

## FavorPrep™ 96-Well Total RNA Kit

Cat: FATRE 96001 (1 回分) / FATRE 96002 (2 回分) / FATRE 96004 (4 回分)

本製品は研究用です

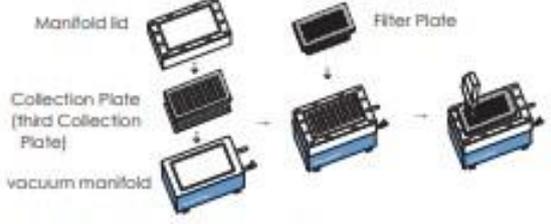
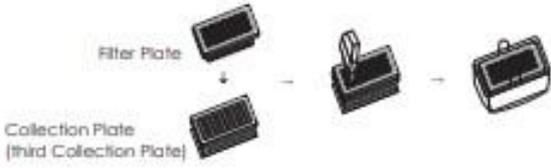
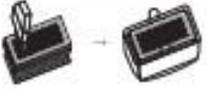
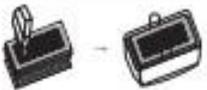
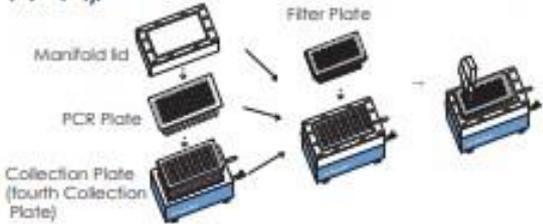
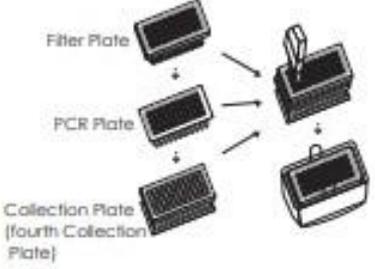
v 221118

### 📦 キットの内容

	FATRE 96001 (1 prep)	FATRE 96002 (2 preps)	FATRE 96004 (4 preps)
Lysis Buffer	60 ml	120 ml	120 ml × 2
Wash Buffer 1 (concentrated)*	55 ml	110 ml	110 ml × 2
Wash Buffer 2 (concentrated)*	25 ml	50 ml	50 ml × 2
RNase-free Water	15 ml	30 ml	30 ml × 2
Filter Plate (96-Well RNA Binding Plate)	1 plate	2 plates	4 plates
Collection Plate (96-Well 2ml Plate)	4 plates	8 plates	16 plates
Elution Plate (96-Well PCR Plate)	1 plate	2 plates	4 plates
Adhesive Film	2 pcs	4 pcs	8 pcs
<b>*添加する 96-100%エタノール量</b>			
Wash Buffer 1 (concentrated)	20 ml	40 ml	40 ml × 2
Wash Buffer 2 (concentrated)	100 ml	200 ml	200 ml × 2

### 📦 基本情報

構成	シリカメンブレン (フィルタープレート)
サンプル量 /preparation	動物細胞: 最大 $1 \times 10^7$ 動物組織: 最大 50 mg
所要時間	< 60 分 / 96 preparations
結合量	最大 75 $\mu$ g /well
溶出量	50-75 $\mu$ l
方法	遠心法 もしくは 吸引法
ダウンストリームアプリケーション	リアルタイム RT-PCR cDNA 合成 ノーザンブロットティング プライマー伸長 mRNA 選択など

