

FavorPrep™ Blood/Cultured Cell Total RNA Mini Kit

Cat: FABRK 000-Mini(4 回分) / FABRK 001(50 回分) / FABRK 001-1(100 回分) / FABRK 001-2(300 回分)

本製品は研究用です

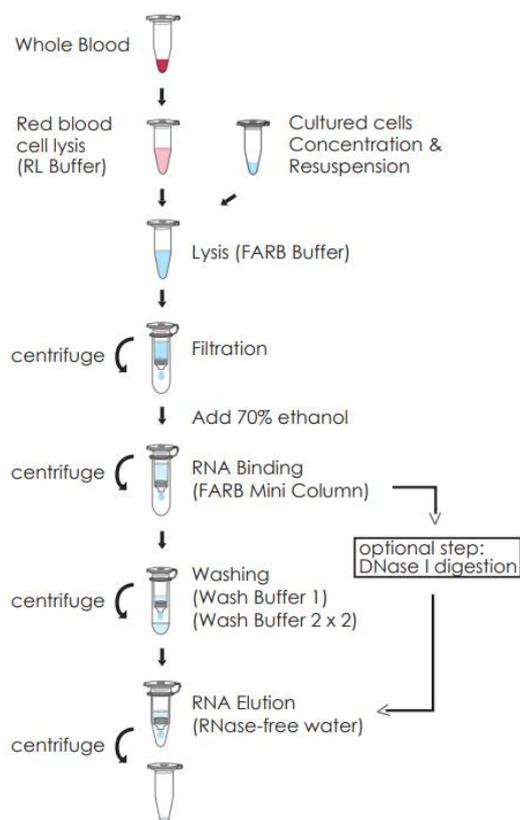
v 202401

🌈 キットの内容

	FABRK 000-Mini (4 preps_sample)	FABRK 001 (50 preps)	FABRK 001-1 (100 preps)	FABRK 001-2 (300 preps)
RL Buffer	15 ml	120 ml	240 ml	240 ml × 3
FARB Buffer	3 ml	25 ml	45 ml	130 ml
Wash Buffer 1	3 ml	30 ml	60 ml	170 ml
Wash Buffer 2 (Concentrate)*	1.5 ml	15 ml	35 ml	50 ml × 2
RNase-free Water	0.5 ml	6 ml	6 ml	8 ml × 2
Filter Column	4 pcs	50 pcs	100 pcs	300 pcs
FARB Mini Column	4 pcs	50 pcs	100 pcs	300 pcs
Collection Tube	8 pcs	100 pcs	200 pcs	600 pcs
Elution Tube	4 pcs	50 pcs	100 pcs	300 pcs
*添加する 96-100%エタノール量				
Wash Buffer 2 (Concentrate)	6 ml	60 ml	140 ml	200 ml

🌈 基本情報

構成	シリカメンブレン法 (ミニスピナラム)
操作時間	30~60 分
結合量	≤100 μg total RNA/column
操作方法	遠心法 もしくは 吸引法
溶出量	≥30 μl



🌈 サンプル量と収量

サンプル	推奨されるサンプル量		収量 (μg)
ヒト血液 (最大 300 μl)	最大 300 μl		1
動物細胞 (最大 5 × 10 ⁶)	NIH/3T3	1 × 10 ⁶ cells	10
	HeLa		15
	COS-7		30
	LMH		12
動物組織 (Mouse/rat) (最大 30 mg)	胚	10 mg	25
	心臓		10
	脳		10
	腎臓		30
	肝臓		50
	脾臓		35
	肺 胸線		15 45
細菌	E. coli	1 × 10 ⁹ cells	60
	B. subtilis		40
酵母 (最大 5 × 10 ⁷)	S. cerevisiae	1 × 10 ⁷ cells	25

