

<For Research Use Only>

Code No. 298-68001 (10 reactions)

Wako

for genetic research
Target mRNA Cloning Kit Wako

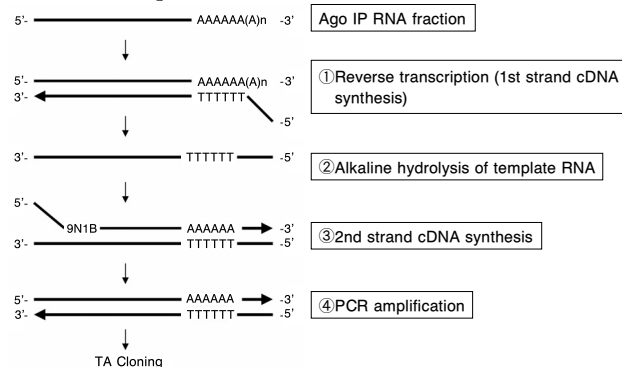
[Introduction]

Target mRNA Cloning Kit *Wako* is used for cDNA amplification from a small amount of mRNA. This product is used for the cloning of target mRNA bound with RISC (RNA-induced silencing complex) using an Ago IP RNA fraction.

[Features]

- 1) Independent cDNA amplification against the length of mRNA
- 2) High efficiency of cDNA amplification
- 3) Investigation of microRNA targeted mRNA

[Outline of kit procedures]



[Kit contents] (10 Reactions)

Target mRNA Cloning Kit *Wako* includes a total of 14 components

	Content
(1) dT(20)-RT Primer (20 pmol/ μ L)	10 μ L \times 1 tube
5'-GACCATATGACGAGATCCGAGCTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (45mer)	
(2) 10 \times RT Buffer	20 μ L \times 1 tube
(3) dNTP Mixture Solution (2.5 mmol/L each)	20 μ L \times 1 tube
(4) RNase Inhibitor (20 U/ μ L)	10 μ L \times 1 tube
(5) Reverse Transcriptase (200 U/ μ L)	10 μ L \times 1 tube
(6) 0.5 mol/L EDTA Solution	20 μ L \times 1 tube
(7) 1 mol/L Tris-HCl Solution	200 μ L \times 1 tube
(8) Ethachinmate	30 μ L \times 1 tube
(9) 10 mol/L Ammonium Acetate Solution	480 μ L \times 1 tube
(10) 2nd Strand Synthesis Primer (20 pmol/ μ L)	10 μ L \times 1 tube
5'-CATGGTATCGACGAGACTGAGGCTGNNNNNNNNB-3' (35mer)	
(11) 5' PCR Primer (20 pmol/ μ L)	10 μ L \times 1 tube
5'-CATGGTATCGACGAGACTGAG-3' (21mer)	
(12) 3' PCR Primer (20 pmol/ μ L)	10 μ L \times 1 tube
5'-GACCATATGACGAGATCCGAG-3' (21mer)	
(13) 5' Colony PCR Primer (5 pmol/ μ L)	960 μ L \times 1 tube
5'-GTATCGACGAGACTGAGGCTG-3' (21mer)	
(14) 3' Colony PCR Primer (5 pmol/ μ L)	960 μ L \times 1 tube
5'-CGAGATCCGAGCTTCTTTTT-3' (21mer)	

[Additional materials required]

Reagents :

[1] Thermostable DNA polymerase for PCR

We recommend HotGoldstar™ DNA polymerase (Code No. 314-80251, 310-80253) for suppression of non-specific amplification. HotGoldstar™ DNA polymerase is used for hot start PCR and activated by 10 minutes incubation at 95°C before PCR cycles. DNA fragments, which were amplified by HotGoldstar™ DNA polymerase, are 3' protruding end of adenine base. These fragments therefore are able to directly insert into T-vectors.

[2] PCR Purification Kit *Wako* (Wako Cat. # 298-67901)

- 3) Sterile distilled water
- 4) 70%, 99.5% Ethanol
- 5) 0.2 mol/L Sodium hydroxide solution
- 6) Cloning vector
- 7) *E. coli* competent cells
- 8) Ligation reagents
- 9) PBS (-)
- 10) Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (25:24:1)
- 11) Chloroform
- 12) Trypsin-EDTA Solution (for adherent cells)

Equipment :

- 1) 1.5 mL Micro centrifugation tube
- 2) Micro pipette
- 3) Pipette tip
- 4) Tubes rotator
- 5) High speed microcentrifuge (Max > 14,500 rpm, 20,000 \times g)
- 6) Vortex mixer

[Important information before experiment]

1. Equipment
PCR tube, microcentrifugation 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
Additional reagents excluding kit must be sterilized by autoclave or filtration.

[Procedure]

«Preparation of Ago2 IP RNA»

The protocol of this step is same with following products until the step of 4.-b) of this instruction manual.

- microRNA Isolation Kit, Human Ago2 (Wako cat.# 292-66701)
- microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2 (Wako cat.# 292-67301)

This kit is covering the following step of «Reverse Transcription».

