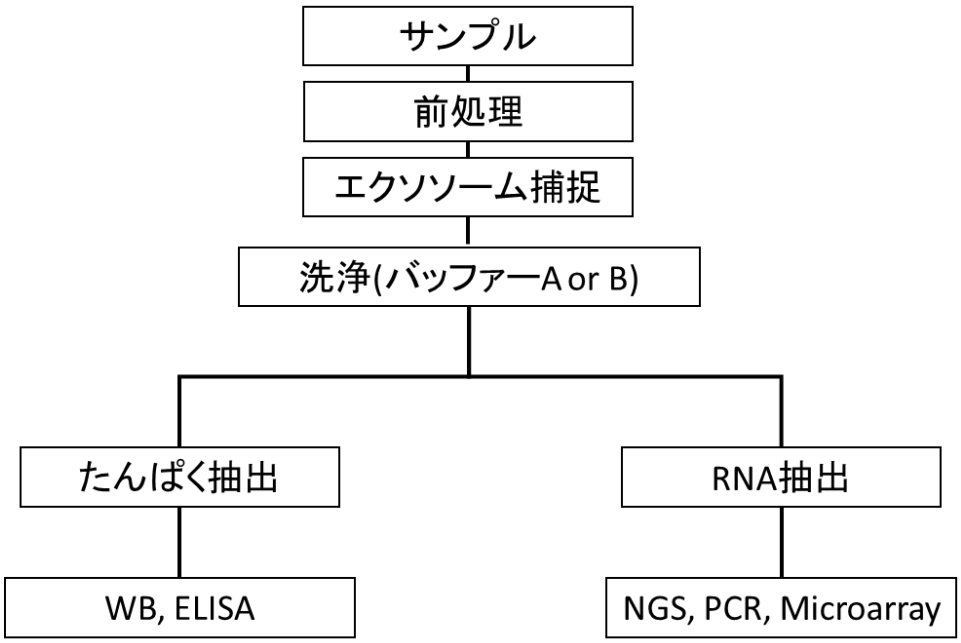
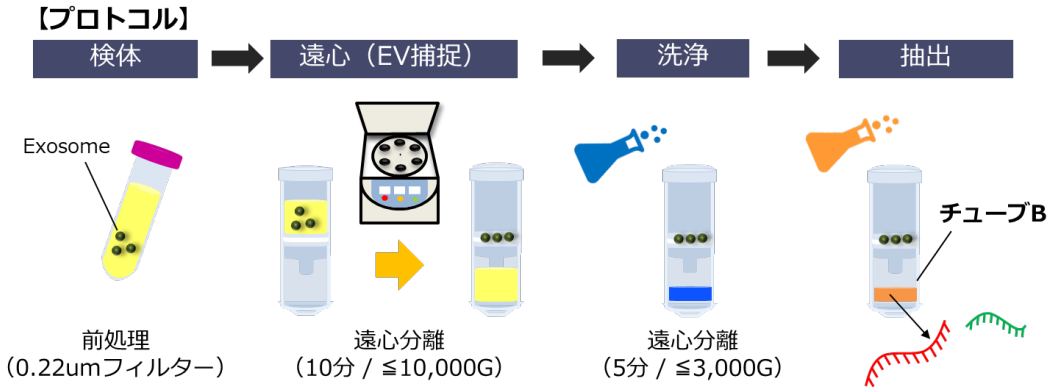
Ver4.3
2022.11

EVAGLAX™ の使用プロトコル

（適用品種：SC-B-730-00-00）

1. EVAGLAX™ 使用方法の概要





2. キット内容

物品	20 個入	100 個入
スピンカラム	20 個	100 個
コレクションチューブ(1.5mL)	20 個	100 個
洗浄バッファーA	10mL	50mL
洗浄バッファーB	10mL	50mL

3. 本キット以外に必要な試薬等（支給外）

分類	通称	物品名	メーカー	カタログ番号
共通	0.2μm プレフィルター	ﾐﾆｻﾞﾙﾄｼﾘﾝｼﾞﾌｨﾙﾀｰ 0.2μm	Sartorius	S6534FMOSK
共通	1mL シリンジ	ﾃﾙﾓｼﾘﾝｼﾞ(R) 1mL ﾂﾍﾞﾙｸﾘﾝ用 ｽﾘｯﾌﾟﾁｯﾌﾟ	TERUMO	1-4908-01
共通	低タンパクチューブ 1.5mL	ﾌﾟﾛｷｰﾌﾟ ﾀﾝﾊﾟｸ質低吸着ﾁｭｰﾌﾞ 1.5ml	ワトソン	PK-15C-500N
共通	低タンパクチューブ 2.0mL	ﾌﾟﾛｷｰﾌﾟ ﾀﾝﾊﾟｸ質低吸着ﾁｭｰﾌﾞ 2.0ml	ワトソン	PK-20C-500
RNA 用	miRNeasy	miRNeasy Micro Kit	QIAGEN	217084
タンパク用	M-PER	Mammalian Protein Extraction Reagent	Thermo Fisher Scientific	78501