🌈 重要事項

1. 操作に関連するものは、RNase-free であることを確認してください。
2. 作業はゴム手袋、白衣を着用して行ってください。
3. **警告: β-メルカプトエタノールは人体に有害です。操作時にはドラフトチャンバーをご使用ください。**
4. Wash Buffer 2 は開封時に RNase-free エタノール(96-100%)を加えてください。
5. 遠心分離は、最大速度 (~18,000 × g) で行ってください。
6. <ヒト血液>のオプションの操作を行う場合は、RNase-free DNase I solution (1M NaCl, 10mM MnCl₂, 20mM Tris-HCl, pH 7.0 at 25°C)を準備し、最終的な DNase I の濃度が 0.5 U/μl になるように調整してください。

操作 ※操作前に「重要事項」をよくお読みください。

＜ヒト血液＞

必要なもの: β -メルカプトエタノール

70%エタノール (RNase-free)

1. 赤血球の溶解

1-1. 200~300 μ l の抗凝血剤で処理した血液を 1.5 ml もしくは 2.0 ml のチューブ（お客様でご用意ください）に入れます。サンプルが 200 μ l より多い場合は 2.0 ml のチューブを使用してください。

メモ: サンプルが多すぎると、溶解が不完全になり RNA の収量・精製度が低下につながります。

1-2. サンプルの 5 倍量の RL Buffer を加え、転倒混和します。

1-3. 氷上で 10 分間インキュベートします。インキュベーション中に、2 回ボルテックスをします。

1-4. 2,800 \times g で 1 分間遠心分離し、ペレットを形成させて上清を完全に除去します。

1-5. 600 μ l の RL Buffer をペレットに加え、ボルテックスで再懸濁します。

1-6. 再度 2,800 \times g で 1 分間遠心分離し、ペレットを形成させて上清を完全に除去します。

2. 350 μ l の FARB Buffer と 3.5 μ l の β -メルカプトエタノールをペレットに加えます。1 分間ボルテックスし、細胞を完全に再懸濁します。

メモ: ボルテックス後にも細胞の塊が見受けられる場合は、ピペティングで壊してください。

3. Filter column を Collection Tube に取り付け、サンプル溶液を加えます。その後、最大速度（ \sim 18,000 \times g）で 2 分間遠心分離します。

4. 上清を新しいチューブ（お客様でご用意ください）に移し、サンプルの体積を量ってください。

メモ: ペレットの断片を混入させないようにしてください。

5. サンプルと同量の 70%エタノールを加えて十分にボルテックスします。

6. FARB Mini Column を Collection Tube へ取り付け、エタノールを加えたサンプル（沈殿物を含む）を FARB Mini Column へ加えます。最大速度（ \sim 18,000 \times g）で 1 分間遠心分離し、ろ液を捨て FARB Mini Column を Collection Tube に戻します。

7. ＜オプション＞ゲノム DNA を除去する場合

A. 250 μ l の Wash Buffer 1 を FARB Mini Column へ加えます。最大速度（ \sim 18,000 \times g）で 1 分間遠心分離し、ろ液を捨て FARB Mini Column は Collection Tube に戻します。

B. 60 μ l の RNase-free DNase I solution (0.5 U/ μ l, お客様で調整してください) を FARB Mini Column の膜中央へ加え、15 分間静置します。

C. 250 μ l の Wash Buffer 1 を FARB Mini Column へ加えます。最大速度（ \sim 18,000 \times g）で 1 分間遠心分離し、ろ液を捨て FARB Mini Column は Collection Tube に戻します。

