

FavorPrep™ miRNA Isolation Kit

Cat: FAMIK 000 (4 回分) / FAMIK 001 (100 回分) / FAMIK 002 (50 回分)

本製品は研究用です

v 221103

キットの内容

	FAMIK 000 (5 preps_sample)	FAMIK 001 (100 preps)	FAMIK 002 (50 preps)
Lysis Buffer	1.5 ml	25 ml	12 ml
2M NaOAc, pH 5.2	150 µl	2.5 ml	1.2 ml
Wash Buffer 2 (concentrate)*	0.3 ml	5 ml	3 ml
Release Buffer	0.32 ml	5.5 ml	2.8 ml
RNA Column	10 pcs	200 pcs	100 pcs
Collection Tube	10 pcs	200 pcs	100 pcs
*添加する 96-100%エタノール量			
Wash Buffer 2 (concentrated)	1.2 ml	20 ml	12 ml

基本情報

構成	シリカメンブレン法 (ミニスピナラム)
サンプル	培養細胞: ≤ 1 × 10 ⁶ cells 組織: ≤ 100 mg
操作時間	< 30 分
操作方法	遠心法 もしくは 吸引法

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: フェノールとクロロホルムは人体に有害です。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 開封時に RNase-free エタノール(96-100%)を加えてください。

✚ 準備するもの

1. 12,000 rpm まで到達可能な遠心分離機
2. 1.5ml 遠心チューブ
3. RNase-free エタノール(96-100%)
4. 水飽和フェノール
5. クロロホルム
6. ボルテックスミキサー
7. ウォーターバス または ドライバス

✚ 操作 ※操作前に「重要事項」をよくお読みください。

ヒント:ステップ 15 で使用する Release Buffer を 65°Cに予熱してください。

1. 最大 100 mg の組織 または 最大 1×10^6 のペレット化した培養細胞を入れた遠心チューブに、200 μ l の Lysis Buffer を加えます。
2. ボルテックスで十分に混和し、室温で 10 分間インキュベートします。
3. 20 μ l の 2M NaOAc, pH 5.2 を加えます。
4. 180 μ l の水飽和フェノールと 40 μ l のクロロホルムを加え、2 分間ボルテックスします。
5. 12,000 rpm で 3 分間遠心分離し、上清を新しい 1.5 ml 遠心チューブへ移します。
6. 全量に対して 35%の無水エタノールを加え、十分に混和します。
例) 上清が 200 μ l の場合、108 μ l の無水エタノールを加える。
7. RNA Column を Collection Tube へ取り付け、サンプルを移します。その後 1 分間インキュベートします。
8. 12,000 rpm で 30 秒間遠心分離します。(Large RNA がカラムへ結合)ろ液を回収し、新しい 1.5 ml 遠心チューブへ移します。
9. ろ液に対して 70%量の無水エタノールを加え、十分に混和します。
例) 上清 (108 μ lの無水エタノール添加済み) の体積が 308 μ lの場合、338 μ lの無水エタノールを加える。
10. 新しい RNA Column を Collection Tube へ取り付け、サンプルを移します。その後 1 分間インキュベートします。
11. 12,000 rpm で 30 秒間遠心分離します。(miRNA がカラムへ結合)

12. 200 μ l の Wash Buffer 2(エタノール添加)を加え、1 分間インキュベートします。
13. 12,000 rpm で 1 分間遠心分離し、カラムを完全に乾燥させます。
14. RNA Column を 1.5ml 遠心チューブへ取り付けます。
15. 50 μ l の Release Buffer (65°Cに予熱) を RNA Column の膜中央へ加え、3 分間インキュベートします。
16. 12,000 rpm で 3 分間遠心分離し、miRNA を抽出します。
メモ:さらに精製する場合は、一般的なエタノール沈殿操作で濃縮し、少量の ddH₂O または TE, pH 8.0 に再溶解することができます。
17. 1/5 量のサンプルを使用して、ミニアガロースゲル または ポリアクリルアミドゲルで泳動し、品質確認を行います。ゲル上に確認できる RNA の大部分は 100nt 以下のサイズで、主要なバンドは tRNA に対応しているはずで、5S と 5.8S rRNA も確認することができます。これらの tRNA や small rRNA のバンドは明瞭であることが望ましく、miRNA (21-22nt) は通常はゲル上では確認することはできません。