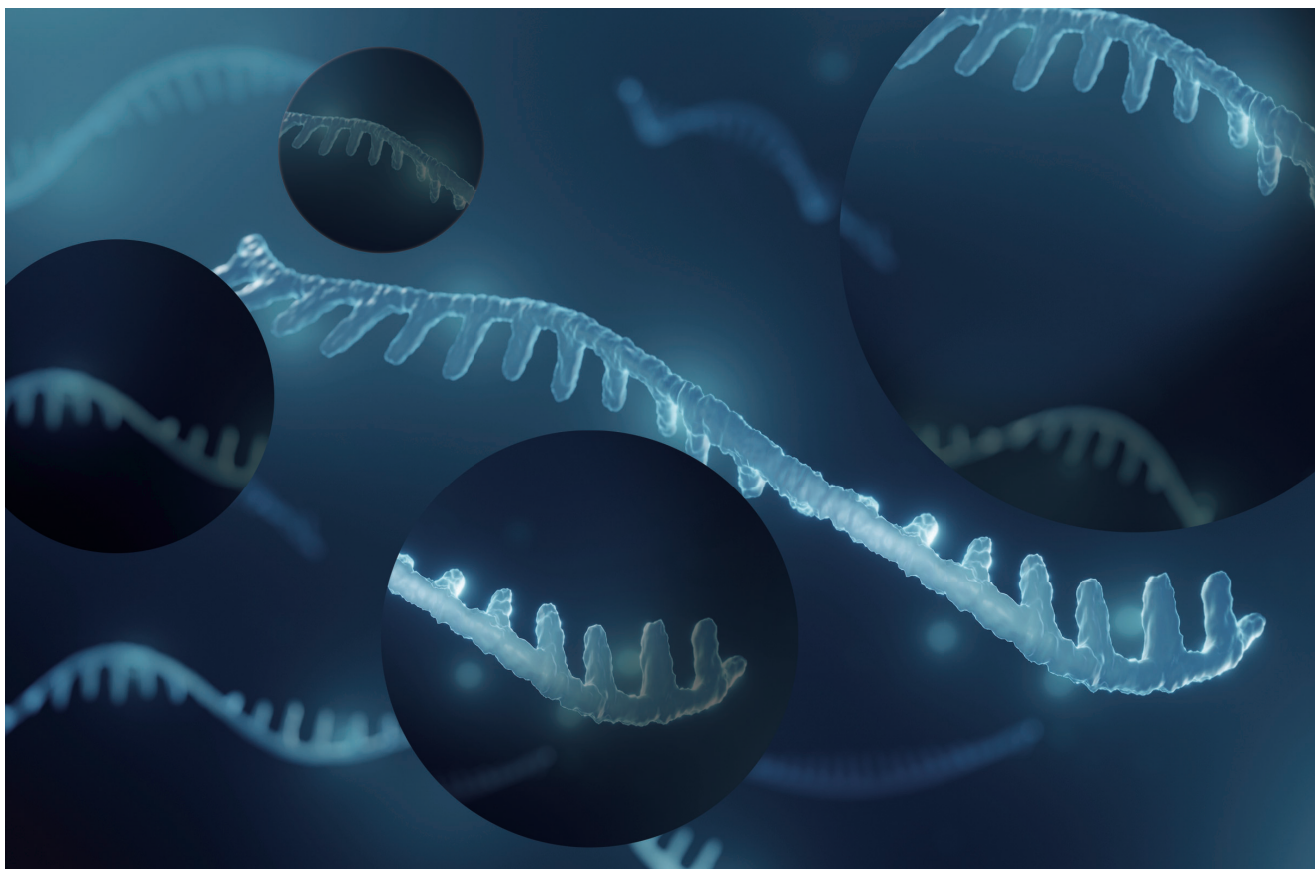


miRNA Enhance Buffer

# miRNAエンハンスバッファー



small interfering RNA(siRNA)やmicroRNA(miRNA)などの低分子RNAは遺伝子制御に関与しており、細胞の増殖、分化、アポトーシスなど、種々の生物学的プロセスに影響を与えることが明らかにされております。トータルRNAを精製する方法として、シカジーニクス® RNAプレップキット（組織用）2をはじめとしたスピнкаラムを用いた手法がありますが、低分子RNAを効率よく精製するためには専用のキットが必要となります。

