



血液・培養細胞からのトータル RNA 抽出 Maxi キット

Blood/Cultured Cell Total RNA Extraction Maxi Kit

目次

基本データ	2
キットの内容	2
重要事項	3
操作	3

* 本製品は研究用です *



本キットは動物組織、細胞からトータルRNAを効率よく精製します。また、細菌や酵母からのトータル RNA 精製のために最適化されたプロトコールも用意しています。まず、カオトロピック塩で細胞を溶解し、RNA をシリカ膜へ結合させます。エタノールを含む Wash buffer で洗浄後、RNase-free ddH₂O で溶出します。所要時間は約 60 分です。抽出した RNA は直接 RT-PCR、ノーザンブロットイング、cDNA ライブラリ作成などアプリケーションへ使用できます。

🌈 サンプル量と収量

サンプル	所要時間
3-10 ml ヒト全血	60 分
5 × 10 ¹⁰ 培養細胞	
5 × 10 ⁹ 酵母	
5 × 10 ⁸ 動物細胞	

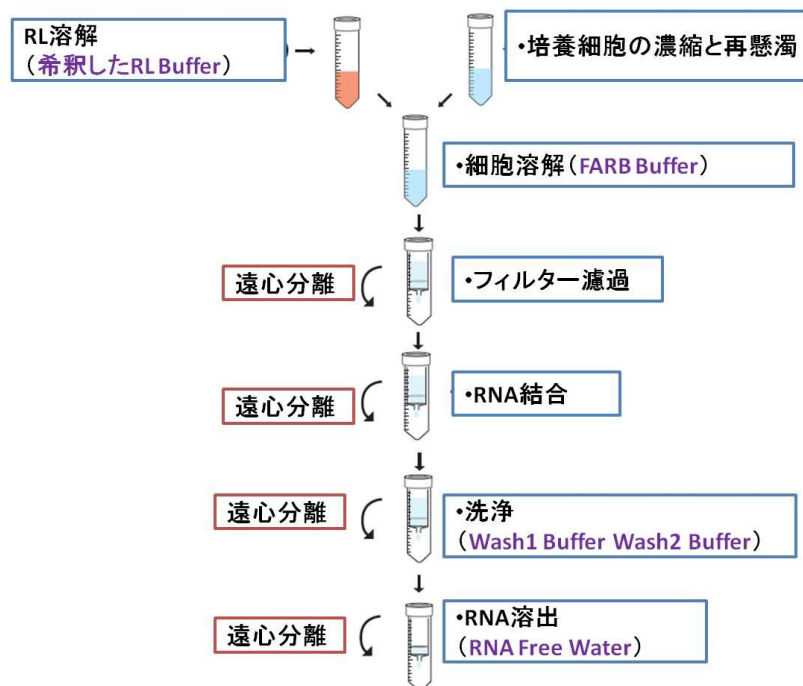
🌈 キットの内容

	FABRK 003 (10 preps)	FATRK 003-1 (24 preps)
10 × RL Buffer	100 ml	100 ml × 2
FARB Buffer	150 ml	180 ml × 2
Wash Buffer 1	135 ml	160 ml × 2
Wash Buffer 2 (concentrated)	27 ml × 2 エタノール(96-100%)を各ボトルへ 108ml 加えてください。	27 ml × 5 エタノール(96-100%)を各ボトルへ 108ml 加えてください。
RNase-free ddH ₂ O	12 ml	30 ml
Filter Column	10 pcs	24 pcs
FARB Maxi Column	10 pcs	24 pcs
Elution Tube	10 pcs	24 pcs

🚩 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. 使用前に、FARB Buffer を RNA フリーのチューブに取り、 β メルカプトエタノール(本キットには含まれておりません。)を加えてください。1ml の FARB Buffer に β メルカプトエタノール(β -ME)を 10 μ l 加えてください。
4. Wash Buffer2 に必要量の RNase-free エタノール(96-100%)を加えてください。
5. オプションステップ 13 の操作を行う場合は、RNase-free DNase 1 を reaction buffer (150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl, pH7.5) で 2KU/ml に調整してください(キットには含まれません)。
6. 遠心分離は、適切なローターバケットを使用し 3,500-5,000rpm(3,000-5,000 × g)で行ってください。

