



組織からのトータル RNA 抽出 Maxi キット

# Tissue Total RNA Extraction Maxi Kit

## 目次

基本データ	3
キットの内容	3
重要事項	4
操作	5

\* 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 ddH<sub>2</sub>O 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

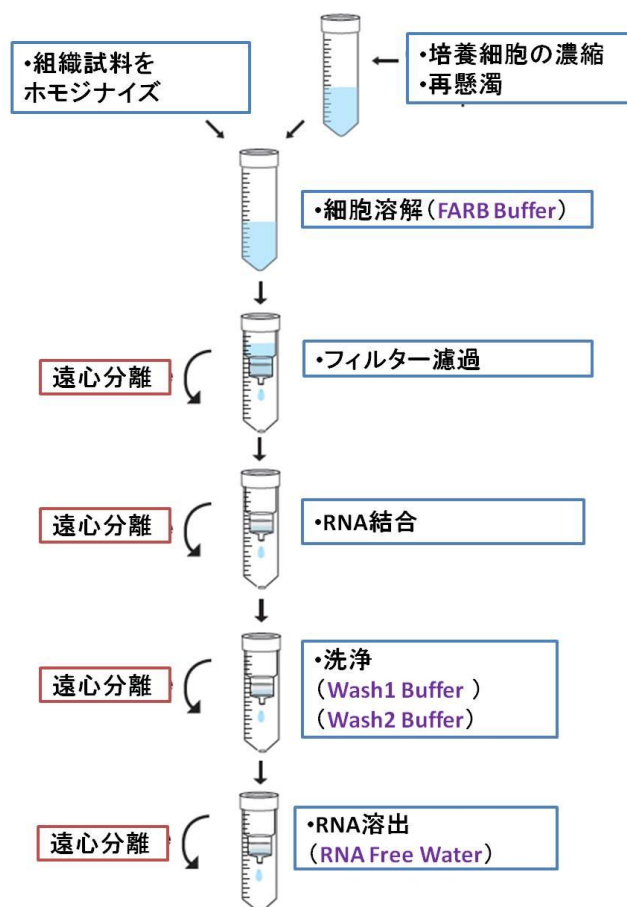
サンプル	所要時間
0.5-1g の動物組織	60 分程度
5 × 10 <sup>10</sup> 細菌	
5 × 10 <sup>9</sup> 酵母	
5 × 10 <sup>8</sup> 動物細胞	

### 🌈 キットの内容

	FATRK 003 (10 preps)	FATRK 003-1 (24 preps)
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 108ml 加えてください。	27 ml × 5 エタノール (96-100%) を 108ml 加えてください。
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	12 ml	30 ml
Filter Column	10 pcs	24 pcs
FARB Maxi Column	10 pcs	24 pcs
Elution Tube (50 ml)	pcs	24pcs

## 重要事項

- 1) 操作に関連するものは、RNase フリーであることを確認してください。
- 2) 本製品取扱時はゴム手袋、白衣を着用してください。
- 3) 使用前に、FARB Buffer を RNase フリーのチューブに取り、 $\beta$ メルカプトエタノール( $\beta$ -ME)を加えてください。(1ml の FARB Buffer に  $\beta$ -ME 10 $\mu$ l 加えてください。)
- 4) Wash 2 Buffer へエタノール(96-100%)を加えてください。
- 5) オプション操作を行う場合は、RNase-free DNase1 を Buffer (150mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-HCl, pH7.0, 25°C)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 又は、3,000-5,000  $\times$  g で行ってください。