D. ステップ 9 へ進みます。

8. 500 μ l の Wash Buffer 1 を FARB Mini Column へ加えます。最大速度 ($\sim 18,000 \times g$) で 1 分間遠心分離し、ろ液を捨て FARB Mini Column は Collection Tube に戻します。
9. 750 μ l の Wash buffer 2 を FARB Mini Column へ加えます。最大速度 ($\sim 18,000 \times g$) で 1 分間遠心分離し、ろ液を捨て FARB Mini Column は Collection Tube に戻します。
メモ: Wash Buffer 2 にエタノールが添加されていることを確認してください。
10. ステップ 9 を繰り返し、もう一度洗浄してください。
11. さらに最大速度 ($\sim 18,000 \times g$) で 3 分間遠心分離し、FARB Mini Column を乾燥させます。
重要ステップ! : この操作は酵素処理を阻害する物質を取り除くために重要です。
12. FARB Mini Column を Elution Tube (キットに付属) へ取り付けます。
13. 40~100 μ l の RNase-free ddH₂O を FARB Mini Column の膜中央に加え、1 分間静置します。
重要ステップ! : 効率よく溶出させるため、RNase-free ddH₂O を完全に吸着させてください。
* 40 μ l より少量で溶出した場合、収量が低下する恐れがあります。
14. 最大速度 ($\sim 18,000 \times g$) で 1 分間遠心分離し、RNA を溶出します。
15. 精製した RNA は -70°C で保管します。

<動物細胞>

必要なもの: β -メルカプトエタノール

70%エタノール (RNase-free)

1. 4°C 、 $300 \times g$ で 5 分間遠心分離し、 $1 \sim 5 \times 10^6$ cells をペレット化します。その後上清を取り除きます。
メモ: サンプルが多すぎると、溶解が不完全になり RNA の収量・精製度の低下につながります。
2. 350 μ l の FARB Buffer と 3.5 μ l の β -メルカプトエタノールを加えます。1 分間ボルテックスし、細胞を完全に再懸濁します。
メモ: ボルテックス後にも細胞の塊が見受けられる場合は、ピペティングで壊してください。
3. <ヒト血液>のステップ 3 へ進みます。

<動物組織>

必要なもの: 液体窒素、乳鉢、乳棒

破砕機 もしくは 20G の注射針を装着したシリンジ

β -メルカプトエタノール

70%エタノール (RNase-free)

1. 最大 30mg の組織サンプルを液体窒素と乳鉢、乳棒で粉々に粉砕し、新しいチューブ（お客様でご用意ください）に移します。

メモ: 計量や粉砕時にサンプルが溶けないようにしてください。

2. 350 μ l の FARB Buffer と 3.5 μ l の β -メルカプトエタノールを加えます。サンプルを破砕機もしくは 20 G の注射針を装着したシリンジに 10 回通して粉砕し、室温で 5 分間インキュベートします。

重要ステップ!: 硬いサンプルから RNA を抽出する場合、適切な破砕機（回転式ホモジナイザーなど）を使用することを推奨します。

3. <ヒト血液>のステップ 3 へ進みます。

<細菌>

必要なもの: β -メルカプトエタノール

70%エタノール (RNase-free)

ウォーターバス もしくは ヒーティングブロック (37°C)

2 ml スクリュー遠心チューブ

Lysozyme reaction solution (10 mg/ml lysozyme; 20mM Tris-HCl, pH 8.0; 2mM EDTA; 1.2% Triton)

酸処理済みガラスビーズ (500~700 μ m)

1. 最大 1×10^9 cell の培養液を 2ml のスクリュー遠心チューブ（お客様でご用意ください）へ移します。

メモ: サンプル量から推測して total RNA の収量がカラム結合量 (100 μ g) を超えないようにしてください。

超過する場合、溶解が不完全になり RNA の収量・精製度の低下につながります。

RNA 量が推測できない種類のサンプルの場合には、サンプル量を $\leq 5 \times 10^8$ にしてください。

2. 4°C、最大速度 (~18,000 \times g) で 2 分間遠心分離し、上清を捨てます。
3. 100 μ l の Lysozyme reaction solution を加えます。ピペティングでペレットを再懸濁し、37°C で 10 分間インキュベートします。
4. 350 μ l の FARB Buffer と 3.5 μ l の β -メルカプトエタノールを加えます。
5. 250 mg の酸処理済みガラスビーズ (500~700 μ m) を加えます。5 分間ボルテックスし、細胞を破砕します。

6. 最大速度（～18,000×g）で2分間遠心分離します。上清を新しいチューブ（お客様でご用意ください）に移し、上清の体積を量ります。
メモ：ペレットの断片を混入させないようにしてください。
7. <ヒト血液>のステップ5へ進みます。