🚩 操作



<ヒトの血液用>

1. ヒトの血液を抗凝固加工されたチューブで回収します。
2. 3-10ml の血液を 15ml 又は 50ml チューブ(お客様でご用意ください)へ移します。
3. サンプルの 5 倍量の希釈した RL Buffer を加え、転倒混和します。
* RL Buffer は使用前に滅菌水で 10 倍希釈してください。
* 5ml の血液サンプルを処理する場合は、25mlの希釈した RL Buffer を加えてください。
4. 5 分間室温でインキュベートし、インキュベーションの中、2 回程度ボルテックスでサンプルを混ぜます。
5. 5 分間、500 × g で遠心分離し、完全に上清を捨てます。
6. 2 倍量の希釈した RL Buffer でペレットを再懸濁し、ボルテックスします。
7. 5 分間、500 × g で遠心分離し、完全に上清を捨てます。
8. 12.5ml の FARB Buffer (事前にβ -ME を加えてください)をペレットに加え、ボルテックスします。室温で 3 分間インキュベートします。
* 重要事項3. に従い FARB Buffer へβ -ME を加えてください。
* サンプル中の全ての RNA を遊離する為に、サンプルを完全に溶解してください。
9. Filter Maxi Column を 50ml チューブ(お客様でご用意ください。)へ取り付けます。サンプル溶液を Filter Maxi column へ加え、5 分間遠心分離します。
10. Collection tube 中の上清を新しい 50ml チューブ(お客様でご用意ください)に移します。次のステップでサンプル量と同量のエタノールを加えるため、サンプル量を調節してください。
* ペレットの断片を混入させないようにしてください。
11. サンプルと同量の 70%エタノールを加えてボルテックスで混和します。
12. FARB Maxi Column を 50ml チューブ(お客様でご用意ください。)へ取り付けます。14ml のエタノールを加えたサンプル全て(沈殿物を含む)を FARB Maxi Column へアプライし、3,000-5,000rpm で 5 分間遠心分離し、ろ液を捨てます。
* サンプルが 14ml 以上ある場合は、このステップを繰り返し行ってください。

13. (オプション)ゲノム DNA を除去するためのステップ(必要ない場合はステップ 14 へ進んでください。)
- A- 7ml の Wash Buffer 1 を FARB Maxi Column へ加え、3,000–5,000rpm で 2 分間 遠心分離し、ろ液を捨てます。FARB Maxi Column は 50ml チューブへ戻してください。
 - B- 1ml の RNase-free DNase1 solution (2U/μ l: お客様で調整してください) を FARB Maxi Column へ加え、10 分間静置します。
 - C- 7ml の Wash Buffer 1 を FARB Maxi Column へ加え、3,000–5,000rpm で 2 分間 遠心分離し、ろ液を捨てます。FARB Maxi Column は 50ml チューブへ戻してください。
 - D- ステップ 15 へ進みます。
14. 12.5ml の Wash Buffer 1 を FARB Maxi Column へ加え、3,000–5,000rpm で 2 分間遠心分離し、ろ液を捨てます。FARB Maxi Column は 50ml チューブへ戻してください。
15. 12.5ml の Wash buffer 2 (事前にエタノールを加えてください) を FARB Maxi Column へ加え、3,000–5,000rpm で 2 分間遠心分離し、ろ液を捨てます。FARB Maxi Column は 50ml チューブへ戻してください。*この操作を 2 回繰り返してください。*
16. さらに 10 分間、 $>4,000 \times g$ で遠心分離し、FARB Maxi Column を乾燥させます。
*この操作は酵素処理を阻害する物質を取り除くための重要なステップです。
17. FARB Maxi Column を Elution Tube へ取り付けます。
18. 500–1,000μ l の RNase-free Water を FARB Maxi Column 膜の中央にアプライし、5 分間静置します。
* 効率よく溶出させるために、Elution Buffer をカラム膜中央へ加え、完全に吸着させてください。
19. 3,000–5,000rpm で 5 分間遠心分離し、RNA を溶出します。
20. 精製した RNA は -70°C で保管します。

