

FavorPrep™ Tissue Total RNA Extraction Maxi Kit

Cat. No. : FATR1050 (2 回分) / FATR1051 (10 回分)

本製品は研究用です

v 202505

● キットの内容

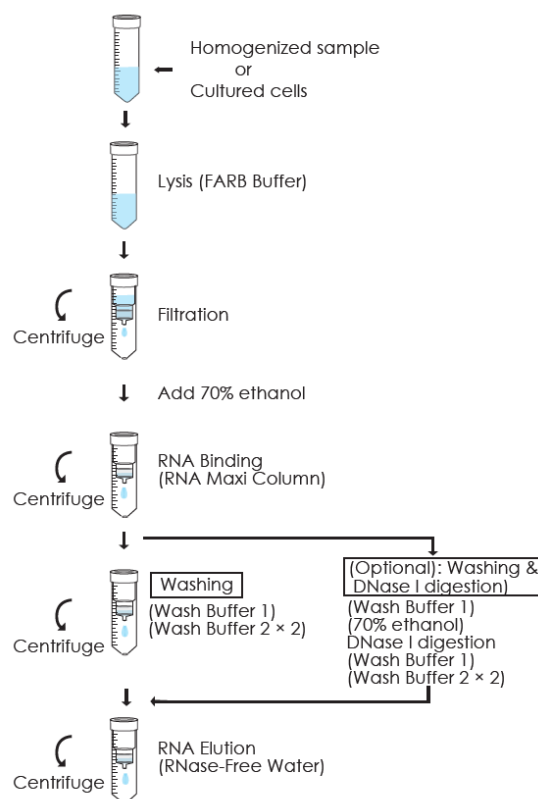
	FATR1050 (FATRK 003-S)	FATR1051 (FATRK 003)
	(2 preps)	(10 preps)
FARB Buffer	30 ml	150 ml
Wash Buffer 1	30 ml	135 ml
Wash Buffer 2 (concentrated) *	12 ml	54 ml
RNase-Free Water	5 ml	15 ml
Filter Columns	2 pcs	10 pcs
RNA Maxi Columns	2 pcs	10 pcs
50 ml centrifuge tubes	4 pcs	20 pcs
*添加する 96~100%エタノール量		
Wash Buffer 2 (concentrated)	48 ml	216 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 μ g total RNA/column
最小溶出量	500 μ l
操作方法	遠心法 もしくは 吸引法

● 推奨サンプル量

サンプル	推奨されるサンプル量
動物組織	≤ 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. 作業を行う際は、ゴム手袋と白衣を着用してください。
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. 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。
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 $4,500 \sim 6,000 \times g$ で行ってください。
6. オプション操作を行う場合は、各反応につき、1 ml の RNase-free DNase I solution ($0.25 \text{ U}/\mu\text{l}$) を調製してください。

まず、1 M NaCl, 10 mM MnCl_2 または MgCl_2 , 20 mM Tris-HCl (pH 7.0, 25°C) を含む 10 倍の DNase I reaction buffer を調製します。使用前にこのバッファーを 1 倍に希釈し、DNase I の最終濃度が $0.25 \text{ U}/\mu\text{l}$ になるように調製します。

● 準備するもの

- 1) 50 ml チューブ
- 2) β -メルカプトエタノール
- 3) RNase-free 70%エタノール
- 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. $\leq 650 \text{ mg}$ 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 (非付属品) 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 β -メルカプトエタノールを加えます。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! 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 (付属品) に取り付け、混合液を移します。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 (非付属品) に移します。
メモ) 上清を移す際、浮遊物が混入しないようにしてください。
5. 12 ml の RNase-free 70%エタノールを加え、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 (付属品) に取り付け、最大 12 ml の混合液を移します。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 12ml の混合液についても、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) 6 ml の Wash Buffer 1 を RNA Maxi Column に加えます。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。
 - B) 12 ml の RNase-free 70%エタノールを RNA Maxi Column に加えます。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。
 - C) 1 ml の RNase-free DNase I solution ($0.25 \text{ U}/\mu\text{l}$, 非付属品) を RNA Maxi Column の膜中央に加え、ベンチトップで 15 分間静置します。
 - D) 6 ml の Wash Buffer 1 を RNA Maxi Column に加えます。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。
 - E) ステップ 10 に進みます。
9. 12 ml の Wash Buffer 1 を RNA Maxi Column に加えます。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。
10. 12 ml の Wash Buffer 2 を RNA Maxi Column に加えます。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。
メモ) 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。
11. ステップ 10 を繰り返し、再度洗浄します。さらに 12 ml の Wash Buffer 2 を RNA Maxi Column に加えます。キャップを閉め、 $4,500 \sim 6,000 \times g$ 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 (非付属品) 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! 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. $500 \mu\text{l}$ の RNase-Free Water を RNA Maxi Column の膜中央に加え、室温で 2 分間静置します。
重要! 効率よく溶出させるため、RNase-Free Water 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、 $4,500 \sim 6,000 \times g$ 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に使用しない場合は -70°C で保管してください。

<動物細胞>

1. サンプルを 50 ml チューブ (非付属品) に移し、 4°C 、 $300 \times g$ 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・純度の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 (付属品) に取り付け、混合液を移します。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 (非付属品) に移します。
メモ) 上清を移す際、浮遊物が混入しないようにしてください。

5. 12 ml の RNase-free 70%エタノールを加え、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 (付属品) に取り付け、最大 12 ml の混合液を移します。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 12ml の混合液についても、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) 6 ml の Wash Buffer 1 を RNA Maxi Column に加えます。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) 12 ml の RNase-free 70%エタノールを RNA Maxi Column に加えます。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。
 - C) 1 ml の RNase-free DNase I solution (0.25 U/μl, 非付属品) を RNA Maxi Column の膜中央に加え、ベンチトップで 15 分間静置します。
 - D) 6 ml の Wash Buffer 1 を RNA Maxi Column に加えます。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。
 - E) ステップ 10 に進みます。
9. 12 ml の Wash Buffer 1 を RNA Maxi Column に加えます。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 に加えます。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。
メモ) 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。
11. ステップ 10 を繰り返し、再度洗浄します。さらに 12 ml の Wash Buffer 2 を RNA Maxi Column に加えます。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 (非付属品) 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! 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 Water を RNA Maxi Column の膜中央に加え、室温で 2 分間静置します。
重要! 効率よく溶出させるため、RNase-Free Water 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 で保管してください。

<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; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 2 mM 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 (非付属品) に移します。
メモ) サンプルから採取したトータル RNA 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・純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は、 $\leq 1.5 \times 10^{10}$ cell にしてください。

2. 4°C、4,500×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 μ m）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 に進みます。

＜酵母＞

必要なもの: Lyticase もしくは zymolyase

Sorbitol Buffer (1M sorbitol; 100 mM 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)

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。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。上清をすべて捨てます。
5. 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。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 に進みます。