

FavorPrep™ Tissue Total RNA Mini Kit

Vol.0515
本製品は研究用です

◆ キットの内容

Kit Contents	FATRK 000-Mini	FATRK 001	FATRK 001-1	FATRK 001-2
prep	4	50	100	300
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 x 2
RNase-free Water	0.5 ml	6 ml	6 ml	8 ml x 2
FARB Mini Column	4 pcs	50 pcs	100 pcs	300 pcs
Filter 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
Micropestle	4 pcs	50 pcs	100 pcs	300 pcs
※添加する 96-100%エタノール量				
	6 ml	60 ml	140 ml	200 ml

◆ 基本情報

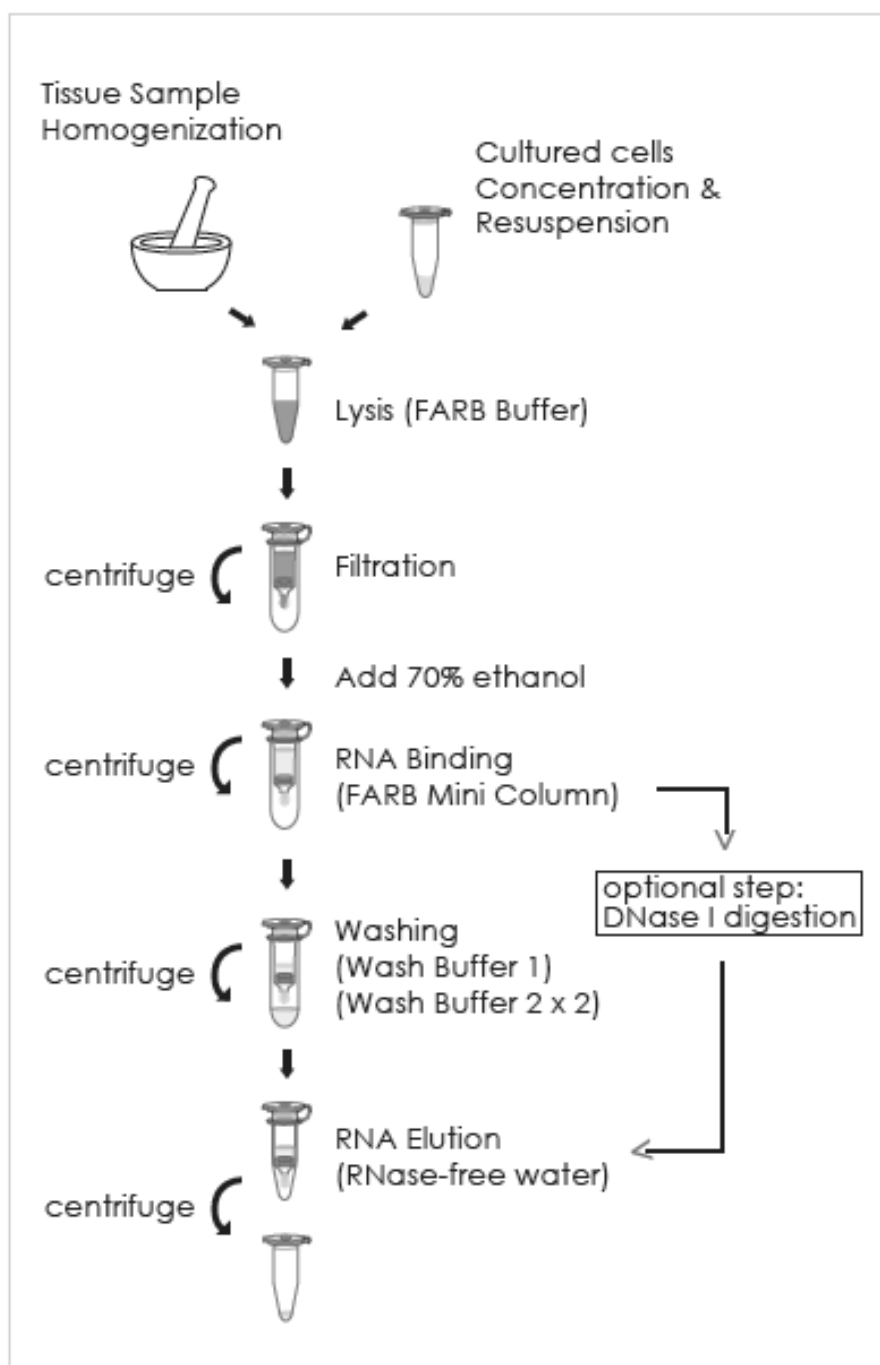
原理：	シリカメンブレン法(ミニスピニングカラム)
カラム操作：	遠心法または吸引法
カラム結合量：	≤ 100 μg
サンプル：	動物組織：≤ 30 mg 動物細胞：≤ 5×10 ⁶ 個 バクテリア：≤ 1×10 ⁹ 個 酵母：≤ 5×10 ⁷ 個
収量：	マウス腎臓 10mg：30 μg マウス肝臓 10mg：50 μg 10 ⁶ Hela 細胞：15μg
溶出量：	40~100 μl
所要時間：	30~60 分
保存：	室温(15~25℃)