<p>• <b>STEP 1. Sample preparation and lysis</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Collect samples in a Collection Plate (first Collection Plate)</li> <li>Add Lysis Buffer</li> <li>Disrupt the samples</li> <li>Stand at room temperature for 5 min</li> </ul> 	
<p>• <b>STEP 2. Clarify lysate</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Seal with Adhesive Film.</li> <li>Centrifuge at 5,600 ~ 6,000 x g for 10 min</li> </ul> 	
<p>• <b>STEP 3. Adjust binding condition:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Transfer upper clarified lysate to a clean Collection Plate (second Collection Plate)</li> <li>Add 70 % ethanol</li> <li>Mix by pipetting</li> </ul> 	
<p>• <b>STEP 4. Bind RNA to Filter Plate:</b></p>	
<p><b>Vacuum processing</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Transfer the sample mixture to Filter plate.</li> <li>Apply -12 inches Hg vacuum until the wells have emptied.</li> </ul> 	<p><b>Centrifuge processing</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Transfer the sample mixture to Filter plate.</li> <li>Centrifuge at 4,500 ~ 6,000 x g for 2 min.</li> </ul> 
<p>• <b>(Optional) : Digest DNA by DNase I</b></p>	
<p>• A1. Add Wash Buffer 1. Apply vacuum at -12 inches Hg.</p> <p>• A2. Add DNase I mixture. Stand at R.T for 15 min.</p> <p>• A3. Add Wash Buffer 1. Apply vacuum at -12 inches Hg.</p> <p>• A4. Proceed to STEP 6.</p> 	<p>• B1. Add Wash Buffer 1. Centrifuge at 4,500 ~ 6,000 x g for 5 min.</p> <p>• B2. Add DNase I mixture. Stand at R.T for 15 min.</p> <p>• B3. Add Wash Buffer 1. Centrifuge at 4,500 ~ 6,000 x g for 2 min.</p> <p>• B4. Proceed to STEP 6.</p> 
<p>• <b>STEP 5. Wash the Filter Plate with Wash Buffer 1</b></p>	
<p>• Add Wash Buffer 1. Apply vacuum at -12 inches Hg.</p> 	<p>• Add Wash Buffer 1. Centrifuge at 4,500 ~ 6,000 x g for 2 min.</p> 
<p>• <b>STEP 6 &amp; 7. Wash the Filter Plate with Wash Buffer 2</b></p>	
<p>• <b>STEP 6 &amp; 7:</b> Add Wash Buffer 2. Apply vacuum at -12 inches Hg for 2 min.</p> 	<p>• <b>STEP 6:</b> Add Wash Buffer 2. Centrifuge at 5,600 ~ 6,000 x g for 2 min</p> <p>• <b>STEP 7:</b> Add Wash Buffer 2. Centrifuge at 5,600 ~ 6,000 x g for 10 min</p> 
<p>• <b>STEP 8. Dry the membranes of Filter Plate:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Tap the Filter Plate tips on paper towel</li> <li>Return the Filter Plate and the Collection Plate to the manifold.</li> <li>Apply vacuum at -12 inches Hg for an additional 10 min.</li> </ul>	
<p>• Stand the Filter plate on a clean paper towel at room temperature for 5 min.</p>	
<p>• <b>STEP 9. RNA Elution:</b></p>	
<p>• Add RNase-free Water to the Filter Plate. Stand for 3 min.</p> <p>• Close the manifold valve. Turn on the vacuum source to build up a vacuum to -12 inches Hg.</p> <p>• Open the manifold valve to apply vacuum to elute RNA.</p> <p><b>Alternative</b> If the consistent volume of elutes are recommend, use centrifuge protocol to proceed this elution step. (Page 3, STEP 9-1 ~ 9-4).</p> 	<p>• Add RNase-free Water to the Filter Plate. Stand for 3 min.</p> <p>• Centrifuge to elute RNA.</p> 

### 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. Wash Buffer 1, 2 開封時に 96-100%エタノール (RNase-free) を加えてください。
4. **警告:  $\beta$ -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。**
5. Buffer を安全に取り扱うために、操作前に安全情報 (製品付属の英語版プロトコール) をお読みください。
6. 分離操作の前に Lysis Buffer と DNase I solution (オプション操作を行う場合) を調製してください。  
 Lysis Buffer:  $\beta$ -メルカプトエタノールを Lysis Buffer に加え、十分に混和して 1%  $\beta$ -Me-Lysis Buffer を調製します。例) 1ml の Lysis buffer に対して 10  $\mu$ l の  $\beta$ -メルカプトエタノールを添加  
 DNase I solution: RNase-free DNase I を DNase I Reaction Buffer (1 M NaCl; 10 mM MnCl<sub>2</sub>; 20 mM Tris-HCl, pH 7.0) に加え、DNase I の最終濃度が 0.5 U/ $\mu$ l になるように調製します。調製後は 4°C で保存してください。
7. 溶出した RNA は直ちに氷上で保存してください。長期保存の場合は -70°C で凍結保存してください。