1. Preparation of cell pellet

For adherent cells

- 1) Culture the cells ($5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cells).^{※1}
- 2) Remove the medium from culture dishes.
- 3) Wash the cells twice with PBS (-).
- 4) Collect the cells using a scraper or Trypsin-EDTA solution from dishes. In the case of using Trypsin-EDTA solution, add medium including serum after cell collection.
- 5) Centrifuge cell suspension at 200 \times g for 5 minutes at 4°C.
- 6) Remove the supernatant.
- 7) Suspend cell pellet in 1 mL of PBS (-).
- 8) Transfer all of suspension into a new 1.5 mL micro centrifugation tube.
- 9) Repeat steps 5) to 7).
- 10) Repeat steps 5) to 6).

For suspension cells

- 1) Culture the cells ($5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cells).^{※1}
- 2) Centrifuge cell suspension at $200 \times g$ for 5 minutes at 4°C.
- 3) Remove the supernatant.
- 4) Suspend cell pellet in 1 mL of PBS (-).
- 5) Transfer all of suspension into a new 1.5 mL micro centrifugation tube.
- 6) Repeat steps 2) to 4).
- 7) Repeat steps 2) to 3).

※1. Maximum cell numbers are 1×10^7 . Non-specific immunoprecipitation and the decrease of microRNA purification efficiency will be caused by the use of more than $1 \times 10^7 \times$ cells.

2. Prewashing of Anti Human/Mouse Ago2 Antibody Beads

- 1) Transfer 50 μ L of Anti Human/Mouse Ago2 Antibody Beads Solution into a new 1.5 mL micro centrifugation tube.
- 2) Centrifuge beads suspension at $3,000 \times g$ for 30 seconds at 4°C.
- 3) Remove the supernatant.
- 4) Suspend the beads pellet by using 1 mL of Cell Lysis Solution.
- 5) Repeat steps 2) and 3). (Prewashed Beads)

3. Preparation of Cell Lysate

- 1) Add 1 mL of Cell Lysis Solution into a tube of cell pellet and suspend cells by pipetting.
- 2) Incubate for 10 minutes on ice.
- 3) Centrifuge the cell lysate at $20,000 \times g$ for 20 minutes at 4°C.
- 4) Transfer the supernatant into a new 1.5 mL micro centrifugation tube. (Cell Lysate)

4. Purification of microRNA fraction

a) Antigen-Antibody Reaction (Immunoprecipitation)

- 1) Add Cell Lysate into a tube of Prewashed Beads.
- 2) Mix by vortex mixer.
- 3) Mix by rotator for minimum 2 hours at 4°C.
- 4) Centrifuge at $3,000 \times g$ for 30 seconds at 4°C.
- 5) Remove the supernatant. (Reacted Beads)

b) Washing after Antigen-Antibody Reaction and elution of Ago2 protein

- 1) Add 1 mL of Cell Lysis Solution into a tube of Reacted Beads.
- 2) Mix by vortex mixer.
- 3) Centrifuge at $3,000 \times g$ for 30 seconds at 4°C.
- 4) Remove the supernatant.
- 5) Repeat steps 1) to 4) at twice. (Washed Beads)
- 6) Add 50 μ L of Elution Solution^{*1} into a tube of Washed Beads and mix by vortex mixer.
- 7) Centrifuge at $3,000 \times g$ for 30 seconds at 4°C.
- 8) Transfer the supernatant^{*2} into a new 1.5 mL micro centrifugation tube. (Protein Solution)

c) Purification of microRNA

- 1) Add 1 mL of ISOGEN^{*3} reagent into a tube of Protein Solution and mix by vortex mixer.
- 2) Add 300 μ L of chloroform and mix by vortex mixer for 1 minute. Incubate for 30 minutes on ice.
- 3) Centrifuge at $18,800 \times g$ for 10 minutes at 4°C.
- 4) Transfer the supernatant^{*4} into a new 2.0 mL micro centrifugation tube. Add 1 μ L of Ethachinmate and equal volume of Isopropanol. Mix by vortex mixer.
- 5) Centrifuge at $18,800 \times g$ for 10 minutes at 4°C.
- 6) Remove the supernatant.
- 7) Add 500 μ L of 70% Ethanol and mix by vortex mixer.
- 8) Centrifuge at $18,800 \times g$ for 10 minutes at 4°C.
- 9) Repeat steps 6) to 8).

10) Remove the supernatant.

- 11) Open the cap of the 2.0 mL micro centrifugation tube and dry the pellet for 20 minutes at room temperature.
- 12) Dissolve the pellet in 13 μ L of sterile distilled water.^{*5} (Ago2 IP RNA Solution)

- *1. Components of the Elution Solution will be precipitated during storage at 4°C. In this case, Elution Solution should be warmed to room temperature and mixed by a vortex mixer. We recommend confirmation of whether precipitation is completely dissolved or not.
- *2. To avoid the contamination of non-specific nucleic acids, carefully pipette the supernatant without absorption of beads pellet.
- *3. This reagent is available from NIPPON GENE CO., LTD.. (Cat No. 311-02501) This reagent mainly is included guanidine thiocyanate and phenol.
- *4. Carefully pipette only the supernatant.
- *5. Store the sample solution at -80°C.

◀Reverse Transcription▶

The kit components of this product are used for the following protocol. We recommend the use of PCR Purification Kit *Wako* (Wako cat.# 298-67901), which is sold separately, for the steps of <Reverse Transcription>, <2nd strand cDNA synthesis> and <PCR Amplification>.

