

## FavorPrep™ Tissue Total RNA Mini Kit

Cat: FATRK 000-Mini(4 回分) / FATRK 001(50 回分) / FATRK 001-1(100 回分) / FATRK 001-2(300 回分)

本製品は研究用です

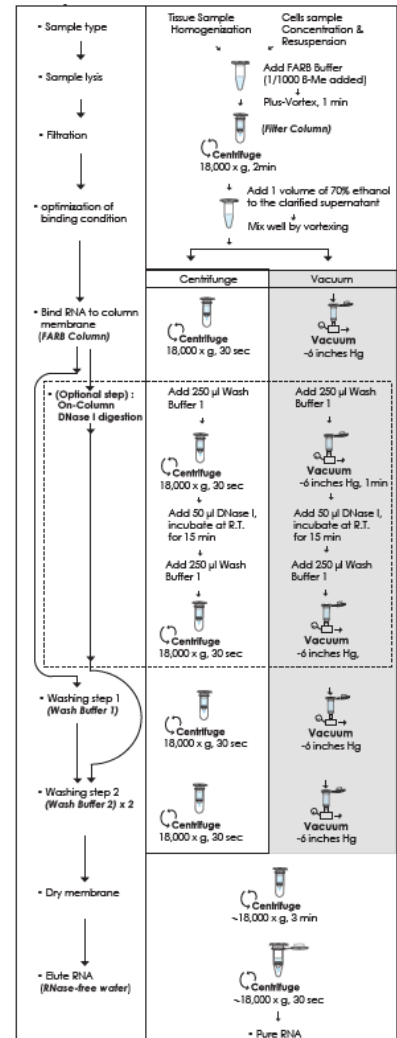
v 230217

### キットの内容

	FATRK 000-Mini (4 preps_sample)	FATRK 001 (50 preps)	FATRK 001-1 (100 preps)	FATRK 001-2 (300 preps)
FARB Buffer	1.5 ml × 2	25 ml	45 ml	130 ml
Wash Buffer 1	1.5 ml × 2	30 ml	60 ml	170 ml
Wash Buffer 2	1.5 ml	15 ml	35 ml	50 ml × 2
(concentrated) *				
RNase-free Water	0.5 ml	6 ml	6 ml	8 ml × 2
Filter Columns	4 pcs	50 pcs	100 pcs	300 pcs
FARB Mini Columns	4 pcs	50 pcs	100 pcs	300 pcs
Collection Tubes	8 pcs	100 pcs	200 pcs	600 pcs
Elution Tube	4 pcs	50 pcs	100 pcs	300 pcs
Micropestles	4 pcs	50 pcs	100 pcs	300 pcs
*添加する 96-100%エタノール量				
Wash Buffer 2	6 ml	60 ml	140 ml	200 ml
(concentrated)				

### 基本情報

構成	シリカメンブレン法 (ミニスピナラム)
操作時間	30~60 分
RNA サイズ	>200 bp
結合量	最大 100 μg RNA/column
溶出量	30~50 μl
操作方法	遠心法 もしくは 吸引法



## サンプル量と収量

サンプル	推奨されるサンプル量		収量 (μg)
動物細胞 (最大 $5 \times 10^6$ )	NIH/3T3	$1 \times 10^6$ cells	10
	HeLa		15
	COS-7		30
	LMH		12
動物組織 (Mouse/rat) (最大 30 mg)	胚	10 mg	25
	心臓		10
	脳		10
	腎臓		30
	肝臓		50
	脾臓		35
	肺 胸線		15 45
細菌	E. coli	$1 \times 10^9$ cells	60
	B. subtilis		40
酵母 (最大 $5 \times 10^7$ )	S. cerevisiae	$1 \times 10^7$ cells	25

## 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: 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. 遠心分離は、最大速度 (~18,000 × g) で行ってください。
5. Wash Buffer 2 開封時に RNase-free エタノール(96-100%)を加えてください。
6. Buffer を安全に取り扱うために、手順を開始する前に安全情報 (製品付属の英語版プロトコール) をお読みください。
7. <動物細胞>のオプション操作を行う場合は、50 μl/prep の RNase-free DNase I solution (0.5 U/μl) を準備してください。