### 用意するもの

- 1) 滅菌済みのピペット、ピペットチップ (ヌクレアーゼフリー)
- 2)  $\beta$ -メルカプトエタノール
- 3) 96-100%エタノール (RNase-free)
- 4) 70%エタノール (RNase-free)
- 5) クラッシュアイス
- 6) 5,600~6,000  $\times$  g に到達可能なスイングバケット式遠心機、96-Well Plate 対応のアダプター  
オプション操作を行う場合
- 7) RNase-free DNase I および DNase I Reaction Buffer  
吸引法を用いる場合
- 8) 96-Well Plate 対応のバキュームマニホールド、-12inHg に到達可能な真空ポンプ

### サンプル量と収量

サンプル	推奨されるサンプル量		平均収量 ( $\mu$ g)
動物細胞 (最大 $1 \times 10^7$ cells)	HeLa	$1 \times 10^6$ cells	10
高収量組織 (Mouse) (最大 20 mg)	肝臓	10 mg	35
	脾臓	10 mg	45
低収量組織 (Mouse) (最大 50 mg)	胚、肺	10 mg	10
	心臓、脳	10 mg	7.5
	腎臓	10 mg	20
	腸	10 mg	15

**操作** ※操作前に「重要事項」をよくお読みください。

<吸引法>

STEP 1. サンプルの前処理と溶解

動物細胞

- ・ 最大  $1 \times 10^7$  の細胞を Collection Plate (キットに付属) の各ウェルに移します。4°C、500 × g で 5 分間遠心分離し、上清を捨てます。
- ・ 450 μl の Lysis Buffer (β-メルカプトエタノール添加) を加え、上下にピペティングし細胞を完全に懸濁させます。
- ・ 室温で 5 分間インキュベートします。

動物組織

- ・ 最大 50 mg の動物組織を Collection Plate (キットに付属) の各ウェルに移します。
- ・ 450 μl の Lysis Buffer (β-メルカプトエタノール) を加えます。
- ・ ホモジナイザーでサンプルを破碎します。
- ・ 室温で 5 分間インキュベートします。

STEP 2. ライセートの清澄化

Collection Plate に Adhesive Film で封をし、5,600~6,000 × g で 10 分間遠心分離します。

STEP 3. 結合条件の調整

- ・ 350 μl の上清を新しい Collection Plate (キットに付属、2 枚目) の各ウェルに移します。  
メモ: ペレットが混入しないよう注意してください。
- ・ 350 μl の 70%エタノール (RNase-free) を各ウェルに加え、ピペティングにより混和します。  
メモ: エタノールとライセートが完全に混和したことを確認してください。

STEP 4. RNA の結合

- ・ 新しい Collection Plate (キットに付属、3 枚目) をバキュームマニホールドに取り付け、カバーで固定します。その上に Filter Plate (キットに付属) を取り付けます。
- ・ サンプル混合物を Filter Plate に移し、2 枚目の Collection Plate を捨てます。
- ・ ウェルが空になるまで -12inHg で真空引きをします。
- ・ バキュームマニホールドを真空から解放します。
- ・ ろ液を捨て、Filter Plate と Collection Plate をバキュームマニホールドに戻します。

<オプション> DNase I による DNA の消化

- ・ 250 μl の Wash Buffer 1 (エタノール添加) を Filter Plate の各ウェルに加えます。-12inHg で 2 分間真空引きをした後、真空を解除します。
- ・ 60 μl の DNase I solution (0.5 U/μl、お客様でご用意ください) を各ウェルに加え、室温で 15 分間静置します。インキュベーション後は真空引きをせずに次の操作を行ってください。