## 操作

\* 20-G のシリンジを使用します。

### <一般的な操作:動物組織>

1. 0.5g (最大 1g) の組織を細かく切り、液体窒素中ですり潰し、粉末状にします。粉末状にしたサンプルは、50ml チューブへ移してください。  
\* サンプル量は、0.5g または最大 1g です。それ以上のサンプルを処理することはできません。最適な収量と精製度を得るため、適切なサンプル量を使用してください。
2. Filter Column を Collection Tube へ取り付け、14ml の FARB Buffer ( $\beta$ メルカプトエタノールを加えたもの)を加え、20-G のシリンジを 10 回程度通過させます。  
\* 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させてください。サンプルに応じて、溶解の方法は異なります。\*
3. サンプルを室温で 5 分間インキュベートします。
4. 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、3,000–5,000rpm で 5 分遠心分離します。
5. Collection Tube 中の上清を新しいチューブ(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。
6. 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よく混和します。
7. 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 の沈殿物を含めたサンプル溶液を FARB Maxi column へ加えます。3,000–5,000rpm で 5 分間 遠心分離し、ろ液を捨てます。FARB Maxi Column は、50ml チューブへ戻します。  
サンプルが残っている場合は、この操作を繰り返しサンプルを処理してください。
8. ゲノム DNA を除去するためのオプションステップ(必要ない場合はステップ 9 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 チューブへ戻します。
  - B) 0.5ml の RNase-free DNase1(2U/ $\mu$ l に調整したもの:お客様でご用意ください。)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 チューブへ戻します。
- D) ステップ 10 へ進みます。
9. 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 チューブへ戻します。
10. 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 チューブへ戻します。  
\*この操作を2回繰り返してください。
11.  $>4,000 \times g$  で 10 分間 遠心分離し、FARB Maxi Column を乾燥させます。  
\* 酵素反応を阻害する物質を取り除くために重要なステップです。
12. FARB Maxi Column を 50ml の Elution Tube へ取り付けます。
13. 500–1,000 $\mu$  l の RNase-free ddH<sub>2</sub>O を FARB Maxi Column 膜の中央に加え、5 分間静置します。  
\* 効率よく DNA を溶出するために、Elution Buffer をカラム膜中央へ加え、完全に吸着させます。
14. 3,000–5,000rpm で 5 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。

### <動物培養細胞>

1.  $5 \times 10^8$  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 ( $\beta$ -ME を加えたもの)をペレットに加え、ボルテックスで細胞を溶解します。その後、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  $\beta$ -ME を加えてください。
3. 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、 $3,000$ – $5,000$ rpm で 5 分遠心分離します。
4. Collection Tube 中の上清を新しいチューブ(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%)を加えてボルテックスでよく混和します。
6. 一般的なプロトコールのステップ 7 へ進んでください。

#### <細菌用>

1. 培養液( $5 \times 10^{10}$  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、上清を完全に取り除きます。
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. 14ml の FARB Buffer ( $\beta$ -ME を加えたもの)をペレットに加え、ボルテックスでよく混和します。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  $\beta$ -ME を加えてください。
6. 3,500–5,000rpm または  $3,000$ – $5,000 \times g$  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。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。
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. 動物細胞用のプロトコールのステップ 7 へ進んでください。

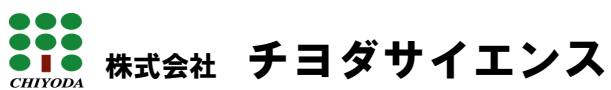
#### <酵母用>

1.  $5 \times 10^9$  ml (OD600=10)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、 $500 \times g$  で 5 分間遠心分離し、上清を完全に取り除きます。
3. ペレットを 2.5ml の enzymatic lysis buffer(20mg/ml lyticase または zymolase, 1M sorbitol; 100mM EDTA; 0.1%  $\beta$  -ME:お客様で調整してください。)で再懸濁し、30°Cで 30 分間インキュベートします。  
\* Sorbitol Buffer は、使用直前に温めてください。
4.  $500 \times g$  、室温で 5 分間遠心分離し、上清を捨てます。
5. 14ml の FARB Buffer ( $\beta$  -ME を加えたもの)をペレットに加え、ボルテックスでよく混ぜます。その後、室温で 5 分間インキュベートしてください。
6. 3,500–5,000rpm または  $3,000$ – $5,000 \times g$  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. サンプルと同量の 70%エタノールを加え、ピペットを使用し混和します。
8. 一般的なプロトコールのステップ 7 に進んでください。





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](mailto:technical@chiyoda-s.jp)

vol.1005

---

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