- 1) Transfer 13 μ L of Ago2 IP RNA Solution into a PCR tube and add 1 μ L of dT(20)-RT Primer.
- 2) Incubate for 3 minutes at 70°C and for 2 minutes on ice.
- 3) Mix the following reagents in a PCR tube on ice.

<u>Ago2 IP RNA Solution</u> + dT(20)-RT Primer	14 μ L
10 \times RT Buffer	2 μ L
dNTP Mixture Solution	2 μ L
RNase Inhibitor	1 μ L
Reverse Transcriptase	1 μ L
	20 μ L

- 4) Incubate for 10 minutes at 42°C. (Reverse transcription)
- 5) Add 2 μ L of 0.5 mol/L EDTA and mix gently on ice. (Stop reaction at RT)
- 6) Add 8 μ L of 0.2 mol/L NaOH (50 μ L of 2 mol/L NaOH + 450 μ L of sterile distilled water) (Not included in this kit).
- 7) Mix and incubate for 30 minutes at 65°C. (Alkaline hydrolysis of template mRNA)
- 8) Incubate for 1 minute on ice.
- 9) Add 20 μ L of 1 mol/L Tris-HCl Solution and mix.
- 10) Use the PCR Purification Kit *Wako* for purification of nucleic acid by the following procedure.

◀Procedure of the PCR Purification Kit *Wako* (Wako cat.# 298-67901)▶

The kit components of PCR Purification Kit *Wako* : 「※」

- 1) Add 130 μ L of Binding Buffer[※] and mix.
- 2) Set Spin Column[※] in a 2 mL Collection Tube[※].
- 3) Transfer the total solution of step 1) into the Spin Column[※].
- 4) Incubate for 1 minute at room temperature.
- 5) Centrifuge at $9,600 \times g$ for 1 minute at room temperature.
- 6) Remove the Spin Column[※] from the 2 mL Collection Tube and dispose of the solution in the 2 mL Collection Tube.
- 7) Add 700 μ L of Washing Buffer[※] into the Spin Column[※].

- 8) Repeat steps 5) to 6).
- 9) Reset the Spin Column[®] in the 2 mL Collection Tube[®] and centrifuge at 18,800 × g for 3 minutes at room temperature.
- 10) Transfer the Spin Column[®] into a 1.5 mL Collection Tube[®].
- 11) Add 50 μL of Elution Buffer[®] into the Spin Column[®].
- 12) Incubate for 3 minutes at room temperature.
- 13) Centrifuge at 9,600 × g for 1 minute at room temperature.
- 14) Add 1 μL of Ethachinmate and mix.
- 15) Add 12 μL of 10 mol/L Ammonium Acetate Solution and mix.
- 16) Add 125 μL of 99.5% Ethanol and mix.
- 17) Centrifuge at 18,800 × g for 10 minutes at 4 °C.
- 18) Remove the supernatant.
- 19) Add 500 μL of 70% Ethanol and mix by vortex mixer.
- 20) Centrifuge at 18,800 × g for 10 minutes at 4 °C.
- 21) Repeat steps 18) to 20).
- 22) Remove the supernatant.
- 23) Dry the pelle.
- 24) Dissolve the pellet in 35.5 μL of sterile distilled water. (1st Strand cDNA Solution)

«2nd strand cDNA synthesis»

We recommend the use of HOTGoldstar[™] DNA Polymerase (EUROGENTEC), which is sold separately.

- 1) Transfer 35.5 μL of 1st Strand cDNA Solution into a PCR tube and mix the following reagents in the PCR tube on ice.

1st Strand cDNA Solution	35.5 μL
2nd Strand Synthesis Primer	1 μL
10 × PCR Reaction Buffer (EUROGENTEC)	5 μL
2.5 mmol/L dNTP Mixture (EUROGENTEC)	4 μL
25 mmol/L MgCl ₂ (EUROGENTEC)	4 μL
HOTGoldstar [™] DNA Polymerase (EUROGENTEC)	0.5 μL
Total	50 μL

- 2) Incubate at following condition. (2nd strand cDNA synthesis)

95 °C	10 minutes
30 °C	1 minute
40 °C	30 seconds
50 °C	30 seconds
60 °C	30 seconds
72 °C	2 minutes
95 °C	1 minute
氷上	

- 3) Use the PCR Purification Kit *Wako* (Protocol steps 1)–22)) for purification of nucleic acid.
- 4) Dry the pellet.
- 5) Dissolve the pellet in 34.5 μL of sterile distilled water. (2nd Strand cDNA Solution)

«PCR Amplification»

- 1) Transfer 34.5 μL of 2nd Strand cDNA Solution into a PCR tube and mix the following reagents in the PCR tube on ice.

<u>2nd Strand cDNA Solution</u>	34.5 μL
5' PCR Primer	1 μL
3' PCR Primer	1 μL
10 × PCR Reaction Buffer (EUROGENTEC)	5 μL
2.5 mmol/L dNTP Mixture (EUROGENTEC)	4 μL
25 mmol/L MgCl ₂ (EUROGENTEC)	4 μL
HOTGoldstar [™] DNA Polymerase (EUROGENTEC)	0.5 μL
Total	50 μL

- 2) Incubate at the following conditions. (PCR amplification)

95 °C	10 minutes	
↓		
95 °C	20 seconds	} 24–26 cycles
60 °C	10 seconds	
72 °C	30 seconds	
↓		
72 °C	2 minutes	

- 3) Incubate for 1 minute on ice.
- 4) Use the PCR Purification Kit *Wako* (Protocol steps 1)–22)) for purification of nucleic acid.
- 5) Dry the pellet.
- 6) Dissolve the pellet in 4 μL of sterile distilled water. (cDNA Solution)

«Transformation of *E. coli*»

- 1) Ligate cDNA Solution into T-vector^{*5}.
- 2) Transform the constructed plasmids into *E. coli* competent cells. Select transformants by using LB agar medium including antibiotics.