- ・ 250  $\mu$ l の Wash Buffer 1 を各ウェルに加えます。空になるまで-12inHg で真空引きをした後、真空を解除します。ろ液を捨て、Filter Plate と Collection Plate をバキュームマニホールドに戻します。
- ・ STEP 6 へ進みます。

#### STEP 5. Wash Buffer 1 による Filter Plate の洗浄

- ・ Filter Plate の各ウェルに 500  $\mu$ l の Wash Buffer 1 (エタノール添加) を加えます。
- ・ ウェルが空になるまで-12inHg で真空引きをします。
- ・ バキュームマニホールドを真空から解放します。
- ・ ろ液を捨て、Filter Plate と Collection Plate をバキュームマニホールドに戻します。

#### STEP 6. Wash Buffer 2 による Filter Plate の洗浄

- ・ Filter Plate の各ウェルに 500  $\mu$ l の Wash Buffer 2 (エタノール添加) を加えます。
- ・ -12inHg で 2 分間真空引きをします。
- ・ バキュームマニホールドを真空から解放します。
- ・ ろ液を捨て、Filter Plate と Collection Plate をバキュームマニホールドに戻します。

#### STEP 7. Filter Plate の再洗浄

- ・ STEP 6 を繰り返します。

#### STEP 8. Filter Plate の乾燥

- ・ Filter Plate の先端を清潔なペーパータオルで軽くたたき、残った液体を取り除きます。
- ・ Filter Plate を Collection Plate に戻します。
- ・ さらに 10 分間、-12inHg で真空引きをします。
- ・ バキュームマニホールドを真空から解放します。
- ・ ろ液と 3 枚目の Collection Plate を捨てます。

#### STEP 9. RNA の溶出

代替方法: 一定量の溶出液が推奨される場合は、<遠心法>の STEP 9 の方法で溶出してください。

- ・ Elution Plate (キットに付属) を新しい Collection Plate (キットに付属、4 枚目) に取り付けます。バキュームマニホールドにカバーで固定し、その上に Filter Plate を取り付けます。(上: Filter Plate 中: Elution Plate 下: Collection Plate)
- ・ 50~75  $\mu$ l の RNase-free Water を Filter Plate の膜中央に加え、3 分間静置します。  
メモ: 溶出液は RNase-free Water の添加量よりも平均で約 25  $\mu$ l 少なくなります。  
例) 50  $\mu$ l の RNase-free Water に対して~25  $\mu$ l の溶出液が回収できます。  
メモ: 50  $\mu$ l 以下の RNase-free Water で溶出ししないでください。収量が減少する恐れがあります。  
メモ: 効果的な溶出のため、RNase-free Water が完全に吸着したことを確認してください。
- ・ バキュームマニホールドのバルブを閉じ、-12inHg で真空引きをします。
- ・ バルブを開き、RNA を溶出します。

- ・ バキュームマニホールドを真空から解放します。
- ・ Adhesive Film (キットに付属) で封をし、精製後の RNA を $-70^{\circ}\text{C}$ で保管します。

### <遠心法>

#### STEP 1. サンプルの前処理と溶解

##### 動物細胞

- ・ 最大  $1 \times 10^7$  の細胞を Collection Plate (キットに付属) の各ウェルに移します。 $4^{\circ}\text{C}$ 、 $500 \times g$  で 5 分間遠心分離し、上清を捨てます。
- ・  $450 \mu\text{l}$  の Lysis Buffer ( $\beta$ -メルカプトエタノール添加) を加え、上下にピペティングし細胞を完全に懸濁させます。
- ・ 室温で 5 分間インキュベートします。

##### 動物組織

- ・ 最大 50 mg の動物組織を Collection Plate (キットに付属) の各ウェルに移します。
- ・  $450 \mu\text{l}$  の Lysis Buffer ( $\beta$ -メルカプトエタノール添加) を加えます。
- ・ ホモジナイザーでサンプルを破碎します。
- ・ 室温で 5 分間インキュベートします。

#### STEP 2. ライセートの清澄化

Collection Plate に Adhesive Film で封をし、 $5,600 \sim 6,000 \times g$  で 10 分間遠心分離します。

