

## FavorPrep™ Blood/Cultured Cells Total RNA Extraction Mini Kit

Cat. No. : FABR1020 (4 回分) / FABR1023 (50 回分) / FABR1024 (100 回分) / FABR1026 (300 回分)

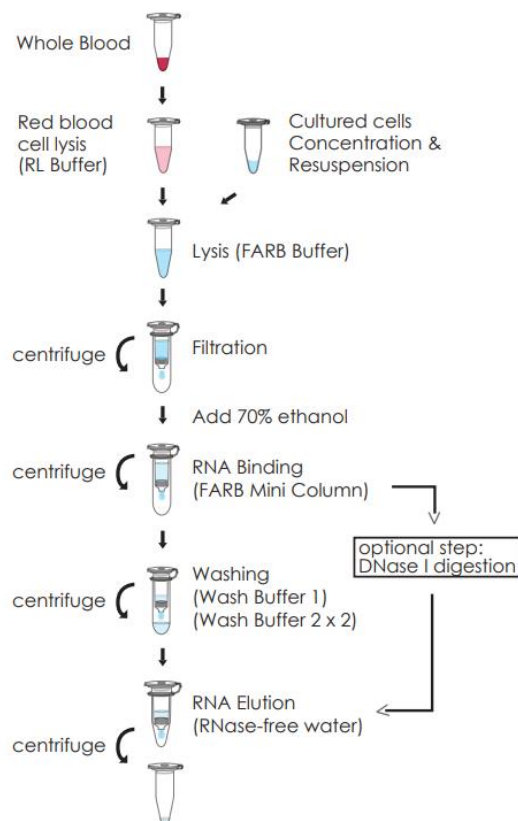
本製品は研究用です v 202509

### ● キットの内容

|                              | FABR1020 (FABRK<br>000-Mini)<br>(4 preps) | FABR1023 (FABRK<br>001)<br>(50 preps) | FABR1024 (FABRK<br>001-1)<br>(100 preps) | FABR1026 (FABRK<br>001-2)<br>(300 preps) |
|------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| RL Buffer                    | 15 ml                                     | 120 ml                                | 240 ml                                   | 240 ml × 3                               |
| FARB Buffer                  | 3 ml                                      | 25 ml                                 | 45 ml                                    | 130 ml                                   |
| Wash Buffer 1                | 3 ml                                      | 30 ml                                 | 60 ml                                    | 170 ml                                   |
| Wash Buffer 2 (Concentrate)* | 1.5 ml                                    | 20 ml                                 | 35 ml                                    | 50 ml × 2                                |
| RNase-Free Water             | 0.5 ml                                    | 6 ml                                  | 6 ml                                     | 8 ml × 2                                 |
| Filter Columns               | 4 pcs                                     | 50 pcs                                | 100 pcs                                  | 300 pcs                                  |
| FARB Mini Columns            | 4 pcs                                     | 50 pcs                                | 100 pcs                                  | 300 pcs                                  |
| Collection Tubes             | 8 pcs                                     | 100 pcs                               | 200 pcs                                  | 600 pcs                                  |
| Elution Tubes                | 4 pcs                                     | 50 pcs                                | 100 pcs                                  | 300 pcs                                  |
| *添加する 96~100%エタノール量          |                                           |                                       |                                          |                                          |
| Wash Buffer 2 (Concentrate)  | 6 ml                                      | 60 ml                                 | 140 ml                                   | 200 ml                                   |

### ● 基本情報

|       |                     |
|-------|---------------------|
| 構成    | シリカメンブレン法 (ミニスピナラム) |
| 操作時間  | 30~60 分             |
| 結合量   | ≤100 μg RNA/column  |
| 操作方法  | 遠心法 もしくは 吸引法        |
| 最小溶出量 | 30 μl               |



