

FavorPrep™ miRNA Extraction Mini Kit

Cat. No. : FAMI1020 (4 回分) / FAMI1023 (50 回分) / FAMI1024 (100 回分)

本製品は研究用です

v 202505

● キットの内容

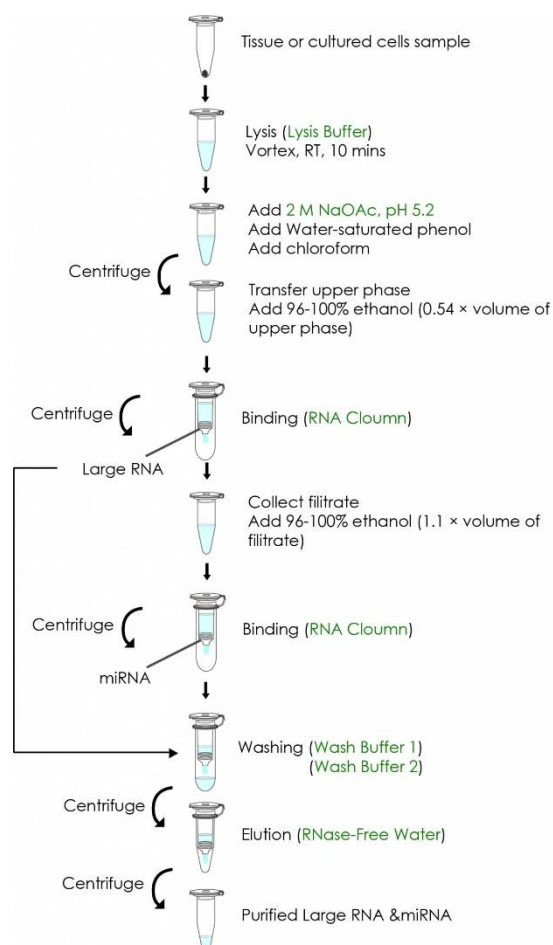
	FAMI1020 (FAMIK 000)	FAMI1023 (FAMIK 002)	FAMI1024 (FAMIK 001)
	(4 preps)	(50 preps)	(100 preps)
Lysis Buffer	1.5 ml	12 ml	25 ml
2M NaOAc, pH 5.2	150 µl	1.2 ml	2.5 ml
Wash Buffer 1	3 ml	30 ml	60 ml
Wash Buffer 2 (concentrate) *	1.5 ml	15 ml	35 ml
RNase-Free Water	0.5 ml	6 ml	6 ml
RNA Columns	8 pcs	100 pcs	200 pcs
Collection Tubes	8 pcs	100 pcs	200 pcs
*添加する 96~100%エタノール量			
Wash Buffer 2 (concentrated)	6 ml	60 ml	140 ml

● 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	培養細胞: $\leq 1 \times 10^6$ cells 組織: ≤ 50 mg
操作時間	<30 分
操作方法	遠心法 もしくは 吸引法

● 重要事項

- 作業を行う際は、ゴム手袋と白衣を着用してください。
- 本製品は室温で保管してください。
- 警告: フェノールとクロロホルムは人体に有害です。**
操作時にはドラフトチャンバーをご使用ください。
- Wash Buffer 2 は開封時に、エタノール (96~100%) を加えてください。調製後は室温で保管してください。



● 準備するもの

1. 12,000 rpm まで到達可能な遠心機
2. 1.5ml 遠心チューブ
3. 96~100% エタノール
4. 水飽和フェノール
5. クロロホルム
6. ボルテックスミキサー
7. ウォーターバス または ドライバス

● 操作 ※操作前に「重要事項」をよくお読みください。

＜ステップ 16 で使用する RNase-Free Water を 65°C に予熱してください。＞

1. 最大 50 mg の組織 または 最大 1×10^6 のペレット化した培養細胞を入れたチューブに、200 μ l の Lysis Buffer を加えます。
2. ボルテックスで十分に混和し、室温で 10 分間インキュベートします。
3. 20 μ l の 2M NaOAc, pH 5.2 を加えます。
4. 180 μ l の水飽和フェノールと 40 μ l のクロロホルムを加え、2 分間ボルテックスします。
5. 12,000 rpm で 3 分間遠心分離し、上清を新しい 1.5 ml 遠心チューブに移します。
重要！ 上清を移す際、相間や有機層が混入しないようにしてください。
6. 上清に対して 0.54 倍の無水エタノールを加え、十分に混和します。
例) 上清が 200 μ l の場合、108 μ l の無水エタノールを加える。混合液のエタノール濃度は 35% となる。
7. RNA Column を Collection Tube に取り付け、混合液を移します。その後 1 分間インキュベートします。
8. 12,000 rpm で 30 秒間遠心分離します。(Large RNA がカラムへ結合)
9. ろ液を新しい 1.5 ml 遠心チューブに移します。ろ液に対して 1.1 倍の無水エタノールを加え、十分に混和します。
例) ろ液量が 308 μ l の場合、338 μ l の無水エタノールを加える。混合液のエタノール濃度は 70% となる。
10. 新しい RNA Column を Collection Tube に取り付け、混合液を移します。その後 1 分間インキュベートします。
11. 12,000 rpm で 30 秒間遠心分離します。(miRNA がカラムへ結合)
12. 500 μ l の Wash Buffer 1 を加え、12,000 rpm で 30 秒間遠心分離します。ろ液を捨て、RNA Column を Collection Tube に戻します。
13. 700 μ l の Wash Buffer 2(エタノール添加)を加え、12,000 rpm で 30 秒間遠心分離します。ろ液を捨て、RNA Column を Collection Tube に戻します。
14. 400 μ l の Wash Buffer 2(エタノール添加)を加え、12,000 rpm で 2 分間遠心分離し、カラムを乾燥させます。
ろ液と Collection Tube を捨てます。
15. RNA Column を新しい 1.5ml 遠心チューブに取り付けます。
16. 30~50 μ l の RNase-Free Water(65°C に予熱)を RNA Column の膜中央へ加え、3 分間インキュベートします。

17. 12,000 rpm で 3 分間遠心分離し、miRNA を抽出します。

メモ) 精製した miRNA は、一般的なエタノール沈殿法でさらに濃縮し、少量の ddH₂O または TE (pH 8.0) に再溶解することができます。

18. 抽出した miRNA の 1/5 量を使用して、ミニアガロースゲルまたはポリアクリルアミドゲルで泳動し、品質確認を行います。ゲル上に確認できる RNA の大部分は 100 nt 未満のサイズで、主要なバンドは tRNA に対応しているはずです。5S と 5.8S rRNA も確認できることがあります。miRNA (21~22 nt) は通常はゲル上では確認することはできません。