※サンプル量・収量の詳細は、製品付属の英語版プロトコルをご参照ください

◆ 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. 注意：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 Buffer2 開封時に必要量の 96~100%エタノール(RNase フリー)を添加してください。
5. 遠心分離は、最大速度(~18,000×g)で行ってください
6. オプションの操作を行う場合は、RNase-free DNase 1 を reaction buffer (1M NaCl, 10mM MnCl₂, 20mM Tris-HCl, pH7.0, 25℃) で 0.5U/μl に調整してください(キットには含まれません)。

◆ 簡易プロトコール図



◆ 操作

<動物細胞>

* 追加で必要なもの

- ・β-メルカプトエタノール
- ・70% RNase-free エタノール

1. $1-5 \times 10^6$ cells を 4°C 、 $300 \times g$ で 5 分間遠心分離し、上清を取り除きます。
* サンプルを入れすぎないようにしてください。多すぎると、細胞溶解が不完全になり、RNA 収量と純度が低下します。
2. $350 \mu\text{l}$ の FARB Buffer と $3.5 \mu\text{l}$ の β-メルカプトエタノールをペレットに加え、1 分間激しくボルテックスを行い完全に細胞を再懸濁します。
* ボルテックス後もかたまりがまだ見える場合はピペティングでかたまりを崩してください
3. Filter Column を Collection Tube へ取り付けます。サンプル溶液を移し、 $\sim 18,000 \times g$ で 2 分間遠心分離します。
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、ペレットや残骸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. FARB Mini Column を Collection Tube へ取り付けます。エタノールを含むサンプル(沈殿物を含む)を FARB Mini column へ移し、 $\sim 18,000 \times g$ で 1 分間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini column を Collection Tube に戻します。
7. 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 8 へ進んでください)
 - a $250 \mu\text{l}$ の Wash Buffer 1 を FARB Mini Column へ加え、 $\sim 18,000 \times g$ で 1 分間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini column を Collection Tube に戻します。
 - b $60 \mu\text{l}$ の RNase-free DNase1($0.5 \text{U}/\mu\text{l}$ に調整したもの:お客様でご用意ください。)を FARB Mini Column の膜中央へ加え 15 分間静置します。
 - c $250 \mu\text{l}$ の Wash Buffer 1 を FARB Mini Column へ加え、 $\sim 18,000 \times g$ で 1 分間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini column を Collection Tube に戻します。
 - d ステップ 9 へ進みます。
8. $500 \mu\text{l}$ の Wash Buffer 1 を FARB Mini Column へ加え、 $\sim 18,000 \times g$ で 1 分間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini column を Collection Tube に戻します。
9. $750 \mu\text{l}$ の Wash Buffer 2（開封時にエタノールを必ず加えてください。）を FARB Mini Column へ加え、 $\sim 18,000 \times g$ で 1 分間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini column を Collection Tube に戻します。
10. もう一回洗浄を行うため、ステップ 9 をもう 1 回行ってください。