*5. We recommend checking the DNA length and concentration of cDNA Solution before TA cloning by using Bioanalyzer.

«Insert check by colony PCR»

- 1) Mix the following reagents in a PCR tube on ice.

5' Colony PCR Primer	1 μL
3' Colony PCR Primer	1 μL
10 × PCR Reaction Buffer (EUROGENTEC)	1 μL
2.5 mmol/L dNTP Mixture (EUROGENTEC)	1 μL
25 mmol/L MgCl ₂ (EUROGENTEC)	0.8 μL
Sterile distilled water	5.1 μL
HOTGoldstar [™] DNA Polymerase (EUROGENTEC)	0.1 μL
Total	10 μL

- 2) Suspend the colony in this reaction solution, and incubate at the following conditions.

95 °C	10 minutes	
↓		
95 °C	20 seconds	} 30 cycles
56 °C	10 seconds	
72 °C	30 seconds	
↓		
72 °C	2 minutes	

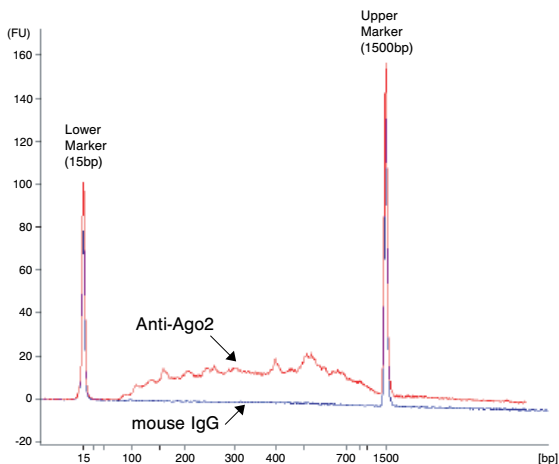
- 3) Check the insert cDNA.
- 4) Culture the transformed *E. coli*.
- 5) Purify the plasmids from transformed *E. coli* and check the sequences using a DNA sequencer.

[Example of use]

The detection of the amplified cDNA by capillary electrophoresis.

Negative Control : mouse IgG

Test sample : Anti Human Ago2 Monoclonal Antibody



Size distribution of synthesized cDNA by using this kit.

The amount and size distribution of cDNA were determined with the Bioanalyzer DNA 1000 Kit. The cDNA were specifically synthesized from anti-Ago2 immunoprecipitates. Cell line; HeLa, Cell numbers ; 1×10^7 cells.

[Reference]

Hayashida, Y., *et al.* : A useful approach to total analysis of RISC-associated RNA., *BMC Research Notes*, 2, 169 (2009)

[Package]

10 reactions.

[Expiration date]

Indicated on the label.

[Storage]

Keep at -20°C .

[Patent]

Target mRNA Cloning Kit *Wako* is patent pending.

[Related Products]

Code No.	Description	Package Size
298-67901	PCR Purification Kit <i>Wako</i>	30 reactions
292-66701	microRNA Isolation Kit, Human Ago2	10 reactions
292-67301	microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2	10 reactions
290-66501	microRNA Cloning Kit <i>Wako</i>	8 reactions
298-65103	Single Strand DNA Ligase, Thermostable, recombinant, Solution	200 units
292-65101		500 units
011-22033	Anti Human Ago2, Monoclonal Antibody	50 μL
015-22031		100 μL
014-22023	Anti Mouse Ago2, Monoclonal Antibody	50 μL
018-22021		100 μL
311-90151	Phenol : Chloroform : Isoamyl Alcohol	250 mL
312-01791	Ethachinmate	0.2 mL
052-07221	Ethanol (99.5%)	100 mL
054-07225		500 mL
316-90101	Distilled Water, Deionized, Sterile	100 mL
038-02606	Chloroform	500 mL
202-19631	0.05 w/v% Trypsin-0.53 mmol/L EDTA · 4Na Solution with Phenol Red	100 mL
209-19641	0.25 w/v% Trypsin-1mmol/L EDTA · 4Na Solution with Phenol Red	100 mL
311-03961	CLEAR STAIN Ag	20 stains
194-05631	2 mol/L Sodium Hydroxide Solution	100 mL

Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

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>

Wako Chemicals USA, Inc.

