

FAVNK 000-1/ FAVNK 001/FAVNK 001-1/FAVNK 001-2

Vol.0320
本製品は研究用です

◆ キットの内容

Kit Contents	FAVNK 000-1	FAVNK 001	FAVNK 001-1	FAVNK 001-2
prep	4	50	100	300
VNE Buffer	1.8 ml x 2	35 ml	70 ml	200 ml
Wash Buffer 1 (concentrate)※1	0.9 ml x 2	22 ml	44 ml	132 ml
Wash Buffer 2 (concentrate)※2	1.5 ml	20 ml	20 ml x 2	50 ml x 2
RNase-free Water	0.5 ml	6 ml	12 ml	20 ml
Carrier RNA	-----	0.4 mg	0.8 mg	2.2 mg
VNE 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				
※1 Wash Buffer 1	0.33 ml	8 ml	16 ml	48 ml
※2 Wash Buffer 2	6 ml	80 ml	80 ml	200 ml

◆ 基本情報

原理：	シリカメンブレン法(ミニスピナラム)
カラム操作：	遠心法または吸引法
カラム結合量：	DNA：30 µg RNA：60 µg
サンプル：	血清：140 µl 血漿：140 µl 体液：140 µl 細胞培養上清：140 µl
フラグメントサイズ：	> 200 bp
収量：	回収率：80-90%
溶出量：	40~50µl
所要時間：	<20 分



◆ 重要事項

- 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。
- 作業はゴム手袋、白衣を着用して行ってください。
- Carrier RNA 以外のキットのコンポーネントは、室温（15-25°C）で保管してください。
- Carrier RNA は受け取り次第、-20°Cで保管してください。
- Carrier RNA に VNE Buffer を 1ml 加えボルテックスでよく混和し、もとの VNE Buffer の入った容器へ戻します。その後は 4 °C で保管してください。
- 凍結血漿または血清サンプルは 2 回以上解凍しないでください。
- 血漿または血清サンプルに沈殿物が見られる場合は 6,000 x g で 3 分間遠心します。次に、上澄みを新しいバイアルに移し、すぐに処理してください。
- 使用前に必要な量(キットの内容に記載)のエタノール（96-100%）を Wash Buffer 1 と Wash Buffer 2 に添加してください。
- バッファーを安全に取り扱うために、手順を開始する前に安全情報(付属の英語版取扱説明書)をお読みください。

◆ 遠心分離と吸引に関する注意

- 遠心速度が個々のステップの指示に従っていることを確認してください。
- 吸引プロトコールを使用して「**ウイルス RNA /核酸の結合（吸引）**」および「**カラムメンブレンの洗浄（吸引）**」を進める場合、カラムの先端がマニホールドアダプターの形状に適合し、真空圧が-6 inHg に到達できることを確認してください。

• 同じ圧力での単位と値（1 atm）

unit	Value
atmosphere (atm)	1.000
millimeter of mercury (mmHg)	760.000
inches of mercury (inHg)	29.290
pascal (Pa)	101325.000
kilopascal (KPa)	101.325
torr (torr)	760.000
pound per square inch (psi, 1bs/in ²)	14.700



◆ 操作

遠心分離プロトコール

次の手順を開始する前に、注意事項をお読みください。

サンプルタイプ A : 血清、血漿、体液、細胞培養上清などの無細胞体液

1-A1. サンプルの入ったチューブを短時間ボルテックスし、軽くスピンドウンして、チューブ壁に付着した液滴を降下させます。

注意! 沈殿物が見られる場合は、サンプルを 7,000 x g で 3 分間遠心分離します。

1-A2. 140 μ l の液体サンプル (上澄み) をマイクロ遠心チューブ (付属していません) に移します。

サンプルタイプ B : 輸送用スワブの培地

1-B1. サンプルの入ったチューブを短時間ボルテックスし、軽くスピンドウンして、チューブ壁に付着した液滴を降下させます。

1-B2. 140 μ l の培地をマイクロ遠心チューブ (付属していません) に移します。

● サンプル溶解

2. 560 μ l の VNE Buffer (Carrier RNA を含む) を追加します (**重要事項を参照**)。ボルテックスでよく混ぜ、室温で 10 分間インキュベートします。

● 結合条件の最適化

3. 560 μ l のエタノール (96-100%) をサンプル混合物に加え、ボルテックスでよく混ぜます。

● ウイルス RNA / 核酸の結合 (遠心分離)

4. VNE Column を Collection Tube (付属) に取り付けます。700 μ l までのサンプル混合物 (エタノールを添加) を VNE Column に移します。8,000 x g で 1 分間遠心し、ろ液を廃棄します。VNE Column を使用済みの Collection Tube に取り付けます。

5. 残りのサンプル混合物 (エタノールを添加) を VNE Column に移し、8,000 x g で 1 分間遠心します。ろ液と Collection Tube を廃棄します。VNE Column を新しい Collection Tube (付属) に取り付けます。

● カラムメンブレンの洗浄 (遠心分離)

6. VNE Column に 500 μ l の Wash Buffer 1 (エタノールを添加) を加えます。8,000 x g で 1 分間遠心し、ろ液を捨てます。VNE Column を Collection Tube に戻します。
- 開封時にエタノール (96-100%) を Wash Buffer 1 に必ず添加してください。

7. VNE Column に 750 μ l の Wash Buffer 2 (エタノールを添加) を加えます。8,000 x g で 1 分間遠心し、ろ液を廃棄します。VNE Column を Collection Tube に戻します。
- 開封時にエタノール (96-100%) を Wash Buffer 2 に必ず添加してください。