本試薬は、カオトロピック塩を含むバッファーへ添加することによりスピнкаラム担体へのmiRNA結合を促進します。専用のキットの代わりに本試薬とシカジーニクス® RNAプレップキット（組織用）2を組み合わせることで、miRNAを効率的に抽出することが可能になります。

## 特徴

- スピнкаラムを用いたRNA精製キットと組み合わせることによりmiRNAの抽出を促進
- miRNA専用の精製キットは不要で、効率的にmiRNAの抽出が可能



miRNAエンハンスバッファー



スピнкаラム

## 製品情報

製品番号	製品名	容量	保管温度
—	miRNAエンハンスバッファー	20 mL	室温

本製品は、社会医療法人大塚会が開発した小型RNAの抽出効率を改善する技術を用いた製品です。

miRNA エンハンスバッファーを使用した miRNA 回収プロトコル

実験を行う前に…

- ・初回使用時に規定量のエタノールを③Buffer RSW に加えて下さい。
- ・初回使用時に規定量の⑤Nuclease-free water を⑥DNase I に加えて下さい。添加後の DNase I 溶液は -20 °C で保存して下さい。
- ・①Buffer RAL、②Buffer RW に沈殿が生じた場合には 50 °C でインキュベートし、沈殿をよく溶かしてからご使用下さい。
- ・miRNA エンハンスバッファーは 37 °C で 30 分程加温し、ボルテックスにて混和するなど、よく溶かしてからご使用下さい。

サンプルの準備：各種検体の種類別に、取扱説明書に記載の前処理（プロトコール 1-2）を行って下さい。

操作方法

細胞サンプル・組織サンプル共通  
5×10<sup>6</sup> cells(細胞) or 10 mg(組織)

溶解

※予め①Buffer RAL 1 mLにつき10 µLの  
2-メルカプトエタノール (2-ME:別売) を加えて下さい。

- ← サンプル
- ← ①Buffer RAL(2-ME添加) : 350 µL
- ← 破碎・懸濁 (ホモジナイズ)
- ← miRNA エンハンスバッファー : 400 µL

結合

溶液の半量をSV Column type Fに移す

- 遠心 13,000 rpm, 室温, 1分間
- ろ液を捨てカラムを再セット
- ← 残りの溶液を添加

洗浄

- 遠心 13,000 rpm, 室温, 1分間
- ろ液を捨てカラムを再セット
- ← ③Buffer RSW : 500 µL
- 遠心 13,000 rpm, 室温, 1分間
- ろ液を捨てカラムを再セット
- ← ③Buffer RSW : 500 µL

溶出

- 遠心 13,000 rpm, 室温, 1分間
- ※チューブの内側の水滴を除去
- 1.5 mLチューブにカラムをセット
- ← ⑤Nuclease-free water : 50 µL
- 静置 室温, 1分間
- 遠心 13,000 rpm, 室温, 1分間

DNA 除去 に続く

DNA 除去

- ← DNase I希釈液 : 70 µL
- 室温, 10分間静置

結合

溶液の半量を新しいSV Column type Fに移す

- 遠心 13,000 rpm, 室温, 1分間
- ろ液を捨てカラムを再セット
- ← 残りの溶液を添加

洗浄

- 遠心 13,000 rpm, 室温, 1分間
- ろ液を捨てカラムを再セット
- ← ③Buffer RSW : 500 µL
- 遠心 13,000 rpm, 室温, 1分間
- ろ液を捨てカラムを再セット
- ← ③Buffer RSW : 500 µL

