

## FavorPrep™ Blood/Cultured Cell Total RNA Maxi Kit

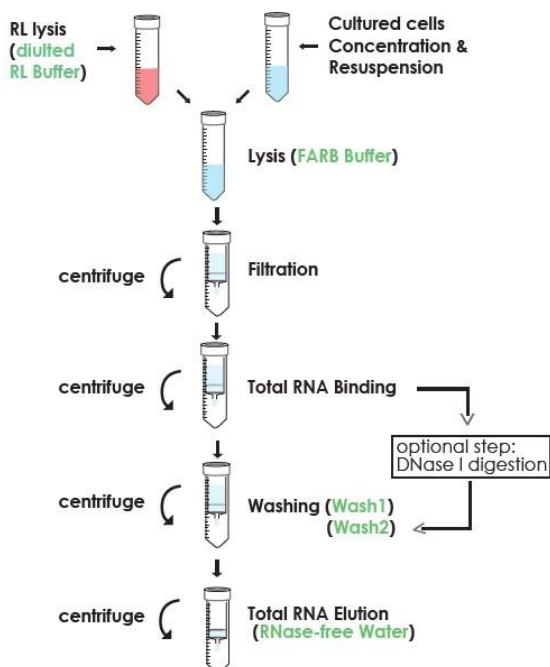
Cat: FABRK 000-Maxi (2 回分) / FABRK 003 (10 回分)

本製品は研究用です

v 2308

### 🌈 キットの内容

	FABRK 000-Maxi (2 preps)	FABRK 003 (10 preps)
10 × RL Buffer	20 ml	100 ml
FARB Buffer	30 ml	150 ml
Wash Buffer 1	30 ml	135 ml
Wash Buffer 2 (Concentrate)*	12 ml	54 ml
RNase-free Water	1.5 ml × 2	12 ml
Filter Columns	2 pcs	10 pcs
FARB Maxi Columns	2 pcs	10 pcs
Elution Tube (50ml tubes)	2 pcs	10 pcs
<b>*添加する 96-100%エタノール量</b>		
Wash Buffer 2 (Concentrate)	48 ml	216 ml



### 🌈 基本情報

構成	シリカメンブレン法 (マキシスピンカラム)
操作時間	< 60 分
結合量	最大 2000 $\mu$ g total RNA/column
操作方法	遠心法 もしくは 吸引法
最小溶出量	500 $\mu$ l

### 🌈 サンプル量と収量

サンプル	推奨されるサンプル量	
ヒト血液	3~10 ml	
動物細胞	NIH/3T3	5 × 10 <sup>8</sup> cells
	HeLa	
	COS-7	
	LMH	
細菌	E. coli	5 × 10 <sup>10</sup> cells
	B. subtilis	
酵母	S. cerevisiae	5 × 10 <sup>9</sup> 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. 必要量の FARB Buffer を別の RNase-free 容器に移し、使用前に 1 ml の FARB Buffer に対して 10  $\mu$ l の  $\beta$ -メルカプトエタノールを添加してください。
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. Wash Buffer 2 は開封時に RNase-free エタノール (96-100%) を加えてください。
6. 遠心分離の操作には、4,000~5,000  $\times$  g に到達可能な 50 ml チューブ用のスイングローター式遠心機を使用してください。
7. <ヒト血液> のオプションの操作を行う場合は、RNase-free DNase I solution (1M NaCl, 10mM MnCl<sub>2</sub>, 20mM Tris-HCl, pH 7.0 at 25°C) を準備し、最終的な DNase I が 0.5 U/  $\mu$ l になるように調整してください。
8. RL Buffer は 10 倍濃縮されているため、滅菌精製水で希釈してから使用してください。

### 🌟 操作 ※操作前に「重要事項」をよくお読みください。

<ヒト血液>

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

1. 抗凝固剤処理した採血管で新鮮なヒト血液を採取します。
2. 15 ml または 50 ml のチューブ (お客様でご用意ください) に 3~10 ml のサンプルを加えます。
3. サンプルに対して 5 倍量の RL Buffer (10 倍希釈) を加え、十分に転倒混和します。  
例) 5 ml のサンプルに対して 25 ml の RL Buffer (10 倍希釈) を加えます。  
\* RL Buffer 希釈については、重要事項 8 を参照ください。
4. 室温で 5 分間インキュベートします。インキュベート中に 2 回軽くボルテックスしてください。
5. 500  $\times$  g で 5 分間遠心分離します。細胞をペレット化した後、上清を完全に廃棄します。
6. サンプルに対して 2 倍量の RL Buffer (10 倍希釈) を加え、軽くボルテックスしてペレットを洗浄します。
7. 500  $\times$  g で 5 分間遠心分離します。細胞をペレット化した後、上清を完全に廃棄します。
8. 12.5 ml の FARB Buffer ( $\beta$ -メルカプトエタノール添加) を加え、激しくボルテックスします。その後室温で 3 分間インキュベートし、細胞を完全に溶解します。  
\* FARB Buffer ( $\beta$ -メルカプトエタノール添加) の調製については、重要事項 3 を参照ください。  
メモ: 全ての RNA を遊離させるには、サンプルを完全に破碎する必要があります。破碎方法 (破碎機など) はサンプル毎に異なります。