8. 手順 7 を繰り返します。

● メンブレンの乾燥

9. 最高速度 (約 18,000 x g) で 1 分間遠心し、VNE Column を乾燥させます。ろ液と Collection Tube を廃棄します。
- 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。

● ウイルス RNA の溶出

10. VNE Column を Elution Tube (付属) に取り付けます。VNE Column の膜の中心に 40~60 μ l



の RNase-free Water を加えます。 VNE Column を 1 分間静置します。
 -効率よく溶出するために、Elution Buffer をカラム膜中央へ加え、完全に吸着させます。

11. 最高速度 (約 18,000 x g) で 1 分間遠心し、ウイルス RNA を溶出します。
12. -70°C でウイルス RNA を保存します。

吸引プロトコール :

次の手順を開始する前に、重要事項をお読みください。

サンプルタイプ A : 血清、血漿、体液、細胞培養上清などの無細胞体液

1-A1. サンプルの入ったチューブを短時間ボルテックスし、軽くスピンドウンして、チューブ壁に付着した液滴を降下させます。

注意! 沈殿物が見られる場合は、サンプルを 7,000 x g で 3 分間遠心分離します。

1-A2. 140 µl の液体サンプル (上澄み) をマイクロ遠心チューブ (付属していません) に移します。

サンプルタイプ B : 輸送用スワブの培地

1-B1. サンプルの入ったチューブを短時間ボルテックスし、軽くスピンドウンして、チューブ壁に付着した液滴を降下させます。

1-B2. 140 µl の培地をマイクロ遠心チューブ (付属していません) に移します。

● サンプル溶解

2. 560 µl の VNE Buffer (Carrier RNA を含む) を追加します (**重要事項を参照**)。ボルテックスでよく混ぜ、室温で 10 分間インキュベートします。

● 結合条件の最適化

3. 560 µl のエタノール (96-100%) をサンプル混合物に加え、ボルテックスでよく混ぜます。

● ウイルス RNA /核酸の結合 (吸引)

4. VNE Column の先端をバキュームマニホールドのアダプターに取り付けます。最大 700 µl のサンプル混合物 (エタノールを添加) を VNE Column に移し、カラムが空になるまで -6 inHg で吸引します。カラムが空になったら吸引を止めて、マニホールドの真空を開放します。
5. 残りのサンプル混合物 (エタノールを添加) を VNE Column に移し、カラムが空になるまで -6 inHg で吸引します。カラムが空になったら吸引を止めて、マニホールドの真空を開放します。

● カラムメンブレンの洗浄 (吸引)

6. VNE Column に 500 µl の Wash Buffer 1 (エタノールを添加) を加えます。カラムが空になるまで、-6 inHg で吸引します。カラムが空になったら吸引を止めて、マニホールドの真空を開放します。
7. VNE Column に 750 µl の Wash Buffer 2 (エタノールを添加) を追加します。カラムが空になるまで、-6 inHg で吸引します。カラムが空になったら吸引を止めて、マニホールドの真空を開放します。
8. 手順 7 を繰り返します。

● メンブレンの乾燥

9. VNE Column をマニホールドから取り外し、VNE Column を付属の Collection Tube に取り付けます。最高速度 (約 18,000 x g) で 1 分間遠心して、VNE Column を乾燥させます。ろ液と Collection



Tube を廃棄します。

– 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。

● ウイルス RNA の溶出

10. VNE カラムと Elution Tube (付属) に取り付けます。VNE Column の膜の中心に 40~60 μ l の RNase-free Water を加えます。VNE Column を 1 分間静置します。

– 効率よく溶出するために、Elution Buffer をカラム膜中央へ加え、完全に吸着させます。

11. 最高速度 (約 18,000 x g) で 1 分間遠心し、ウイルス RNA を溶出します。

12. -70°C でウイルス RNA を保存します。

◆トラブルシューティング

● 低収量	
Carrier RNA が VNE Buffer に加えられていない、または VNE-Carrier RNA Buffer が適切に保存されていない	Carrier RNA に 1 ml の VNE Buffer を加えてください。よく混合して VNE Buffer に戻します。VNE-Carrier RNA Buffer は 4°C で保存してください。
サンプルがうまく保存されていない、または繰り返し解凍された	長期保存の際は、サンプルを -80°C で保存してください。凍結サンプルは 2 回以上解凍しないでください。
RNA が分解	スタートサンプル(血清、血漿、体液) 処理はできるだけ迅速に行ってください。調製中に RNase が混入しないように注意してください。
VNE-Carrier RNA Buffer との混合が不十分	ボルテックスでサンプル混合物をよく混ぜてください。
タンパク質の溶解が不十分	VNE-Carrier RNA Buffer を加えた後、サンプル混合物を室温で 10 分間インキュベートしてください。
RNA の結合条件が最適化されていない	ステップ 3 でサンプル混合物にエタノールが加えられていない。96-100%のエタノールが使用されていない。
RNA の溶出が正しく行われていない	RNase-free Water が VNE Column メンブレンの中央に添加され、メンブレンに吸収されたことを確認してください。
Wash Buffer1 及び Wash Buffer2 の準備が不適切	Wash Buffer1 及び Wash Buffer2 の開封時には、正しい量のエタノール (96-100%) を必ず加えてください。
● 溶出した RNA がうまく機能しない	
残留エタノールによるコンタミネーション	洗浄ステップ後、VNE Column を約 18,000 x g の速度でさらに 1 分間遠心分離してください(ステップ 9)。