

## FavorPrep™ Viral DNA/RNA Kit

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

本製品は研究用です

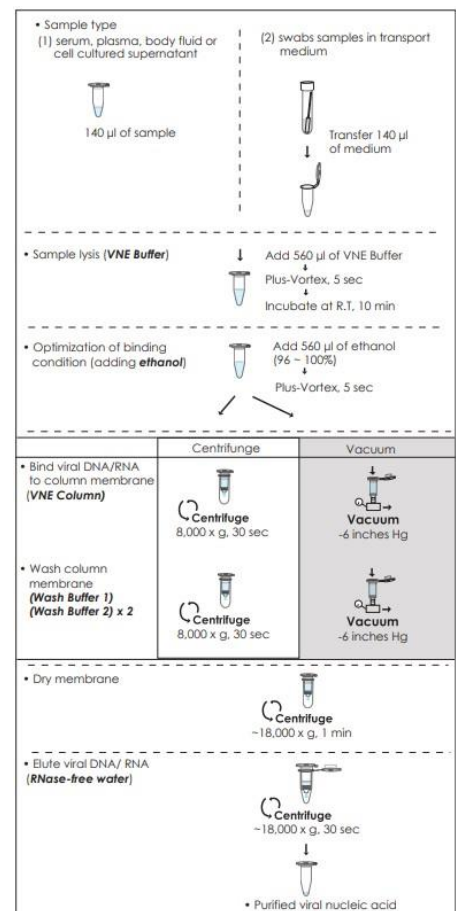
v 221109

### 📌 キットの内容

	FAVNK 000-1 (4 preps_sample)	FAVNK 001 (50 preps)	FAVNK 001-1 (100 preps)	FAVNK 001-2 (300 preps)
VNE Buffer	1.8 ml × 2	35 ml	70 ml	200 ml
Carrier RNA	0.04 mg	0.4 mg	0.8 mg	2.2 mg
Wash Buffer 1 (concentrated)*	0.48 ml × 2	12 ml	24 ml	72 ml
Wash Buffer 2 (concentrated) *	1.5 ml	20 ml	20 ml × 2	50 ml × 2
RNase-free Water	0.5 ml	6 ml	12 ml	20 ml
VNE 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
<b>*添加する 96-100%エタノール量</b>				
Wash Buffer 1 (concentrated)	0.72 ml × 2	18 ml	36 ml	108 ml
Wash Buffer 2 (concentrated)	6 ml	80 ml	80 ml × 2	200 ml × 2

### 📌 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	血清、血漿、体液、細胞培養上清: 140 μl
操作時間	< 20 分
回収率	80-90 %
フラグメントサイズ	> 200 bp
結合量	60 μg RNA/column
溶出量	40-60 μl
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. 凍結した血漿または血清の解凍は、1回までにしてください。
4. 血漿または血清サンプルに沈殿物が見られる場合は、6,000 × g で3分間遠心分離し、上清を新しいバイアルに移して直ちに処理してください。
5. VNE Buffer は開封時に Carrier RNA が入ったチューブに1 ml 加えて十分にボルテックスし、容器に戻して残りの VNE Buffer と混ぜてください。調製後は 4°C で保存してください。
6. Wash Buffer 1, 2 は開封時に RNase-free エタノール (96–100%) を加えてください。
7. 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。

### (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 $\leq -6$  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

- ・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
- ・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
- ・ボルテックスミキサー
- ・遠心チューブ (1.5 ml、2.0 ml) を 60°C と 70°C に温める加温装置

#### 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。

### <遠心法>

#### サンプルタイプ

A) 血清、血漿、体液、細胞培養上清などの無細胞体液

1-A1. サンプルの入ったチューブを軽くスピンドウンして、チューブ壁に付着した液滴を降下させます。

メモ: 沈殿物が見られる場合は、サンプルを 7,000 x g で 3 分間遠心分離してください。

1-A2. 140 µl の液体サンプル（上澄み）をチューブ（お客様でご用意ください）に移します。

B) 輸送用スワブの培地

1-B1. サンプルの入ったチューブをボルテックスして軽くスピンドウンし、チューブ壁に付着した液滴を降下させます。

1-B2. 140 µl の培地をチューブ（お客様でご用意ください）に移します。

#### サンプルの溶解

2. 560 µl の VNE Buffer (Carrier RNA 添加) を加えます(重要事項参照)。ボルテックスでよく混ぜ、室温で 10 分間インキュベートします。

#### 結合条件の最適化

3. 560 µl のエタノール(96-100%)をサンプル混合物に加え、ボルテックスでよく混ぜます。

#### ウイルス DNA/RNA の結合

4. VNE Column を Collection Tube (キットに付属) に取り付け、最大 700 µl のサンプル混合物を移します。

8,000 x g で 1 分間遠心分離し、ろ液を捨てます。VNE Column は Collection Tube に戻します。

5. 残りのサンプル混合物を VNE Column に移します。8,000 x g で 1 分間遠心分離し、ろ液と Collection Tube を捨てます。VNE Column を新しい Collection Tube (キットに付属) に取り付けます。

#### カラムメンブレンの洗浄

6. VNE Column に 500 µl の Wash Buffer 1 を加えます。8,000 x g で 1 分間遠心し、ろ液を捨てます。VNE Column を Collection Tube に戻します。

\* Wash Buffer 1 にエタノール(96-100%)を添加していることを確認してください。

7. VNE Column に 650 µl の Wash Buffer 2 を加えます。8,000 x g で 1 分間遠心し、ろ液を捨てます。VNE Column を Collection Tube に戻します。

\* Wash Buffer 2 にエタノール(96-100%)を添加していることを確認してください。

8. ステップ 7 を繰り返します。

#### メンブレンの乾燥

9. 最大速度 (~18,000 x g) で 1 分間遠心分離し、VNE Column を乾燥させます。ろ液と Collection Tube 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の重要です。