11. さらに～18,000×g で 3 分間遠心分離し、カラムを乾燥させます。
* 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 Mini Column を Elution Tube へ取り付けます。
13. 40-100μl の RNase-free ddH₂O を FARB Mini Column 膜の中央に加え、1 分間静置します。
* DNA の溶出効率を向上させるため、Elution Buffer をカラム膜中央へ加え、膜全体に染み込ませててください。
* 推奨容量 (<40 μl) 未満で RNA を溶出しないでください。最終収量が低下します。
14. ～18,000×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℃で保管します。

<動物組織>

- * 追加が必要なもの
 - ・液体窒素と乳鉢
 - ・ローターステーターホモジナイザーまたは 20-G ニードル
 - ・β-メルカプトエタノール
 - ・70% RNase-free エタノール
- A-1. 最大 30mg 程度の組織を液体窒素と乳鉢で粉末化し、チューブ（お客様でご用意ください。）へ移します。
* 計量や粉碎時にサンプルが溶けないようにしてください
 - A-2. 350μl の FARB Buffer と 3.5μl の β-メルカプトエタノールを加えます。ローターステーターホモジナイザーを使用するか、20-G ニードルを 10 回程度通過させてホモジナイズします。室温で 5 分間インキュベートして下さい。
* より硬いサンプルからより多くの RNA を放出するために、ローターステーターホモジナイザーなどを使用して、ホモジナイズすることをお勧めします
 - A-3. 動物細胞用のプロトコールのステップ 3 へ進んでください。

(別方法)

- B-1. 最大 30mg 程度の組織をマイクロチューブに入れ、350μl の FARB Buffer と 3.5μl の β-メルカプトエタノール加えます。付属の **micropestle** を使用して、組織サンプルを完全に粉碎します。
- B-2. 20-G ニードルを 10-20 回程度通過させてホモジナイズします。室温で 5 分間インキュベートして下さい。
* 組細胞量が少なく、破壊しにくい組織サンプルについては、上記の A1-A3 ステップで行うことをお勧めします。
- B-3. 動物細胞用のプロトコールのステップ 3 へ進んでください。

<バクテリア用>

* 追加が必要なもの

- ・β-メルカプトエタノール
- ・70% RNase-free エタノール
- ・30℃ウォーターバスまたはヒーティングブロック
- ・2ml スクリュー遠心チューブ
- ・リゾチーム反応溶液 (10mg/ml リゾチーム; 20mM Tris-HCl, pH 8.0; 2mM EDTA; 1.2% Triton)
- ・酸洗浄ガラスビーズ (500~700μm)

1. 培養液(1×10^9 cells 程度)を 2ml チューブ(お客様でご用意ください)へ移します。
*サンプル量から推測して total RNA の収量がカラム結合量(100μg)を超えないようにしてください。サンプル量が過剰な場合、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. 培養液を、4℃、 $\sim 18,000 \times g$ で 2 分間遠心し上清を完全に取り除きます。
3. 100μl の RNase-free lysozyme reaction solution (20mg/ml lysozyme; 20mM Tris-HCl, pH 8.0; 2mM EDTA; 1.2% Triton : お客様で調整してください。)を加え、ペレットをピペティングで再懸濁します。37℃で 10 分間インキュベートします。
4. 350μl の FARB Buffer と 3.5μl の β-メルカプトエタノールを加えます。
5. 250 mg の酸洗浄ガラスビーズ (500~700 nm) を加え、5 分間激しくボルテックスを行い細胞を破壊します。
6. $\sim 18,000 \times g$ で 2 分間遠心分離し、不溶物を沈殿させます。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、ペレットや残骸を混入させないようにしてください。
7. 動物細胞用のプロトコールのステップ 5 へ進んでください。

