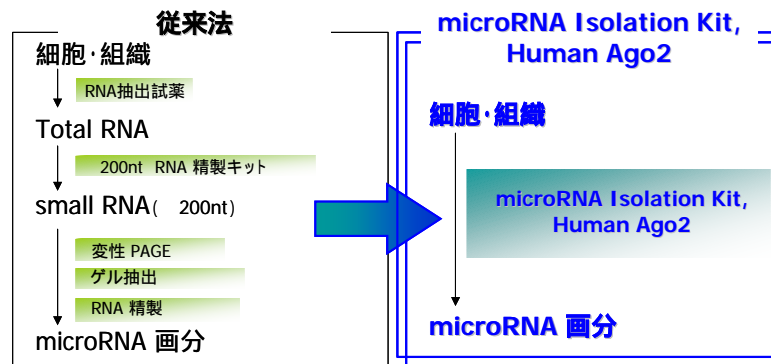


microRNA Isolation Kit, Human Ago2 Q&A

Q.1 従来法からの改善点は？

A.1 従来法では実験工程が5工程(Total RNA 抽出 200nt 以下 RNA 回収・濃縮 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 ゲル切出し 抽出)であったのに対し、本キットでは免疫沈降法により、簡便に microRNA が精製できます。本キットは、高品質の抗ヒト Ago2 モノクローナル抗体を利用した免疫沈降法により、microRNA-Ago2 複合体を回収し、microRNA を特異的に精製できるキットです。

従来法と本キットの操作法比較



優位性

	従来法	microRNA Isolation Kit, Human Ago2
rRNA分解物の混入率	高	極低
tRNA分解物の混入率	高	極低
操作時間	1日	0.5日
microRNAクローニング効率	10%~20%	90%*

*microRNA Cloning Kit Wako 使用時

Q.2 ヒト Ago2 抗体は単品販売していますか？

A.2 販売しています。

Anti Human AGO2, Monoclonal Antibody(016-20861, 50 µL, 30,000 円)

Q.3 抗体を固相化しているビーズは単品販売していますか？

A.3 販売しておりません。

Q.4 ヒト以外の生物では使用できますか？

A.4 使用できません。ヒトの Ago2 特異的なキットです。使用している抗体はヒト由来以外の Ago2 とは交差しないことが確認されています。

Q.5 マウス Ago2 抗体は今後販売しますか？

A.5 2008 年 5 月に販売いたします。

Q.6 スタート試料に使用する細胞数は？

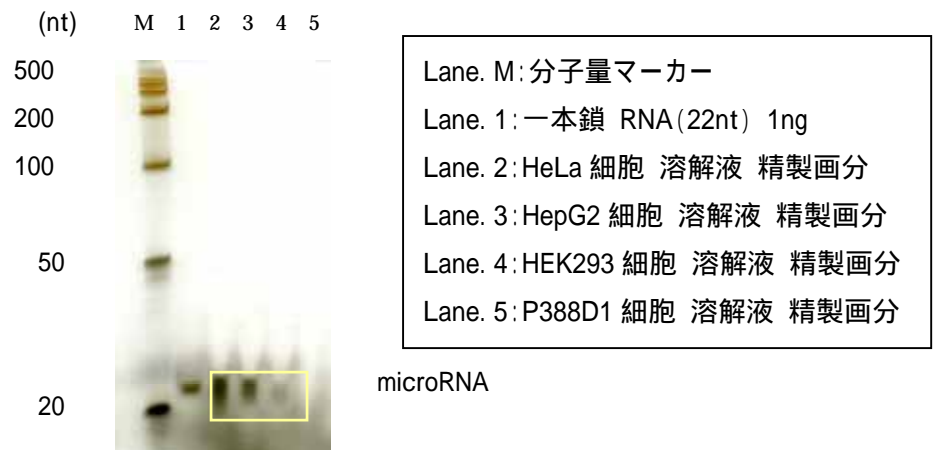
A.6 当社におけるクローニング実績から換算すると、クローニングに必要な細胞数は $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ です。 1×10^7 が上限です。これ以上の細胞数を使用すると、バックグラウンドが上がることを確認しています。

Q.7 1 回の免疫沈降で精製される microRNA の量はどのくらいですか？

A.7 下記条件で 1ng ~ 十数 ng 以上が精製可能です。

microRNA Isolation Kit, Human Ago2 を用いて、ヒト培養細胞株 4 種類 (HeLa, HepG2, HEK293, THP-1)、およびマウス培養細胞株 (P388D1) から精製した microRNA 画分を Urea-PAGE によって検出しました。その結果、ヒト培養細胞から特異的に microRNA が精製できた。使用細胞数は 5×10^6 相当です。

銀染色には、CLEAR STAIN Ag(311-03961, 20 枚用, 35,000 円)を使用しています。



本キットで免疫沈降後、 $10 \mu\text{L}$ に調整した最終溶液を $5 \mu\text{L}$ アプライした。Lane 1 の一本鎖 RNA (22nt) は 1.0ng ですので、Lane 2 の microRNA はおよそ数 ng です。

Q.8 microRNA Cloning Kit *Wako* との併用時のクローニング効率は？

A.8 HeLa細胞以外のヒト細胞株3種類で検討した結果、いずれも90%以上のクローニング実績があります。

Q.9 組織からの精製は可能ですか？

A.9 可能です。本キットを用いて、ヒト組織(Liver, Testis)から精製実績があります。スタートの組織使用量は50mgで、最終の細胞溶解液2mLを調製します。そのうち1mLを免疫沈降反応に使用し、最終のRNA画分量を10 μ Lに調製した。そのうちの5 μ LをUrea-PAGEに供したところ、~10ng前後のmicroRNA画分が抽出できます。

Q.10 microRNA のマイクロアレイへの使用は可能ですか？

A.10 可能です。LC Science社のmicroRNAマイクロアレイのサンプルとして使用した実績があります。

LCサイエンス社のマイクロアレイサービスは、株式会社アライアンステクノロジーで受託しております。アレイ解析に必要なサンプル量は、およそ100~200ngを推奨いたします。

本キットを使用してHeLa細胞(5×10^7 cells)からRNA精製を5回行い、それらのサンプルを1つのチューブにプールしたものを1解析に使用した実績があります。

Q.11 免疫沈降の溶出にはどのような溶液を用いていますか？

A.11 タンパク質変性剤を使用しています。

Q.12 ターゲットとなる mRNA の回収は可能ですか？

A.12 可能です。

Q.13 精製した microRNA 画分を使用して qPCR による検出は可能ですか？

A.12 可能です。ABI社 TaqMan[®] MicroRNA Assayキットが使用できます。

本キットを使用してHeLa細胞(1×10^7 cells)からRNA精製を行い、最終サンプル量を10 μ Lに調製します。このサンプルから1 μ L採取し、1/1,000希釈した溶液を1 μ L使用し、リアルタイムqPCRを行います。