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

Wako Chemicals GmbH

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

遺伝子研究用

Target mRNA Cloning Kit *Wako*

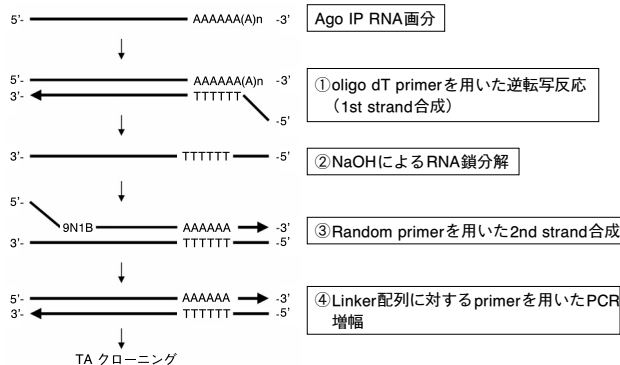
【はじめに】

Target mRNA Cloning Kit *Wako* はRNA画分に含まれる微量mRNAを増幅するキットです。細胞内でmicroRNAと結合しているRISC (RNA-induced silencing complex) の主要コンポーネントであるAgoタンパク質を免疫沈降して精製されるRNA画分には、microRNAが相互作用するシード配列を持つmRNA断片が含まれています。本品は、それらの標的mRNAの候補となりうるRNAをcDNA化することが可能です。

【特長】

- 1) mRNA鎖長に影響されずに増幅可能
- 2) Ago免疫沈降との併用で標的mRNA探索が可能
- 3) 微量mRNAのcDNA増幅に最適

【キット操作概要】



【キット内容】 (10回用)

Target mRNA Cloning Kit *Wako*は、14本の構成部材からなります。

- | | |
|---|--------------------------|
| (1) dT(20)-RT Primer (20 pmol/ μ L) | 10 μ L \times 1 本 |
| 5'-GACCATATGACGAGATCCGAGCTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (45mer) | |
| (2) 10 \times RT Buffer | 20 μ L \times 1 本 |
| (3) dNTP Mixture Solution (2.5 mmol/L each) | 20 μ L \times 1 本 |
| (4) RNase Inhibitor (20 U/ μ L) | 10 μ L \times 1 本 |
| (5) Reverse Transcriptase (200 U/ μ L) | 10 μ L \times 1 本 |
| (6) 0.5 mol/L EDTA Solution | 20 μ L \times 1 本 |
| (7) 1 mol/L Tris-HCl Solution | 200 μ L \times 1 本 |
| (8) Ethachinmate | 30 μ L \times 1 本 |
| (9) 10 mol/L Ammonium Acetate Solution | 480 μ L \times 1 本 |
| (10) 2nd Strand Synthesis Primer (20 pmol/ μ L) | 10 μ L \times 1 本 |
| 5'-CATGGTATCGACGAGACTGAGGCTGNNNNNNNNNB-3' (35mer) | |
| (11) 5' PCR Primer (20 pmol/ μ L) | 10 μ L \times 1 本 |
| 5'-CATGGTATCGACGAGACTGAG-3' (21mer) | |
| (12) 3' PCR Primer (20 pmol/ μ L) | 10 μ L \times 1 本 |
| 5'-GACCATATGACGAGATCCGAG-3' (21mer) | |
| (13) 5' Colony PCR Primer (5 pmol/ μ L) | 960 μ L \times 1 本 |
| 5'-GTATCGACGAGACTGAGGCTG-3' (21mer) | |
| (14) 3' Colony PCR Primer (5 pmol/ μ L) | 960 μ L \times 1 本 |
| 5'-CGAGATCCGAGCTTCTTTTTT-3' (21mer) | |

【キット以外に準備する物】

試薬:

① DNA増幅用酵素

耐熱性DNA合成酵素を使用する場合、ホットスタートPCR用の酵素をご使用下さい。ニッポンジーン社のHOTGoldstar™ DNA Polymerase (コードNo. 314-80251, 310-80253) を推奨致します。HOTGoldstar™ DNA Polymeraseは、PCRサイクルに入る前に95℃で10分間の熱処理によって酵素の活性化を行い、非特異的増幅を最小限に抑えることができます。また、本酵素によって増幅された2本鎖DNA断片は、3'末端にAが突出するため、T-ベクターに直接ライゲーション可能です。

② PCR精製キットワコー (コードNo. 298-67901)

本キットを必ず併用して下さい。

3) 滅菌水

4) 70%、99.5%エタノール

5) 0.2 mol/L水酸化ナトリウム

6) クローニング用ベクター

7) *E. coli*コンピテントセル

8) ライゲーション用試薬

9) PBS (-)

10) フェノール:クロロホルム:イソamilアルコール (25:24:1)

11) クロロホルム

12) トリプシン-EDTA溶液 (接着細胞剥離用)

13) ISOGEN (コードNo. 311-02501)

器具:

1) PCRチューブ

2) マイクロ遠心チューブ

3) マイクロピペット

4) ピペットチップ

5) ボルテックスミキサー

6) PCR増幅装置 (サーマルサイクラー)

7) 高速微量遠心機 (最大 14,500 rpm, 20,200 \times g以上)

【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。

2. 試薬類

調製が必要な試薬はオートクレーブ処理を行ってください。オートクレーブができない試薬は滅菌済みの器具類、水、試薬を用いて調製し、フィルター過による滅菌を行ってください。滅菌水やTEバッファーは、DNaseとRNaseの混入していないものを使用してください。

【操作】

≪抗Ago2抗体を用いたRNAの免疫沈降≫

実験前の注意

本工程の「1. 細胞サンプルの準備」～「4. microRNA画分の精製, b) 反応後の洗浄と抗原溶出」までは、下記キットのプロトコールと同様です。

microRNA Isolation Kit, Human Ago2 (292-66701)

microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2 (292-67301)