<酵母用>

* 追加が必要なもの

- ・β-メルカプトエタノール
 - ・70% RNase-free エタノール
- * 機械的破碎:
- ・2ml スクリュー遠心チューブ
 - ・酸洗浄ガラスビーズ (500~700μm)

* 酵素破碎:

- ・Lyticase または zymolase

- ・ Sorbitol Buffer (1 M Sorbitol; 100 mM EDTA; 0.1%β-ME)
- ・ 30℃ウォーターバスまたはヒーティングブロック

1. 酵母培養液(5×10^7 cells 程度)を 4℃、 $\sim 5,000 \times g$ で 10 分間遠心し上清を完全に取り除きます。

2A. 機械的破碎

2A-1 ペレットに 350 μ l の FARB Buffer と 3.5 μ の β -メルカプトエタノールを加えます。激しくボルテックスを行い、完全に細胞を再懸濁します。

2A-2 サンプル溶液を 2ml 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、250 mg の酸洗浄ガラスビーズ (500 \sim 700 nm) を加え、15 分間激しくボルテックスを行い細胞を破壊します。

2B. 酵素破碎

2B-1 ペレットに 600 μ l の Sorbitol Buffer (1M sorbitol; 100mM EDTA; 0.1% β -ME : お客様でご準備ください。)で再懸濁し、200U の zymolase 又は、lyticase を加えて 30℃で 30 分間インキュベートします。* Sorbitol Buffer は、使用直前に調整してください。

2B-2 $300 \times g$ で 5 分間遠心分離し、上清を完全に取り除きます。

2B-3 350 μ l の FARB Buffer と 3.5 μ の β -メルカプトエタノールをペレットに加え、1 分間激しくボルテックスを行い、スフェロプラスト (spheroplast) を破壊します。室温で 5 分間インキュベートします。

3. <動物細胞用>のプロトコールのステップ 5 に進んでください。

<パラフィン包埋組織>

* 追加で必要なもの

- ・ キシレンおよびエタノール(96-100%)
- ・ 液体窒素と乳鉢
- ・ ローターステーターホモジナイザーまたは 20-G ニードル
- ・ β -メルカプトエタノール
- ・ 70% RNase-free エタノール

1. 15mg までのパラフィン包埋組織をチューブ(お客様でご用意ください。)へ移します。

* できるだけサンプルサイズが最小になるよう、余分なパラフィンを取り除きます

2. 0.5ml のキシレンを加えてよく混ぜ、室温で 10 分間インキュベートします。

3. $\sim 18,000 \times g$ で 3 分間遠心分離し、ピペッティングで上清を取り除きます。

4. 0.25ml のキシレンを加えてよく混ぜ、室温で 3 分間インキュベートします。

5. $\sim 18,000 \times g$ で 3 分間遠心分離し、ピペッティングで上清を取り除きます。

6. ステップ 4 とステップ 5 を繰り返します。

7. 0.3ml のエタノール(96-100%)を脱パラフィン化した組織に加え、ボルテックスで緩やかに混和

します。室温で3分間インキュベートします。

8. ~18,000×g で3分間遠心分離し、ピペティングで上清を取り除きます。
9. ステップ7とステップ8を繰り返します。
10. <動物組織用>プロトコルのステップ1へ進み、サンプルを破碎してください。その後<動物細胞用>プロトコルのステップ3へ進みます。

<RNA クリーンアップ>

* 追加が必要なもの

- ・キシレンおよびエタノール(96-100%)

1. 100 µl の RNA サンプルを微量遠心チューブ（お客様自身でご用意ください）に移します。
* RNA サンプルが 100µl 未満の場合、RNase-free 水を加えてサンプル量を 100µl にします。
2. 300µl の FARB バッファーと 300µl の RNase フリーエタノール（96~100%）を加え、ボルテックスでよく混合します。
3. FARB Mini Column を Collection Tube に置き、エタノールを加えたサンプル混合物を FARB Mini に移します。~18,000×g で1分間遠心分離し、ろ液を捨て、FARB Mini Column を元に戻します。
4. <動物細胞用>のプロトコルのステップ8に進んでください。