

## FavorPrep™ Tissue/Cultured Cells Total RNA Maxi Kit

Cat: FATRK 003-S (2 回分) / FATRK 003 (10 回分)

本製品は研究用です

v 230224

### 📌 キットの内容

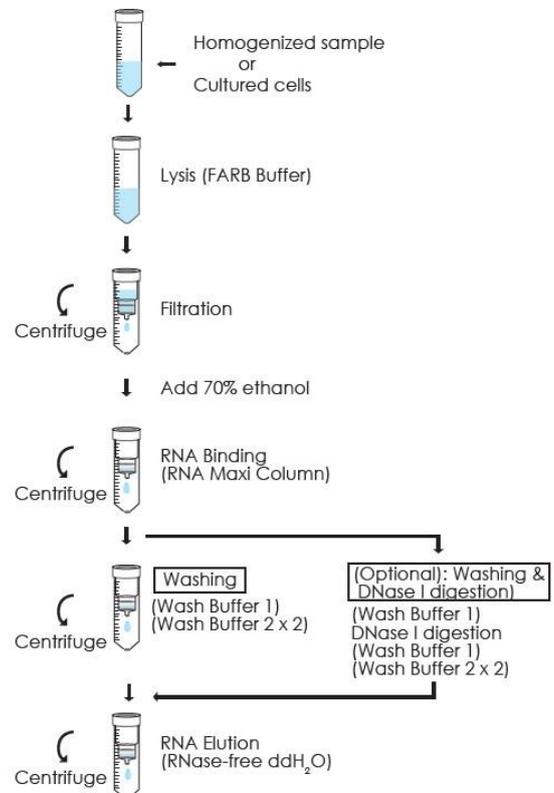
	FATRK 003-S (2 preps_sample)	FATRK 003 (10 preps)
FARB Buffer	30 ml	150 ml
Wash Buffer 1	30 ml	150 ml
Wash Buffer 2 (concentrated)*	12 ml	50 ml
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	5 ml	15 ml
Filter Columns	2 pcs	10 pcs
RNA Maxi Columns	2 pcs	10 pcs
50 ml centrifuge tubes	4 pcs	20 pcs
<b>*添加する 96-100%エタノール量</b>		
Wash Buffer 2 (concentrated)	48 ml	200 ml

### 📌 基本情報

構成	シリカメンブレン法 (マキシスピナラム)
操作時間	60 分
結合量	最大 2,000 $\mu$ g total RNA/column
最小溶出量	500 $\mu$ l
操作方法	遠心法 もしくは 吸引法

### 📌 サンプル量

サンプル	推奨されるサンプル量
動物組織	$\leq 650$ mg
動物細胞	$\leq 1.5 \times 10^8$ cells
細菌	$\leq 3 \times 10^{10}$ cells
酵母	$\leq 1 \times 10^9$ cells



### 🚩 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:  $\beta$ 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。**
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。
5. 遠心分離は、RNA が均一に吸着するようスイングバケット式遠心機で 4,500~6,000  $\times g$  で行ってください。
6. ゲノム DNA 除去のオプション操作を行う場合は、RNase-free DNase I solution (1 M NaCl; 10 mM MnCl<sub>2</sub>; 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 at 25°C) を調製し、DNase I の最終濃度を 0.5 U/ $\mu$ l にしてください。

### 🚩 準備するもの

- 1) 50 ml チューブ
- 2)  $\beta$ -メルカプトエタノール
- 3) 70%エタノール (RNase-free)
- 4) 50 ml チューブ用スイングバケット式遠心機
- 5) オーブン (55°C)