すでに上記キットを使用されている場合は「4. microRNA画分の精製, c) RNAの精製」から実験を進めて下さい。

また、本キットは「逆転写反応」からご使用ください。

1. 細胞サンプルの準備

接着細胞の場合

- 1) 目的の細胞株を $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 細胞培養する。^{#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溶液を用いる場合には、細胞を剥がした後、血清入り培地などを加え、細胞へのダメージをできるだけ抑えるようにする。
- 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。

浮遊細胞の場合

- 1) 目的の細胞株を $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 細胞培養する。^{#1}
- 2) 培養液を4℃、 $200 \times g$ で5分間遠心分離し、培地上清を除く。
- 3) 細胞ペレットをPBS (-) 1 mLで懸濁後、1.5 mL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、培地上清を除く。
- 5) 細胞ペレットをPBS (-) 1 mLで再懸濁する。
- 6) 4℃、 $200 \times g$ で5分間遠心分離し、培地上清を除く。

注1. 1×10^7 細胞が使用細胞数の上限です。 1×10^7 細胞以上を使用するとmicroRNA回収率が低下すると共に免疫沈降によるバックグラウンドが上昇する場合があります。

2. 細胞溶解

- 1) 細胞ペレットにCell Lysis Solution 1 mLを加え、ピペティングにより細胞を懸濁後、氷上で10分間静置する。
- 2) 4℃、 $20,000 \times g$ で20分間遠心分離する。
- 3) 上清を1.5 mLマイクロ遠心チューブに移す。(細胞溶解溶液)
- 4) 洗浄済み抗体ビーズ溶液に添加する。

3. 抗体ビーズの使用前洗浄

- 1) 2.2)の遠心分離の間に、Anti Human/Mouse Ago2 Antibody Beads Solution 50 μ Lを1.5 mLマイクロ遠心チューブに移す。
- 2) 4℃、 $3,000 \times g$ で30分間遠心分離し、上清を除く。
- 3) ビーズペレットをCell Lysis Solution 1 mLで懸濁し、4℃、 $3,000 \times g$ で30分間遠心分離後、上清を除く。(洗浄済みビーズ溶液)

4. microRNA画分の精製

a) 抗原-抗体反応 (免疫沈降反応)

- 1) 細胞溶解溶液を洗浄済みビーズ溶液に添加し、ボルテックスミキサーにより混合する。
- 2) 4℃でローテーターにより転倒混和し、2時間以上抗原抗体反応を行う。
- 3) 4℃、 $3,000 \times g$ で30分間遠心分離し、上清を除く。

b) 反応後の洗浄と抗原溶出

- 1) ビーズペレットにCell Lysis Solution 1 mLを添加し、ボルテックスミキサーで懸濁する。
- 2) 4℃、 $3,000 \times g$ で30分間遠心分離し、上清を除く。
- 3) 1)~2)の操作をさらに2回繰り返す。洗浄操作は計3回行う。
- 4) ビーズペレットにElution Solution^{#2} 50 μ Lを添加し、ボルテックスミキサーで懸濁する。

- 5) 4℃、 $3,000 \times g$ で30分間遠心分離し、上清を2.0 mLマイクロ遠心チューブに移す。^{#3} (タンパク質溶液)

注2. Elution Solutionは冷蔵保存により成分が析出していますので、使用前に室温に戻し、ボルテックスミキサーで攪拌後、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。
注3. 上層 (水層) をマイクロピペッターで吸う際に、中間層を吸わないように注意してください。

c) RNAの精製

(microRNA Isolation Kit, Human/Mouse Ago2の改変プロトコール)

- 1) ISOGEN 1 mLをタンパク質溶液に添加し、ボルテックスミキサーで混合する。
- 2) クロロホルム 300 μ Lを添加し、1分間混合し、氷上で30分間静置する。
- 3) 4℃、 $18,800 \times g$ で10分間遠心分離する。
- 4) 上層 (水層) を2.0 mLマイクロ遠心チューブに移し^{#3}、Ethachinmate 1 μ L、イソプロパノール等量を添加し、ボルテックスミキサーで混合する。
- 5) 4℃、 $18,800 \times g$ で10分間遠心分離する。
- 6) 沈殿を吸わないように上清を除く。
- 7) 70%エタノール 500 μ Lを添加し、ボルテックスミキサーで混合する。
- 8) 4℃、 $18,800 \times g$ で10分間遠心分離する。
- 9) 6)~8)
- 10) 沈殿を吸わないように上清を除く。
- 11) チューブの蓋を開けて室温でペレットを風乾し、滅菌水 13 μ Lを添加し溶解する。^{#4} (Ago2 IP RNA溶液)

注4. 溶解後のサンプルは-80℃で保存できます。

◀逆転写反応▶

本キットの構成試薬はこの反応以降に使用します。

また、本工程ではPCR精製キットワコー (298-67901, 30回用) (別売) を必ず併用してください。

- 1) Ago2 IP RNA溶液 13 μ LをPCRチューブに移し、dT(20)-RT Primer 1 μ Lを添加する。
- 2) 70℃、3分間加熱処理し、氷上で2分間静置する。
- 3) PCRチューブ内で以下の反応液を氷上で緩やかに混合する。