9. Filter Column を清潔な 50 ml チューブ（お客様でご用意ください）に取り付けます。サンプル混合物を加え、最大速度（4,000～5,000 × g）で 5 分間遠心分離します。
10. 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、ライセートの量を調整します。  
\* 上清を移す際、ペレットが散乱しないようにしてください。
11. ライセートに同量の RNase-free エタノール（70%）を加え、ボルテックスで十分に混和します。
12. FARB 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。14 ml のサンプル混合物を移し、最大速度（4,000～5,000 × g）で 5 分間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Maxi Column を 50 ml チューブに戻します。  
\* FARB Maxi Column の最大容量は 14 ml です。超過する場合は複数回に分けてステップ 12 を繰り返してください。
13. <オプション>ゲノム DNA を除去する場合
  - A. 7 ml の Wash Buffer 1 を FARB Maxi Column へ加えます。最大速度（4,000～5,000 × g）で 2 分間遠心分離し、ろ液を捨て FARB Maxi Column は 50 ml チューブに戻します。
  - B. 1 ml の RNase-free DNase I solution（0.5 U/μl, お客様で調整してください）を FARB Maxi Column の膜中央へ加え、ベンチトップ上で 10 分間静置します。
  - C. 7 ml の Wash Buffer 1 を FARB Maxi Column へ加えます。最大速度（4,000～5,000 × g）で 2 分間遠心分離し、ろ液を捨て FARB Maxi Column は 50 ml チューブに戻します。
  - D. ステップ 15 へ進みます。
14. 12.5 ml の Wash Buffer 1 を FARB Maxi Column へ加えます。最大速度（4,000～5,000 × g）で 2 分間遠心分離し、ろ液を捨て FARB Maxi Column は 50 ml チューブに戻します。
15. 12.5 ml の Wash Buffer 2 を FARB Maxi Column へ加え、最大速度（4,000～5,000 × g）で 2 分間遠心分離します。この作業を再度繰り返し、ろ液を捨てます。FARB Maxi Column は 50 ml チューブに戻します。  
\* Wash Buffer 2 にエタノール（96-100%）が添加されていることを確認してください。
16. さらに最大速度（4,000～5,000 × g）で 10 分間遠心分離し、FARB Maxi Column を乾燥させます。  
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。
17. FARB Maxi Column を Elution Tube（キットに付属）へ取り付けます。
18. 500～1,000 μl の RNase-free Water を FARB Maxi Column の膜中央に加え、5 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 Water を完全に吸着させてください。

19. 最大速度 (4,000~5,000 × g) で 5 分間遠心分離し、RNA を溶出します。

20. 精製した RNA は -70°C で保管します。

#### <動物細胞>

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

1. 300 × g で 5 分間遠心分離し、最大  $5 \times 10^8$  cells をペレット化します。その後上清を取り除きます。
2. 14 ml の FARB Buffer (β-メルカプトエタノール添加) を加えます。激しくボルテックスし、室温で 5 分間インキュベートします。  
\* FARB Buffer (β-メルカプトエタノール添加) の調製については、重要事項 3 を参照ください。
3. 50 ml チューブに Filter Column を取り付けます。サンプル混合物を移し、最大速度 (4,000~5,000 × g) で 5 分間遠心分離します。
4. 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、ライセートの量を調整します。  
\* 上清を移す際、ペレットが散乱しないようにしてください。
5. ライセートに同量の RNase-free エタノール (70%) を加え、ピペッティングで十分に混和します。
6. <ヒト血液> のステップ 12 へ進みます。

#### <細菌>

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

ウォーターバス もしくは ヒーティングブロック (37°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)

1. 最大  $5 \times 10^{10}$  cell の培養液を 2 ml 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。
2. >3,000 × g で 5 分間遠心分離し、上清を捨てます。
3. 1 ml の Lysozyme reaction solution を加え、ペレットを再懸濁します。
4. 37°C で 10 分間インキュベートします。

- 13 ml の FARB Buffer ( $\beta$ -メルカプトエタノール添加) を加えます。激しくボルテックスし、室温で 5 分間インキュベートします。  
\* FARB Buffer ( $\beta$ -メルカプトエタノール添加) の調製については、重要事項 3 を参照ください。
- 最大速度 (4,000~5,000  $\times$  g) で 5 分間遠心分離し、上清を 50 ml チューブ (お客様でご用意ください) に移します。
- ライセートに同量の RNase-free エタノール (70%) を加え、ピペッティングで十分に混和します。
- <ヒト血液> のステップ 12 へ進みます。

#### <酵母>

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

Lyticase もしくは zymolyase

Sorbitol Buffer (1 M Sorbitol、100 mM 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)

- 50 ml チューブ (お客様でご用意ください) に最大  $5 \times 10^9$  の酵母を移します。
- 4°C、500  $\times$  g で 5 分間遠心分離し、上清は捨てます。
- 2.5 ml の酵素溶解バッファー (20 mg/ml Lyticase もしくは zymolyase、1 M Sorbitol、100 mM EDTA、 $\beta$ -メルカプトエタノール (0.1%)) で再懸濁し、30°C で 30 分間インキュベートします。  
\* Sorbitol Buffer は使用直前に調製してください。
- 500  $\times$  g で 5 分間遠心分離します。スフェロプラストをペレット化し、上清を捨てます。
- 14 ml の FARB Buffer ( $\beta$ -メルカプトエタノール添加) を加えます。激しくボルテックスし、室温で 5 分間インキュベートします。  
\* FARB Buffer ( $\beta$ -メルカプトエタノール添加) の調製については、重要事項 3 を参照ください。
- 最大速度 (4,000~5,000  $\times$  g) で 5 分間遠心分離し、上清を 50 ml チューブ (お客様でご用意ください) に移します。
- ライセートに同量の RNase-free エタノール (70%) を加え、ピペッティングで十分に混和します。
- <ヒト血液> のステップ 12 へ進みます。