### 🚩 操作 ※操作前に「重要事項」をよくお読みください。

<動物組織>

必要なもの: 液体窒素、乳鉢、乳棒

ローターステーター式ホモジナイザー

1.  $\leq 650$  mg のサンプルを液体窒素と乳鉢、乳棒で粉々に粉砕し、50 ml 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解凍しないようにしてください。
2. 14 ml の FARB Buffer と 0.14 ml の  $\beta$ -メルカプトエタノールを加えます。サンプルをローターステーター式ホモジナイザーで均質化し、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、ローターステーター式ホモジナイザーなど適切な破砕機の使用を推奨します。
3. Filter Column を 50 ml centrifuge tube (キットに付属) へ取り付け、サンプル混合物を移します。キャップを閉め、4,500  $\times g$  で 5 分間遠心分離します。
4. 12 ml の上清を新しい 50 ml チューブ (お客様でご用意ください) に移します。  
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. 12 ml の 70%エタノール (RNase-free) を加え、ボルテックスで 5 秒間混和します。
6. RNA Maxi Column を新しい 50 ml centrifuge tube (キットに付属) へ取り付け、12mlまでのサンプル混合物を移します。キャップを閉め、4,500  $\times g$  で 2 分間遠心分離します。ろ液を捨て、RNA Maxi Column を 50 ml centrifuge tube に戻します。
7. 残りのサンプル混合物について、ステップ 6 を繰り返します。

8. <オプション>ゲノム DNA を除去する場合

- A) 5 ml の Wash Buffer 1 を RNA Maxi Column へ加えます。キャップを閉め、4,500 × g で 2 分間遠心分離します。ろ液を捨て、RNA Maxi Column を 50 ml centrifuge tube に戻します。
  - B) 500 μl の RNase-free DNase I solution (0.5 U/μl, お客様で調整してください) を RNA Maxi Column の膜中央へ加え、ベンチトップで 15 分間静置します。
  - C) 5 ml の Wash Buffer 1 を RNA Maxi Column へ加えます。キャップを閉め、4,500 × g で 2 分間遠心分離します。ろ液を捨て、RNA Maxi Column を 50 ml centrifuge tube に戻します。
  - D) ステップ 10 へ進みます。
9. 10 ml の Wash Buffer 1 を RNA Maxi Column へ加えます。キャップを閉め、4,500 × g で 2 分間遠心分離します。ろ液を捨て、RNA Maxi Column を 50 ml centrifuge tube に戻します。
10. 12 ml の Wash Buffer 2 を RNA Maxi Column へ加えます。キャップを閉め、4,500 × g で 2 分間遠心分離します。ろ液を捨て、RNA Maxi Column を 50 ml centrifuge tube に戻します。  
\* Wash Buffer 2 に RNase-free エタノール (96-100%) が添加されていることを確認してください。
11. ステップ 10 を繰り返し、再度洗浄してください。さらに 12 ml の Wash Buffer 2 を RNA Maxi Column へ加えます。キャップを閉め、4,500~6,000 × g で 10 分間遠心分離し、ろ液を捨てます。
12. RNA Maxi Column を新しい 50 ml チューブ (お客様でご用意ください) に取り付けます。
13. RNA Maxi Column を 55°C のオーブンで 10 分間インキュベートします。  
重要ステップ! : カラムを完全に乾燥させるため、必ず 10 分間インキュベートしてください。
14. 500 μl の RNase-free ddH<sub>2</sub>O を RNA Maxi Column の膜中央に加え、室温で 2 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 が完全に吸着したことを確認してください。
15. キャップを閉め、4,500~6,000 × g で 2 分間遠心分離し、RNA を溶出します。
16. 精製した RNA をそのままアプリケーションで使用しない場合は -70°C で保管します。

<動物細胞>

1. サンプルを 50 ml チューブ (お客様でご用意ください) に移し、4°C、300 × g で 5 分間遠心分離し、 $\leq 1.5 \times 10^8$  cells の細胞を回収します。また、上清をすべて取り除きます。  
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. 14 ml の FARB Buffer と 0.14 ml の β-メルカプトエタノールをペレットに加えます。1 分間ボルテックスで激しく攪拌し、細胞を完全に懸濁させます。その後、室温で 5 分間インキュベートします。  
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、上下にピペティングして破碎してください。
3. Filter Column を 50 ml centrifuge tube (キットに付属) へ取り付け、サンプル混合物を移します。キャップを閉め、4,500 × g で 5 分間遠心分離します。
4. 12 ml の上清を新しい 50 ml チューブ (お客様でご用意ください) に移します。  
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. 12 ml の 70% エタノール (RNase-free) を加え、ボルテックスで 5 秒間混和します。
6. RNA Maxi Column を新しい 50 ml centrifuge tube (キットに付属) へ取り付け、サンプル混合物を移します。キャップを閉め、4,500 × g で 2 分間遠心分離します。ろ液を捨て、RNA Maxi Column を 50 ml centrifuge tube に戻します。