Ago2 IP RNA 溶液	+ dT(20)-RT Primer	14 μ L
10 \times RT Buffer		2 μ L
dNTP Mixture Solution		2 μ L
RNase Inhibitor		1 μ L
Reverse Transcriptase		1 μ L
		20 μ L

- 4) 42℃、10分間インキュベートする。(逆転写反応)
- 5) 0.5 mol/L EDTA 2 μ Lを添加し、十分に混合する。(逆転写反応停止)
- 6) 0.2 mol/L NaOH (2 mol/L NaOH溶液 50 μ Lを450 μ Lの滅菌水に混合) (キット未添付) 8 μ Lを添加し、混合後、65℃、30分間インキュベートする。(RNAアルカリ加水分解反応)
- 7) 氷上に1分間静置する。
- 8) 1 mol/L Tris-HCl Solutionを20 μ L添加し混合する。
- 9) 下記のPCR精製キットワコーのプロトコールに順じて操作する。この操作によって、プライマー、反応基質、塩類が除去されます。

＜PCR精製キットワークーのプロトコール＞

PCR精製キットワークー 構成試薬：「※」

- 1) Binding Buffer[※] 130 μ Lを添加し混合する。
- 2) Spin Column[※]を2 mL Collection Tube[※]にセットする
- 3) 9)で混合した溶液全量をSpin Column[※]に添加する。
- 4) 室温で1分間静置する。
- 5) 室温、9,600 \times gで1分間遠心分離する。
- 6) Spin Column[※]を取り外し、2 mL Collection Tube[※]に回収された溶液を除く。
- 7) Spin Column[※]にWashing Buffer[※] 700 μ Lを添加する。
- 8) 5)～6)。
- 9) Spin Column[※]に残留しているWashing Bufferを完全に除去するため、室温、18,800 \times gで3分間遠心分離する。
- 10) Spin Column[※]を1.5 mL Collection Tube[※]にセットする。
- 11) Elution Buffer[※] 50 μ LをSpin Column[※]に添加する。
- 12) 室温で3分間静置する。
- 13) 室温、9,600 \times gで1分間遠心分離する。
- 14) Ethachinmate 1 μ L添加し混合する。
- 15) 10 mol/L Ammonium Acetate Solution 12 μ Lを添加し混合する。
- 16) 99.5%エタノール125 μ Lを添加し混合する
- 17) 4 $^{\circ}$ C、18,800 \times gで10分間遠心分離する。
- 18) 沈殿を吸わないように上清を除く。
- 19) 70%エタノール 500 μ Lを添加し、ボルテックスミキサーで混合する。
- 20) 4 $^{\circ}$ C、18,800 \times gで10分間遠心分離する。
- 21) 18)～20)。
- 22) 沈殿を吸わないように上清を除く。
- 23) 沈殿を乾燥後、滅菌水35.5 μ Lを添加し溶解する。(1st Strand cDNA 溶液)

＜第2鎖合成反応＞

本工程では、HOTGoldstarTM DNA Polymerase (EUROGENTEC) (別売)を使用してください。

- 1) 1st Strand cDNA 溶液 35.5 μ LをPCRチューブに移し、氷上で下記反応液を緩やかに混合する。

<u>1st Strand cDNA 溶液</u>	35.5 μ L
2nd Strand Synthesis Primer	1 μ L
10 \times PCR Reaction Buffer (EUROGENTEC)	5 μ L
2.5 mmol/L dNTP Mixture (EUROGENTEC)	4 μ L
25 mmol/L MgCl ₂ (EUROGENTEC)	4 μ L
HOTGoldstar TM DNA Polymerase (EUROGENTEC)	0.5 μ L
計	50 μ L

- 2) 以下の条件で第2鎖合成反応を行う。

95 $^{\circ}$ C	10分間
30 $^{\circ}$ C	1分間
40 $^{\circ}$ C	30秒間
50 $^{\circ}$ C	30秒間
60 $^{\circ}$ C	30秒間
72 $^{\circ}$ C	2分間
95 $^{\circ}$ C	1分間
氷上	

- 3) <PCR精製キットワークーのプロトコール> 1)～22)に順じて操作する。
- 4) 沈殿を乾燥後、滅菌水34.5 μ Lを添加し溶解する。(2nd Strand cDNA 溶液)

＜PCR増幅反応＞

- 1) 2nd Strand cDNA 溶液 34.5 μ LをPCRチューブに移し、氷上で下記反応液を緩やかに混合する。

<u>2nd Strand cDNA 溶液</u>	34.5 μ L
5' PCR Primer	1 μ L
3' PCR Primer	1 μ L
10 \times PCR Reaction Buffer (EUROGENTEC)	5 μ L
2.5 mmol/L dNTP Mixture (EUROGENTEC)	4 μ L
25 mmol/L MgCl ₂ (EUROGENTEC)	4 μ L
HOTGoldstar TM DNA Polymerase (EUROGENTEC)	0.5 μ L
計	50 μ L

- 2) 以下の条件でPCR反応を行う。

95 $^{\circ}$ C	10分間	} 24～26サイクル
↓		
95 $^{\circ}$ C	20秒間	
60 $^{\circ}$ C	10秒間	
72 $^{\circ}$ C	30秒間	
↓		
72 $^{\circ}$ C	2分間	