#### STEP 3. 結合条件の調整

- ・  $350 \mu\text{l}$  の上清を新しい Collection Plate (キットに付属、2 枚目) の各ウェルに移します。  
メモ: ペレットが混入しないよう注意してください。
- ・  $350 \mu\text{l}$  の 70%エタノール (RNase-free) を各ウェルに加え、ピペティングにより混和します。  
メモ: エタノールとライセートが完全に混和したことを確認してください。

#### STEP 4. RNA の結合

- ・ Filter Plate (キットに付属) を新しい Collection Plate (キットに付属、3 枚目) に取り付けます。
- ・ サンプル混合物を Filter Plate に移し、2 枚目の Collection Plate を捨てます。
- ・ 組み合わせたプレートを  $5,600 \sim 6,000 \times g$  で 2 分間遠心分離します。
- ・ ろ液を捨て、Filter Plate を Collection Plate に戻します。

### <オプション>DNase Iによる DNA の消化

- ・  $250 \mu\text{l}$  の Wash Buffer 1 (エタノール添加) を Filter Plate の各ウェルに加え、 $5,600 \sim 6,000 \times g$  で 5 分間遠心分離します。ろ液を捨て、Filter Plate を Collection Plate に戻します。
- ・  $60 \mu\text{l}$  の DNase I solution ( $0.5 \text{ U}/\mu\text{l}$ 、お客様でご用意ください) を各ウェルに加え、室温で 15 分間静置します。インキュベーション後は遠心分離をせずに次の操作を行ってください。

- 250  $\mu$ l の Wash Buffer 1 を各ウェルに加え、5,600~6,000  $\times$  g で 2 分間遠心分離します。ろ液を捨て、Filter Plate を Collection Plate に戻します。
- STEP 6 へ進みます。

#### STEP 5. Wash Buffer 1 による Filter Plate の洗浄

- Filter Plate の各ウェルに 500  $\mu$ l の Wash Buffer 1 (エタノール添加) を加えます。
- 5,600~6,000  $\times$  g で 2 分間遠心分離します。
- ろ液を捨て、Filter Plate を Collection Plate に戻します。

#### STEP 6. Wash Buffer 2 による Filter Plate の洗浄

- Filter Plate の各ウェルに 500  $\mu$ l の Wash Buffer 2 (エタノール添加) を加えます。
- 5,600~6,000  $\times$  g で 2 分間遠心分離します。
- ろ液を捨て、Filter Plate を Collection Plate に戻します。

#### STEP 7. Filter Plate の再洗浄

- Filter Plate の各ウェルに 500  $\mu$ l の Wash Buffer 2 (エタノール添加) を加えます。
- 5,600~6,000  $\times$  g で 10 分間遠心分離します。
- ろ液と 3 枚目の Collection Plate を捨てます。

#### STEP 8. Filter Plate の乾燥

Filter Plate をペーパータオル (お客様でご用意ください) の上に置き、室温で 5 分間静置します。

#### STEP 9. RNA の溶出

- Elution Plate (キットに付属) を新しい Collection Plate (キットに付属、4 枚目) に取り付け、その上に Filter Plate を取り付けます。(上: Filter Plate 中: Elution Plate 下: Collection Plate)
- 50~75  $\mu$ l の RNase-free Water を Filter Plate の膜中央に加え、3 分間静置します。  
メモ: 溶出液は RNase-free Water の添加量よりも平均で約 25  $\mu$ l 少なくなります。  
例) 50  $\mu$ l の RNase-free Water に対して ~25  $\mu$ l の溶出液が回収できます。  
メモ: 50  $\mu$ l 以下の RNase-free Water で溶出ししないでください。収量が減少する恐れがあります。  
メモ: 効果的な溶出のため、RNase-free Water が完全に吸着したことを確認してください。
- 組み合わせたプレートを 5,600~6,000  $\times$  g で 5 分間遠心分離します。
- Elution Plate を取り出し、Adhesive Film (キットに付属) で封をします。精製後の RNA を -70°C で保管します。