### ウイルス RNA の溶出

10. VNE Column を Elution Tube (キットに付属) に取り付けます。VNE Column の膜中心に 40~60  $\mu\text{l}$  の RNase-free Water を加えます。VNE Column を 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、Elution Buffer をカラム膜中央へ加え、完全に吸着させてください
11. 最大速度 (~18,000 x g) で 1 分間遠心分離し、ウイルス DNA/RNA を溶出します。溶出したウイルス DNA/RNA は -70°C で保存します。

### <吸引法>

#### サンプルタイプ

- A) 血清、血漿、体液、細胞培養上清などの無細胞体液
  - 1-A1. サンプルの入ったチューブを軽くスピンドウンして、チューブ壁に付着した液滴を降下させます。  
メモ: 沈殿物が見られる場合は、サンプルを 7,000 x g で 3 分間遠心分離します。
  - 1-A2. 140  $\mu\text{l}$  の液体サンプル (上澄み) をチューブ (お客様でご用意ください) に移します。
- B) 輸送用スワブの培地
  - 1-B1. サンプルの入ったチューブをボルテックスして軽くスピンドウンし、チューブ壁に付着した液滴を降下させます。
  - 1-B2. 140  $\mu\text{l}$  の培地をチューブ (お客様でご用意ください) に移します。

### サンプルの溶解

2. 560  $\mu\text{l}$  の VNE Buffer (Carrier RNA 添加) を加えます。(重要事項を参照)ボルテックスでよく混ぜ、室温で 10 分間インキュベートします。

### 結合条件の最適化

3. 560  $\mu\text{l}$  のエタノール (96-100%) をサンプル混合物に加え、ボルテックスでよく混ぜます。

### ウイルス DNA/RNA の結合

4. VNE Column の先端をバキュームマニホールドのアダプターに取り付けます。最大 700  $\mu\text{l}$  のサンプル混合物を移し、カラムが空になるまで -6 inHg で吸引します。カラムが空になったら吸引を止めて、マニホールドの真空を開放します。
5. 残りのサンプル混合物を VNE Column に移し、カラムが空になるまで -6 inHg で吸引します。カラムが空になったら吸引を止めて、マニホールドの真空を開放します。

### カラムメンブレンの洗浄

6. VNE Column に 500  $\mu\text{l}$  の Wash Buffer 1 を加えます。カラムが空になるまで、-6 inHg で吸引します。カラムが空になったら吸引を止めて、マニホールドの真空を開放します。  
\* Wash Buffer 1 にエタノール (96-100%) を添加していることを確認してください。

7. VNE Column に 650  $\mu$ l の Wash Buffer 2 を加えます。カラムが空になるまで、 $-6$  inHg で吸引します。カラムが空になったら吸引を止めて、マニホールドの真空を開放します。  
\* Wash Buffer 2 にエタノール(96-100%)を添加していることを確認してください。
8. ステップ 7 を繰り返します。

### メンブレンの乾燥

9. VNE Column をマニホールドから取り外し、VNE Column を Collection Tube (キットに付属) に取り付けます。最大速度 ( $\sim 18,000 \times g$ ) で 1 分間遠心分離し、VNE Column を乾燥させます。ろ液と Collection Tube 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の重要です。

### ウイルス RNA の溶出

10. VNE Column を Elution Tube (キットに付属) に取り付けます。VNE Column の膜中心に 40~60  $\mu$ l の RNase-free Water を加え、VNE Column を 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、Elution Buffer をカラム膜中央へ加え、完全に吸着させてください
11. 最大速度 ( $\sim 18,000 \times g$ ) で 1 分間遠心分離し、ウイルス DNA/RNA を溶出します。溶出したウイルス DNA/RNA は  $-70^{\circ}\text{C}$  で保存します。

### トラブルシューティング

低収量	
Carrier RNA を VNE Buffer に添加していない、または添加後の VNE Buffer が適切に保存されていない	Carrier RNA に 1 ml の VNE Buffer を加えて十分にボルテックスし、容器に戻して残りの VNE Buffer と混ぜてください。調製後は $4^{\circ}\text{C}$ で保存してください。
サンプルが適切に保存されていない、または繰り返し解凍された	長期保存の際は、サンプルを $-80^{\circ}\text{C}$ で保存してください。凍結サンプルの解凍は 1 回までとします。
RNA の分解	サンプル (血清、血漿、体液) 処理はできる限り迅速に行ってください。 1) すぐに抽出操作をする 2) 凍結 ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) 保存 3) 中間溶液 (保存液) で安定化させる
VNE Buffer との混合が不十分	ボルテックスでサンプル混合物をよく混ぜてください。
タンパク質の溶解が不十分	VNE Buffer を加えた後、サンプル混合物を室温で 10 分間インキュベートしてください。
RNA の結合条件が最適化されていない	ステップ 3 でサンプル混合物にエタノールが加えられていない。または正しい割合のエタノールが使用されていない。
RNA の溶出が正しく行われていない	RNase-free Water を VNE Column の膜中央に添加し、膜に吸収されたことを確認してください。

Wash Buffer1 及び Wash Buffer2 の準備が不適切	Wash Buffer 1 及び Wash Buffer 2 の開封時には、正しい量のエタノール (96-100%) を必ず加えてください。
<b>溶出した RNA がうまく機能しない</b>	
残留エタノールによるコンタミネーション	洗浄後、VNE Column を ~18,000 × g の速度でさらに 1 分間遠心分離してください。(ステップ 9)