7. 残りのサンプル混合物について、ステップ 6 を繰り返します。
8. <オプション>ゲノム DNA を除去する場合
  - A) 5 ml の Wash Buffer 1 を RNA Maxi Column へ加えます。キャップを閉め、4,500 × g で 2 分間遠心分離します。ろ液を捨て、RNA Maxi Column を 50 ml centrifuge tube に戻します。
  - B) 500 μl の RNase-free DNase I solution (0.5 U/μl, お客様で調整してください) を RNA Maxi Column の膜中央へ加え、ベンチトップで 15 分間静置します。
  - C) 5 ml の Wash Buffer 1 を RNA Maxi Column へ加えます。キャップを閉め、4,500 × g で 2 分間遠心分離します。ろ液を捨て、RNA Maxi Column を 50 ml centrifuge tube に戻します。
  - D) ステップ 10 へ進みます。
9. 10 ml の Wash Buffer 1 を RNA Maxi Column へ加えます。キャップを閉め、4,500 × g で 2 分間遠心分離します。ろ液を捨て、RNA Maxi Column を 50 ml centrifuge tube に戻します。
10. 12 ml の Wash Buffer 2 を RNA Maxi Column へ加えます。キャップを閉め、4,500 × g で 2 分間遠心分離します。ろ液を捨て、RNA Maxi Column を 50 ml centrifuge tube に戻します。

\* Wash Buffer 2 に RNase-free エタノール (96-100%) が添加されていることを確認してください。
11. ステップ 10 を繰り返し、再度洗浄してください。さらに 12 ml の Wash Buffer 2 を RNA Maxi Column へ加えます。キャップを閉め、4,500~6,000 × g で 10 分間遠心分離し、ろ液を捨てます。
12. RNA Maxi Column を新しい 50 ml チューブ (お客様でご用意ください) に取り付けます。
13. RNA Maxi Column を 55°C のオーブンで 10 分間インキュベートします。

重要ステップ! : カラムを完全に乾燥させるため、必ず 10 分間インキュベートしてください。
14. 500 μl の RNase-free ddH<sub>2</sub>O を RNA Maxi Column の膜中央に加え、室温で 2 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 が完全に吸着したことを確認してください。
15. キャップを閉め、4,500~6,000 × g で 2 分間遠心分離し、RNA を溶出します。
16. 精製した RNA をそのままアプリケーションで使用しない場合は -70°C で保管します。

#### <細菌>

必要なもの: ウォーターバス もしくは ヒーティングブロック (37°C)

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.  $\leq 3 \times 10^{10}$  cell の培養液を 50 ml チューブ (お客様でご用意ください) へ移します。

メモ: total RNA の収量がカラム結合量 (2,000 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  $\leq 1.5 \times 10^{10}$  にしてください。
2. 4°C、4,500~6,000 × g で 5 分間遠心分離し、上清をすべて捨てます。
3. 1 ml の Lysozyme reaction solution を加えます。上下にピペティングしてペレットを懸濁させ、37°C で 10 分間インキュベートします。
4. 14 ml の FARB Buffer と 0.14 ml の β-メルカプトエタノールを加えます。
5. 500 mg の酸処理済みガラスビーズ (500~700 μm) を加えます。5 分間激しくボルテックスし、細胞を破碎します。

6. 室温で5分間インキュベートします。
7. <動物細胞>のステップ3へ進みます。

<酵母>

必要なもの:Lyticase もしくは zymolyase

Sorbitol Buffer (1M sorbitol; 100mM EDTA; 0.1%  $\beta$ -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)

1. 4°C、4,500 × g で5分間遠心分離し、 $\leq 1 \times 10^9$  の酵母を回収します。また、上清は捨てます。
2. ペレットを2.4 ml の Sorbitol Buffer で再懸濁させます。  
メモ: Sorbitol Buffer は使用直前に調製してください。
3. 800 U の Lyticase もしくは zymolyase を加え、30°Cで30分間インキュベートします。
4. 300 × g で5分間遠心分離し、スフェロプラストをペレット化します。また、上清をすべて捨てます。
5. 14 ml の FARB Buffer と0.14 ml の  $\beta$ -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。その後、室温で5分間インキュベートします。
6. <動物細胞>のステップ3へ進みます。