推奨: 3 μl の DNase エンドリボヌクレアーゼ (10 U/μl) を 57 μl の DNase I solution (1 M NaCl; 10 mM MnCl<sub>2</sub> または MgCl<sub>2</sub>; 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 at 25°C) に加え、最終的な DNase I の濃度が 0.5 U/μl になるように調製してください。

## ✚ (吸引法を用いる場合)バキュームマニホールド及び真空装置

下記 2 点をご確認ください。

- ① 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ているか
- ② 真空圧が $\approx -6$  inHg に到達可能か

### ■ 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)	101,325.000
kilopascal (KPa)	101.325
torr (torr)	760.000
pound per square inch (psi, lbs/in <sup>2</sup> )	14.700

## ✚ 準備するもの

### 全プロトコール共通

- ・滅菌済みピペット、ピペットチップ、遠心チューブ (1.5 ml、2.0 ml)
- ・96-100%エタノール (Wash Buffer 2 の調製用)
- ・18,000 × g まで到達可能な遠心分離機と、1.5 ml または 2.0 ml 用ローター

### 吸引法を用いる場合

- ・バキュームマニホールド及び真空装置

## ✚ 操作 ※操作前に「重要事項」をよくお読みください。

### <動物細胞>

必要なもの:  $\beta$ -メルカプトエタノール、70%エタノール (RNase-free)

1. 4°C、300 × g で 5 分間遠心分離し  $1 \sim 5 \times 10^6$  個の細胞を回収します。上清を取り除きます。  
メモ: サンプルが多すぎると、溶解が不完全になり RNA の収量・精製度が低下につながります。
2. 350  $\mu$ l の FARB Buffer と 3.5  $\mu$ l の  $\beta$ -メルカプトエタノールをペレットに加えます。1 分間ボルテックスし、細胞を完全に再懸濁します。  
メモ: ボルテックス後にも細胞の塊が見受けられる場合は、ピペティングで壊してください。
3. Filter Column を Collection Tube へ取り付け、サンプル溶液を加えます。その後、18,000 × g で 2 分間遠心分離します。
4. 上清を新しい遠心チューブ (お客様でご用意ください) に移しサンプルの体積を量ってください。Filter Column と Collection Tube は廃棄します。  
メモ: 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 70%エタノール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、エタノールを加えたサンプル（沈殿物を含む）を FARB Mini column へ加えます。  
＜遠心法＞  
18,000×g で 30 秒間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini column を Collection Tube に戻します。  
＜吸引法＞  
カラムが空になるまで-6 inHg で真空引きをし、マニホールドの真空を解除します。
7. <オプション>ゲノム DNA を除去する場合
  - A) 250 μl の Wash Buffer 1 を FARB Mini Column へ加えます。  
＜遠心法＞  
18,000×g で 30 秒間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini Column を Collection Tube に戻します。  
＜吸引法＞  
-6 inHg で 1 分間真空引きをし、マニホールドの真空を解除します。
  - B) 50 μl の RNase-free DNase I solution (0.5 U/μl, お客様で調整してください) を FARB Mini Column の膜中央へ加え、15 分間静置します。
  - C) 250 μl の Wash Buffer 1 を FARB Mini Column へ加えます。  
＜遠心法＞  
18,000×g で 30 秒間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini Column を Collection Tube に戻します。  
＜吸引法＞  
カラムが空になるまで-6 inHg で真空引きをし、マニホールドの真空を解除します。
  - D) ステップ 9 へ進みます。
8. 500 μl の Wash Buffer 1 を FARB Mini Column へ加えます。  
＜遠心法＞  
18,000×g で 30 秒間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini column を Collection Tube に戻します。  
＜吸引法＞  
カラムが空になるまで-6 inHg で真空引きをし、マニホールドの真空を解除します。
9. 750 μl の Wash Buffer 2 を FARB Mini Column へ加えます。  
＜遠心法＞  
18,000×g で 30 秒間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini Column を Collection Tube に戻します。  
＜吸引法＞  
カラムが空になるまで-6 inHg で真空引きをし、マニホールドの真空を解除します。  
\* 注意: Wash Buffer 2 にエタノールが添加されていることを確認してください。
10. ステップ 9 を繰り返し、もう一回洗浄してください。
11. さらに 18,000×g で 3 分間遠心分離し、FARB Mini Column を乾燥させ、ろ液を捨てます。  
重要ステップ! : この操作は酵素処理を阻害する物質を取り除くために重要です。
12. FARB Mini Column を Elution Tube (キットに付属) へ取り付けます。
13. 30~50 μl の RNase-free ddH<sub>2</sub>O を FARB Mini Column の膜中央に加え、室温で 1 分間静置します。  
重要ステップ! : 効率よく溶出させるため、RNase-free ddH<sub>2</sub>O を完全に吸着させてください。  
\* 30 μl より少量で溶出した場合、収量が低下する恐れがあります。