<動物細胞用>

1. 5×10^6 cell を $300 \times g$ で 5 分間遠心分離し、上清を取り除きます。
2. 14ml の FARB Buffer (事前に β -ME を加えてください)をペレットに加え、ボルテックスします。室温で 5 分間インキュベートします。
* 重要事項 3. に従い FARB Buffer へ β -ME を加えてください。
3. Filter Column を 50ml チューブ(お客様でご用意ください。)へ取り付けます。サンプル溶液を Filter column にアプライし、3,000-5,000rpm で 5 分間遠心分離します。
4. 上清を新しい 50ml チューブ(お客様でご用意ください)に移します。次のステップでサンプル量と同量のエタノールを加えるため、サンプル量を調整してください。
* このとき、ペレットの断片を混入させないようにしてください。
5. サンプルと同量のエタノール(70%)を加えてピペッティングで混和します。
6. ヒトの血液用プロトコールのステップ 12 へ進みます。

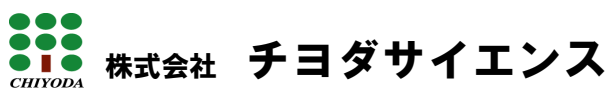
<細菌用>

1. 5×10^{10} cell 程度をチューブ(お客様でご用意ください)へ移します。
2. $>3,000 \times g$ で 5 分間遠心分離し、上清を捨てます。
3. ペレットを 1ml の RNase-free lysozyme reaction solution (20mg/ml lysozyme; 20mM Tris-HCl, pH8.0; 2mM EDTA; 1.2% Triton:お客様で調整してください)で再懸濁します。
4. 37°C で 10 分間インキュベートします。
5. 13ml の FARB Buffer (事前に β -ME を加えてください)をペレットに加え、ボルテックスで混和します。室温で 5 分間インキュベートします。
* 重要事項3. に従い FARB Buffer へ β -ME を加えてください。
6. 3,000-5,000rpm で 5 分間遠心分離します。上清を新しい 50ml チューブ(お客様でご用意ください)に移します。
7. サンプルと同量の 70%エタノールを加えてピペッティングで混和します。
8. ヒトの血液用プロトコールのステップ 12 へ進みます。

<酵母用>

1. 5×10^9 の酵母培養液を 50ml チューブ(お客様でご用意ください)へ移します。
2. 4°C 、 $5,00 \times g$ で 5 分間遠心分離し、上清を捨てます。
3. ペレットを 2.5ml の enzymatic lysis buffer (20mg/ml lyticase or zymolase; 1M sorbitol; 100mM EDTA; 0.1% β -ME:お客様で調整してください)で再懸濁します。
* sorbitol buffer は使用直前に温めてから使用してください。(30 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間インキュベートします。)
4. $500 \times g$ で 5 分間遠心分離し、ピペットで上清を捨てます。
5. 14ml の FARB Buffer (事前に β -ME を加えてください)をペレットに加え、ボルテックスでよく混ぜます。室温で 5 分間インキュベートします。
6. 3,000–5,000rpm で 5 分間遠心分離し、上清を新しい 50ml チューブ(お客さまでご用意ください)に移します。
7. 同量の 70%エタノールを加えてピペッティングで混和します。
8. ヒトの血液用プロトコールのステップ 12 へ進みます。

日本総代理店



〒101-0032 東京都千代田区岩本町 2-13-11 TEL: 03(5294)7701 FAX: 03(3864)7752

E-mail: technical@chiyoda-s.jp

vol.1005

<http://www.chiyoda-s.jp>