- 3) 氷上で1分間静置する。
- 4) <PCR精製キットワークーのプロトコール> 1)～22)に順じて操作する。
- 5) 沈殿を乾燥後、滅菌水4 μ Lを添加し溶解する。(cDNA 溶液)

＜形質転換＞

- 1) cDNA 溶液^{注5}を用いてT-Vectorにライゲーションする。
- 2) コンピテントセルに形質転換し、抗生物質を含んだ寒天培地で培養する。

注5. TAライゲーションの前に、Agilent社BioanalyzerによるDNA鎖長の分布測定、あるいは吸光度計によるDNA濃度測定を行ってください。

＜コロニーPCRによる挿入断片の確認＞

- 1) 以下の反応液を氷上で緩やかに混合する。

5' Colony PCR Primer	1 μ L
3' Colony PCR Primer	1 μ L
10 \times PCR Reaction Buffer (EUROGENTEC)	1 μ L
2.5 mmol/L dNTP Mixture (EUROGENTEC)	1 μ L
25 mmol/L MgCl ₂ (EUROGENTEC)	0.8 μ L
滅菌水	5.1 μ L
HOTGoldstar TM DNA Polymerase (EUROGENTEC)	0.1 μ L
計	10 μ L

- 2) コロニーを反応液に懸濁後、以下の条件でPCR反応を行う。

95 $^{\circ}$ C	10分間	} 30サイクル
↓		
95 $^{\circ}$ C	20秒間	
56 $^{\circ}$ C	10秒間	
72 $^{\circ}$ C	30秒間	
↓		
72 $^{\circ}$ C	2分間	

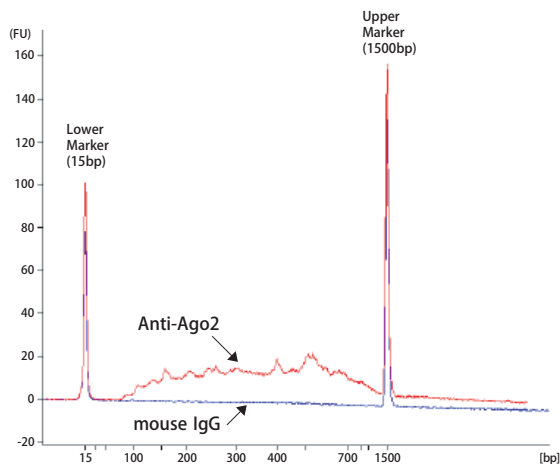
- 3) アガロース電気泳動で挿入断片の有無、鎖長を確認する。
- 4) それぞれの大腸菌クローンを培養し、プラスミドを抽出する。
- 5) シークエンサーで挿入断片の塩基配列の解読する。

〔使用例〕

増幅cDNAのキャピラリー電気泳動結果

Negative Control : mouse IgG

Test sample : Anti Human Ago2 Monoclonal Antibody



本キットにより増幅されたcDNA鎖長の分布をBioanalyzer DNA 1000 Kitを用いてキャピラリー電気泳動で検出した。

HeLa細胞（ 1×10^7 個）から抗ヒトAgo2抗体とマウスIgGを用いて得られた免疫沈降RNAをスタート試料として、本キットでcDNAの合成を行った。Ago2免疫沈降RNA特異的に約100～1000 bpのcDNAが合成できることを確認した。

〔参考文献〕

Hayashida, Y., *et al.* : A useful approach to total analysis of RISC-associated RNA., *BMC Research Notes*, 2, 169 (2009)

〔包装〕

10回用

〔使用期限〕

ラベルに記載

〔保存〕

本キットは-20℃で保存してください。

〔特許について〕

Target mRNA Cloning Kit *Wako*は特許出願中です。

〔関連製品〕

コード No.	品名	容量
298-67901	PCR Purification Kit <i>Wako</i>	30回用
292-66701	microRNA Isolation Kit, Human Ago2	10回用
292-67301	microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2	10回用
310-80253	HOTGoldstar™ DNA Polymerase	50 U
314-80251		500 U
290-66501	microRNA Cloning Kit <i>Wako</i>	8回用
298-65103	Single Strand DNA Ligase, Thermostable, recombinant, Solution	200 units
292-65101		500 units
011-22033	Anti Human Ago2, Monoclonal Antibody	50 μ L
015-22031		100 μ L
014-22023	Anti Mouse Ago2, Monoclonal Antibody	50 μ L
018-22021		100 μ L
311-90151	Phenol : Chloroform : Isoamyl Alcohol	250 mL
312-01791	Ethachinmate	0.2 mL
052-07221	Ethanol (99.5%)	100 mL
054-07225		500 mL
316-90101	Distilled Water, Deionized, Sterile	100 mL
038-02606	Chloroform	500 mL
202-19631	0.05 w/v% Trypsin-0.53 mmol/L EDTA · 4Na Solution with Phenol Red	100 mL
209-19641	0.25 w/v% Trypsin-1mmol/L EDTA · 4Na Solution with Phenol Red	100 mL
311-03961	CLEAR STAIN Ag	20 枚用
194-05631	2 mol/L Sodium Hydroxide Solution	100 mL

 宝柏・中国

 和光純薬工業株式会社



北京 Tel: 010 85804838
 上海 Tel: 021 62884751
 广州 Tel: 020 87326381
 香港 Tel: 852 27999019
 Email: info@boppard.cn