14. 18,000 × g で 30 秒間遠心分離し、RNA を溶出し-70°Cで保管します。

#### <動物組織>

必要なもの: 液体窒素、乳鉢、乳棒

破砕機 もしくは 20G の注射針を装着したシリンジ

β-メルカプトエタノール、70%エタノール (RNase-free)

A-1. 最大 30mg の組織サンプルを液体窒素と乳鉢、乳棒で粉々に粉砕し、新しいチューブ (お客様でご用意ください) に移します。

メモ: 計量や粉砕時にサンプルが溶けないようにしてください。

A-2. 350 μl の FARB Buffer と 3.5 μl の β-メルカプトエタノールを加えます。サンプルを破砕機もしくは 20 G の注射針を装着したシリンジに 10 回通して粉砕し、室温で 5 分間インキュベートします。

重要ステップ! : 硬いサンプルから RNA を抽出する場合、適切な破砕機 (回転式ホモジナイザーなど) を使用することを推奨します。

A-3. <動物細胞>のステップ 3 へ進みます。

#### 【別方法】

B-1. 最大 30mg のサンプルをチューブに入れ、350 μl の FARB Buffer と 3.5 μl 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、組織サンプルを十分にすり潰します。

B-2. サンプルを 20 G の注射針を装着したシリンジ 10~20 回通して粉砕し、室温で 5 分間インキュベートしてください。

メモ: 胞量が少ない又は破壊しにくいサンプルは、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>のステップ 3 へ進んでください。

#### <細菌>

必要なもの: β-メルカプトエタノール、70%エタノール (RNase-free)

ウォーターバス もしくは ヒーティングブロック (30°C)

2 ml スクリュー遠心チューブ

Lysozyme reaction solution (10 mg/ml lysozyme; 20mM Tris-HCl, pH 8.0; 2mM EDTA; 1.2% Triton)

酸処理済みガラスビーズ (500~700 μm)

1. 最大  $1 \times 10^9$  cell の培養液を 2ml のスクリュー遠心チューブ (お客様でご用意ください) へ移します。

メモ: サンプル量から推測して total RNA の収量がカラム結合量 (100 μg) を超えないようにしてください。

超過する場合、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. 4°C、18,000 × g で 2 分間遠心分離し、上清を捨てます。

3. 100 μl の Lysozyme reaction solution を加えます。ピペティングでペレットを再懸濁し、37°Cで 10 分間インキュベートします。

4. 350 μl の FARB Buffer と 3.5 μl の β-メルカプトエタノールを加えます。

5. 250 mg の酸処理済みガラスビーズ (500~700 μm) を加えます。5 分間ボルテックスし、細胞を破砕します。

- 18,000 × g で 2 分間遠心分離します。上清を新しいチューブ（お客様でご用意ください）に移し、上清の体積を量ります。

メモ：ペレットの断片を混入させないようにしてください。

- <動物細胞>のステップ 5 へ進みます。

#### <酵母>

必要なもの：β-メルカプトエタノール、70%エタノール（RNase-free）

A) 酵素処理による破碎：Lyticase もしくは zymolyase

Sorbitol Buffer (1M sorbitol; 100mM EDTA; 0.1% β-メルカプトエタノール)

ウォーターバス もしくは ヒーティングブロック (30°C)

B) 化学的手法による破碎：2 ml のスクリュウ遠心チューブ

酸処理済みガラスビーズ (500~700 μm)