溶出

- 遠心 13,000 rpm, 室温, 1分間
- ※チューブの内側の水滴を除去
- 1.5 mLチューブにカラムをセット
- ← ⑤Nuclease-free water : 50 µL
- 静置 室温, 1分間
- 遠心 13,000 rpm, 室温, 1分間

精製miRNA溶液

\*溶出したRNA溶液は-70°C以下にて保存して下さい。

- |          |          |
|----------|----------|
| 実績のある細胞種 | 実績のある組織  |
| ・ K562   | ・ 膀胱生検組織 |
| ・ PC-3   |          |

## アプリケーション 膀胱がん生検組織を用いたmiRNAの検出

【対象サンプル】 経尿道的膀胱腫瘍切除術 (TURBT) 実施時に採取された生検 16 例

【対象 miRNA】 miR-21

### miRNA 抽出方法

【使用キット】 シカジーニアス® RNA プレップキット (組織用)2, miRNA エンハンスバッファ

1. TURBT 実施時に採取した膀胱生検組織を約 10 mg に切り出す。
2. Buffer RAL (2-ME 加) 350  $\mu$ L を添加し、組織を溶解させる。
3. 13,000 rpm で 2 分間遠心し、上清を回収する。
4. miRNA エンハンスバッファを 400  $\mu$ L 添加する。
5. カラムに移し、13,000 rpm で 1 分間遠心し、ろ液を捨てる。
6. 350  $\mu$ L の Buffer RSW を添加し、13,000 rpm で 1 分間遠心した後、ろ液を捨てる。
7. 500  $\mu$ L の Buffer RSW を添加し、13,000 rpm で 1 分間遠心した後、ろ液を捨てる。
8. 13,000 rpm で 1 分間遠心し、チューブ内壁についた液体を完全に除去する。
9. 50  $\mu$ L の RNase-free water を添加し、13,000 rpm で 1 分間遠心して miRNA を溶出する。

### cDNA合成の反応条件

#### Reverse Transcript

【使用キット】

FastGene Scriptase II cDNA Synthesis: 日本ジェネティクス社

#### Reaction mixtures

5×Reverse transcriptase buffer	2.0 $\mu$ L
Stem-Loop RT-primer (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ L
FastGene Scriptase II (200 U/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L
RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ L)	0.25 $\mu$ L
dNTPS (2 mM)	1.0 $\mu$ L
DTT (0.1 M)	1.0 $\mu$ L
RNA solution	2.5 $\mu$ L
Water	2.55 $\mu$ L

#### Stem-loop RT-primer sequence (5'→3')

GTCAGAGGAGGTGCAGGGTCCGAGGTATTACTCT  
GATCGATTTCGCACCTCCTCTGACTCAACA

#### Reaction Condition

16°C	...	30 min	} 60 cycles
30°C	...	30 sec	
42°C	...	30 sec	
50°C	...	1 sec	
85°C	...	5 min	

反応産物をTE bufferで5倍希釈して、以降の反応に使用した。

### Real time PCRの反応条件

#### Reaction mixtures

cDNA solution	2.5 $\mu$ L
Essential Probe Master (Roche)	5 $\mu$ L
each primer (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ L
probe (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ L
Water	1.9 $\mu$ L

#### Primer and probe sequences (5'→3')

<miR-21>

Forward primer GCCTGCTAGCTTATCAGACTGATG  
Reverse primer GTGCAGGGTCCGAGGT  
Probe 5' -/56-FAM/TCTGATCGA/ZEN/  
TTCGCACCTCCTCTGAC/3IABkFG/-3'

#### Reaction Condition

95 °C	...	10 min
95 °C	...	10 sec
60 °C	...	30 sec

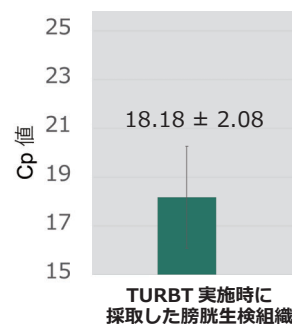
 } 40 cycles

反応はLightCycler 96 (Roche) で実施し、2重測定の平均値を測定値とした。

### 結果

#### miR-21

検体 No.	Cp 値	検体 No.	Cp 値
1	19.14	9	19.87
2	20.31	10	17.19
3	19.49	11	17.66
4	16.18	12	18.11
5	18.02	13	19.58
6	18.09	14	15.74
7	22.60	15	15.53
8	18.97	16	14.34
		mean	18.18
		SD	2.08