4. 保存

キットは、2-10℃の冷蔵環境にて保管願います。

5. 使用用途

本製品は研究用です。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意願います。

6. エクソソーム精製手順

【サンプル準備工程】

・検体を凍結保存させていた場合、4℃にて融解していることを確認する。
・0.2μm プレフィルターをかける。
※検体にデブリが多い場合や粘性が高い場合は、先に 10,000G/30min で粗遠心し、上清をプレフィルターにかけることを推奨する。粗遠心の際、上清取得後に 150μL を残す分量にすることを推奨する。

【エクソソーム捕捉工程】

・検体 100-500μL をスピンカラムにインプットする。
・6,000G/10min（足りない場合は 10,000G/3min）で遠心する。
※詰まりが気になる場合は、遠心機を 25℃とする。
・フロースルーが入ったチューブを捨てて、新しい低タンパクチューブ 1.5mL をセットする。
（※検体の夾雑物が多い場合、下記の操作を選択し、追加する。）
（検体の夾雑物がやや多い場合）
・洗浄バッファーA、100μL をスピンカラムにインプットし、3,000G/5min で遠心する。
・フロースルーが入ったチューブを捨てて、新しい低タンパクチューブ 2.0mL をセットする。
（検体の夾雑物が多い場合）
・洗浄バッファーB、300μL をスピンカラムにインプットし、3,000G/5min で遠心する。
・フロースルーが入ったチューブを捨てて、新しい低タンパクチューブ 2.0mL をセットする。

7. エクソソーム溶出手順

【タンパク質抽出工程】

・M-PER 100uL をスピンカラムにインプットし、500G/1min で遠心する。
※フロースルーを捨てない。低タンパクチューブ 2.0mL は変えずにそのまま使う。
・室温で 5 分保持する。
・6,000G/5min で遠心する。（足りない場合は 10,000G/3min）
・得られたフロースルーがサンプル。

【RNA 抽出工程】

・キアゾール 500uL をスピンカラムにインプットし、500G/1min で遠心する。

※フロースルーを捨てない。低タンパクチューブ 2.0mL は変えずにそのまま使う。

・室温で 5 分保持する。

・6,000G/5min で遠心する。（足りない場合は 10,000G/3min）

・得られたフロースルーを新しい低タンパクチューブ 1.5mL に移す。スピンカラムは不要。

・クロロホルムを 140uL 添加し、15 秒ボルテックス撹拌し、室温で 3min 保持。

・12,000G で 4℃で 15min 遠心すると、3 層に分離する。一番上の透明な層が RNA を含んだ水の層なので、下の白い層や赤い層を吸わないように透明な層だけを 280uL 吸出し、別の 1.5mL チューブに移す。

・1.5 倍量の 100%EtOH（この場合は 420uL）を加えて、ピペッティング撹拌する。

----------以下は miRNeasy のプロトコル通り（数字は修正）----------

・RNeasy MinElute spin column に 700uL（足りなければあるだけ）のサンプルを移して、ゆっくりふたを閉め、8,000G で 15 秒間遠心する。出てきたものは捨てて良い。

（※NGS 用に必要であれば、ここで DNase 処理を行う。RNase-Free DNase Set（QIAGEN）を使用する。

350uL Buffer RWT を添加⇒8,000G,15min

⇒DNase を添加し 10min 静置

⇒350uL Buffer RWT を添加⇒8,000G,15min

なお、この操作を入れる場合は、直後の BufferRWT 700uL での Wash は不要となる。）

・700uL の Buffer RWT をスピンカラムに加え、ゆっくりふたを閉め、8,000G で 15 秒間遠心する。出てきたものは捨てて良い。

・500uL の Buffer RPE をスピンカラムに加え、ゆっくりふたを閉め、8,000G で 15 秒間遠心する。出てきたものは捨てて良い。

・500uL の 80% EtOH をスピンカラムに加え、ゆっくりふたを閉め、8,000G で 2min 遠心する。出てきたものと一緒にコレクションチューブは捨てて良い。

・RNeasy MinElute spin column を新しいコレクションチューブ（キット内の 2mL）にさす。カラムの蓋を開けた状態で、フルスピードで 5min 遠心する。乾燥させるため。

・RNeasy MinElute spin column を新しいコレクションチューブ（キット内の 1.5mL）にさす。14uL の RNase-free water（小さい容器）をスピンカラムに加え（壁面に付かないように！ピペット先端をフィルターにつけない！）、ゆっくりふたを閉め、フルスピード（12,000G 以上）で 1min 遠心する。RNA を抽出するため。

（※出てきた液がサンプル）

Document Revision History

Date	Ver	Changes
June 2020	1.3	Create new
September 2020	1.4	Updated text
October 2020	1.5	Updated text
October 2020	1.6	Updated text
February 2021	1.7	Updated text
March 2021	1.8	Updated text
June 2021	2.0	Updated text (開発カラム用プロトコル)
July 2021	3.0	Updated text (開発カラム用プロトコル バッファーA,B 記載)
January 2022	4.0	Updated text EVAGLAX™
February 2022	4.1	Updated Fig.
March 2022	4.2	Updated text

AGC 株式会社

事業開拓部インキュベーション G

〒100-8405 東京都千代田区丸の内 1-5-1

E-mail. agc-ml.info_spin-column@agc.com