- 4°C、5,000 × g で 10 分間遠心分離し、最大  $5 \times 10^7$  の酵母を収集します。上清は捨てます。

- A) 酵素処理による破碎

A-1 ペレットを 600 μl の Sorbitol Buffer で再懸濁し、200 U の Lyticase もしくは zymolyase を加えて 30°C で 30 分間インキュベートします。

メモ：Sorbitol Buffer は使用直前に調製してください。

A-2. 300 × g で 5 分間遠心分離し、上清を捨てます。

A-3. 350 μl の FARB Buffer と 3.5 μl の β-メルカプトエタノールを加えます。1 分間ボルテックスし、スフェロプラストを破碎します。室温で 5 分間インキュベートします。

- B) 化学的手法による破碎

B-1. 350 μl の FARB Buffer と 3.5 μl の β-メルカプトエタノールを加え、ボルテックスで細胞を完全に懸濁します。

B-2. サンプル溶液を 2 ml のスクリュウ遠心チューブに移し、250 mg の酸処理済みガラスビーズ (500 ~ 700 μm) を加えます。15 分間ボルテックスし、細胞を破碎します。

- <動物細胞>のステップ 5 へ進みます。

#### <パラフィン包埋組織>

必要なもの：キシレン、エタノール (96-100%)

液体窒素、乳鉢、乳棒

破碎機 もしくは 20G の注射針を装着したシリンジ

β-メルカプトエタノール、70%エタノール (RNase-free)

- 最大 15mg のパラフィン包埋組織をチューブ（お客様ご自身でご用意ください）に移します。

\* サンプル量をなるべく減らすよう、余分なパラフィンを除去してください。

- 0.5 ml のキシレンを加えて十分に混ぜ、室温で 10 分間インキュベートします。
- 18,000 × g で 3 分間遠心分離し、ピペットで上清を捨てます。
- 0.25 ml のキシレンを加えて十分に混ぜ、室温で 3 分間インキュベートします。
- 18,000 × g で 3 分間遠心分離し、ピペットで上清を捨てます。

6. ステップ 4 と 5 を繰り返します。
7. 0.3 ml のエタノール (96-100%) を加えて脱パラフィン化させます。ボルテックスでよく混ぜ、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、ピペットで上清を捨てます。
9. ステップ 7 と 8 を繰り返します。
10. <動物組織>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>のステップ 3 へ進みます。

#### <RNA クリーンアップ>

必要なもの:エタノール (96-100%)

1. 100 μl の RNA サンプルをチューブ (お客様でご用意ください) に移します。  
\* サンプルの RNA が 100 μl 未満の場合は、RNase-free water を加えて 100 μl にしてください。
2. 300 μl の FARB Buffer と 300 μl のエタノールを加え、ボルテックスでよく混ぜます。
3. FARB Mini Column を Collection Tube へ取り付け、エタノールを加えたサンプルを FARB Mini Column に移します。18,000 × g で 1 分間遠心分離し、ろ液を捨てて FARB Mini Column を Collection Tube に戻します。
4. <動物細胞>のステップ 8 へ進みます。

#### ✚トラブルシューティング

低収量	
サンプルの保存状態が悪い、または繰り返し解凍している。	長期保存の場合は、-80°C以下で保管してください。凍結したサンプルの解凍は 1 回までとする。
RNA の分解	高品質の RNA を得るために採取後のサンプルは以下のように処理してください。 1) すぐに抽出操作をする 2) 凍結 (-80°C) 保存 3) すぐに中間溶液 (RNA 保存液) で安定化させる
FARB Buffer との混合が不十分	サンプル混合液をさらにボルテックスして混和する。
RNA の結合条件が最適化されていない	ライセートにエタノールが添加されていない(ステップ 5)、またはエタノールの濃度が正しくない。
RNA の溶出が正しく行われていない	RNase-free Water が FARB Column の膜中央に添加され、完全に吸収されたことを確認してください。
Wash Buffer 2 の調製に誤りがあった	Wash Buffer2 に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、FARB Mini Column を 18,000 x g で 3 分間遠心分離してください。(ステップ 11)