<酵母>

必要なもの：β-メルカプトエタノール

70%エタノール（RNase-free）

A) 酵素処理による破碎：Lyticase もしくは zymolyase

Sorbitol Buffer（1M sorbitol; 100mM EDTA; 0.1% β-メルカプトエタノール）

ウォーターバス もしくは ヒーティングブロック（30℃）

B) 化学的手法による破碎：2 ml のスクリュウ遠心チューブ

酸処理済みガラスビーズ（500～700 μm）

1. 4℃、5,000×g で10分間遠心分離し、最大 5×10^7 の酵母を収集します。上清は捨てます。
2. A) 酵素処理による破碎
 - A-1. ペレットを 600 μl の Sorbitol Buffer で再懸濁し、200 U の Lyticase もしくは zymolyase を加えて 30℃で 30 分間インキュベートします。
メモ：Sorbitol Buffer は使用直前に調製してください。
 - A-2. 300×g で 5 分間遠心分離し、上清を捨てます。
 - A-3. 350 μl の FARB Buffer と 3.5 μl の β-メルカプトエタノールを加えます。1 分間ボルテックスし、スフェロプラストを破碎します。室温で 5 分間インキュベートします。
- B) 化学的手法による破碎
 - B-1. 350 μl の FARB Buffer と 3.5 μl の β-メルカプトエタノールを加え、ボルテックスで細胞を完全に懸濁します。
 - B-2. サンプル溶液を 2 ml のスクリュウ遠心チューブに移し、250 mg の酸処理済みガラスビーズ（500～700 μm）を加えます。15 分間ボルテックスし、細胞を破碎します。
3. <ヒト血液>のステップ5へ進みます。

<パラフィン包埋組織>

必要なもの:キシレン、エタノール (96-100%)

液体窒素、乳鉢、乳棒

破碎機 もしくは 20G の注射針を装着したシリンジ

β -メルカプトエタノール

70%エタノール (RNase-free)

1. 最大 15mg のパラフィン包埋組織をチューブ (お客様ご自身でご用意ください) に移します。
* サンプル量をなるべく減らすよう、余分なパラフィンを除去してください。
2. 0.5 ml のキシレンを加えて十分に混ぜ、室温で 10 分間インキュベートします。
3. 最大速度 ($\sim 18,000 \times g$) で 3 分間遠心分離し、ピペットで上清を捨てます。
4. 0.25 ml のキシレンを加えて十分に混ぜ、室温で 3 分間インキュベートします。
5. 最大速度 ($\sim 18,000 \times g$) で 3 分間遠心分離し、ピペットで上清を捨てます。
6. ステップ 4 と 5 を繰り返します。
7. 0.3 ml のエタノール (96-100%) を加えて脱パラフィン化させます。ボルテックスでよく混ぜ、室温で 3 分間インキュベートします。
8. 最大速度 ($\sim 18,000 \times g$) で 3 分間遠心分離し、ピペットで上清を捨てます。
9. ステップ 7 と 8 を繰り返します。
10. <動物組織>のステップ 1 へ進み、サンプルを破碎してください。その後<ヒト血液>のステップ 3 へ進みます。

<RNA クリーンアップ>

必要なもの:エタノール (96-100%)

1. 100 μ l の RNA サンプルをチューブ (お客様でご用意ください) に移します。
* サンプルの RNA が 100 μ l 未満の場合は、RNase-free water を加えて 100 μ l にしてください。
2. 300 μ l の FARB Buffer と 300 μ l のエタノールを加え、ボルテックスでよく混ぜます。
3. FARB Mini Column を Collection Tube へ取り付け、エタノールを加えたサンプルを FARB Mini Column に移します。最大速度 ($\sim 18,000 \times g$) で 1 分間遠心分離し、ろ液を捨てて FARB Mini Column を Collection Tube に戻します。
4. <ヒト血液>のステップ 8 へ進みます。