\* 社会医療法人大雄会医科学研究所 成瀬 有純様のご厚意により、miRNA 検出の実施例として本データをご提供いただきました。

## 関連製品～核酸精製キット～



### 仕様

最大サンプル量	組織の場合： 30 mg 細胞の場合： $1 \times 10^7$ cells
カラムへの最大ローディング量	750 $\mu$ L
最大結合 RNA 量	500 $\mu$ g
溶出量	30~100 $\mu$ L

### 構成試薬

個別名称	容量	用途
SV Column type F (コレクションチューブ付)	10個×5	核酸結合
1.5 mL チューブ	50個×1	RNA 回収
①Buffer RAL	40 mL×1	サンプル溶解
②Buffer RW	40 mL×1	RNA結合促進
③Buffer RSW	12 mL×1	カラム洗浄
④Buffer DRB	5 mL×1	カラム洗浄
⑤Nuclease-free water	15 mL×1	RNA溶出
⑥DNase I	240 Kunitz unit	ゲノムDNAの分解

製品番号	製品名	規格	容量	希望価格
08144-96	シカジーニアス® RNAプレップキット(組織用)2	分子生物学用	50回分	45,000
14032-08	エタノール(99.5)	分子生物学用	500mL	5,600
25099-30	2-メルカプトエタノール	鹿特級	25g	1,500

## 関連製品～電気泳動関連試薬～

製品番号	製品名	規格	容量	希望価格
01097-23	アガロース KANTO	電気泳動用	100 g	¥11,500
01097-79	アガロース KANTO	電気泳動用	1 kg	都度見積
01095-23	アガロース KANTO S	電気泳動用	100 g	¥13,000
01095-79	アガロース KANTO S	電気泳動用	1 kg	都度見積
01088-23	アガロース KANTO ME (中電気浸透度)	電気泳動用	100 g	¥21,000
01088-79	アガロース KANTO ME (中電気浸透度)	電気泳動用	1 kg	都度見積
01098-23	アガロース KANTO LE (低電気浸透度)	電気泳動用	100 g	¥23,000
01098-79	アガロース KANTO LE (低電気浸透度)	電気泳動用	1 kg	都度見積
01089-23	アガロース KANTO HC(短フラグメント用)	電気泳動用	100 g	¥29,500
01089-79	アガロース KANTO HC(短フラグメント用)	電気泳動用	1 kg	都度見積
01096-96	アガロース KANTO LM (低融点)	電気泳動用	50 g	¥21,000
01096-08	アガロース KANTO LM (低融点)	電気泳動用	500 g	都度見積
01090-23	アガロース KANTO ST (高ゲル強度)	電気泳動用	100 g	¥23,000
01090-79	アガロース KANTO ST (高ゲル強度)	電気泳動用	1 kg	都度見積
46510-79	10 × TBE緩衝液	電気泳動用	1 L	¥5,300
46508-79	50 × TAE緩衝液	電気泳動用	1 L	¥10,500
46509-79	10 × TAE緩衝液	電気泳動用	1 L	¥4,700

- 本記載の製品は、試薬 ( 試験、研究用として用いる化学薬品 ) としての用途にご利用ください。 ● 本記載価格に、消費税等は含まれておりません。
- 本記載の製品情報は予告なく変更する場合があります。最新情報は、弊社ホームページ「Cica-web」をご確認ください。

**Cica** 関東化学株式会社  
試薬事業本部 試薬部

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

TEL : 03-6214-1090

E-mail : reag-info@gms.kanto.co.jp

HP : <https://www.kanto.co.jp>

BGF-03 (202406)