## ● サンプル量と収量

| サンプル                              | 推奨されるサンプル量    |                           | 収量 (μg) |
|-----------------------------------|---------------|---------------------------|---------|
| ヒト血液<br>(最大 300 μl)               | 300 μl        |                           | 1       |
| 動物細胞<br>(最大 5 × 10 <sup>6</sup> ) | NIH/3T3       | 1 × 10 <sup>6</sup> cells | 10      |
|                                   | HeLa          |                           | 15      |
|                                   | COS-7         |                           | 30      |
|                                   | LMH           |                           | 12      |
| 動物組織 (Mouse/rat)<br>(最大 30 mg)    | 胚             | 10 mg                     | 25      |
|                                   | 心臓            |                           | 10      |
|                                   | 脳             |                           | 10      |
|                                   | 腎臓            |                           | 30      |
|                                   | 肝臓            |                           | 50      |
|                                   | 脾臓            |                           | 35      |
|                                   | 肺             |                           | 15      |
| 細菌                                | E. coli       | 1 × 10 <sup>9</sup> cells | 60      |
|                                   | B. subtilis   |                           | 40      |
| 酵母<br>(最大 5 × 10 <sup>7</sup> )   | S. cerevisiae | 1 × 10 <sup>7</sup> cells | 25      |

## ● 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、最大速度 (~18,000 × 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、60 μl の RNase-free DNase I solution (0.25 U/μl) を調製してください。

まず、1 M NaCl, 10 mM MnCl<sub>2</sub> または MgCl<sub>2</sub>, 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 U/μl になるように調製します。

● **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 70%エタノール

1. 赤血球の溶解

1-1. 200~300  $\mu$ l の抗凝固剤で処理したヒト血液を 1.5 ml もしくは 2.0 ml 遠心チューブ（非付属品）に移します。サンプルが 200  $\mu$ l より多い場合は 2.0 ml 遠心チューブを使用してください。

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。

1-2. サンプルの 5 倍量の RL Buffer を加え、転倒混和します。

1-3. 氷上で 10 分間インキュベートします。インキュベーション中に、2 回ボルテックスします。

1-4. 2,800  $\times$  g で 1 分間遠心分離し、ペレットを形成させて上清を完全に捨てます。

1-5. 600  $\mu$ l の RL Buffer を加え、ボルテックスで再懸濁します。

1-6. 2,800  $\times$  g で 1 分間遠心分離し、再度ペレットを形成させて上清を完全に捨てます。

2. 350  $\mu$ l の FARB Buffer と 3.5  $\mu$ l 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、細胞を完全に再懸濁します。

メモ) ボルテックス後に細胞の塊が見受けられる場合は、ピペティングで壊してください。

3. Filter Column を Collection Tube に取り付け、混合液を加えます。その後、最大速度で 2 分間遠心分離します。

4. 上清を新しいチューブ（非付属品）に移し、サンプルの体積を量ってください。

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. サンプルと同量の RNase-free 70%エタノールを加え、ボルテックスで十分に混和します。

6. FARB Mini Column を Collection Tube に取り付けます。サンプル混合液（沈殿物を含む）を加え、最大速度で 1 分間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini Column を Collection Tube に戻します。

7. ＜オプション＞ゲノム DNA を除去する場合

A. 250  $\mu$ l の Wash Buffer 1 を加え、最大速度で 1 分間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini Column を Collection Tube に戻します。

B. 750  $\mu$ l の RNase-free 70%エタノールを加え、最大速度で 1 分間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini Column を Collection Tube に戻します。

C. 60  $\mu$ l の RNase-free DNase I solution (0.25 U/ $\mu$ l, 非付属品) を FARB Mini Column のメンブレンの中央に加え、15 分間静置します。

D. 250  $\mu$ l の Wash Buffer 1 を加え、最大速度で 1 分間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini Column を Collection Tube に戻します。

E. ステップ 9 へ進みます。

8. 500  $\mu$ l の Wash Buffer 1 を加え、最大速度で 1 分間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini Column を Collection Tube に戻します。

9. 750  $\mu$ l の Wash Buffer 2 を加え、最大速度で 1 分間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini Column を Collection Tube に戻します。

メモ) Wash Buffer 2 にエタノールが加えられていることを確認してください。

10. ステップ 9 を繰り返し、もう一度洗浄します。

11. さらに最大速度で3分間遠心分離し、FARB Mini Column を乾燥させます。  
重要！ の操作により、残留液がその後の酵素処理を阻害することを防ぎます。
12. FARB Mini Column を Elution Tube (付属品)に取り付けます。
13. 30~50  $\mu$ l の RNase-Free Water を FARB Mini Column のメンブレンの中央に加え、1分間静置します。  
重要！ 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。  
メモ) 30  $\mu$ l より少量で溶出した場合、収量が低下する恐れがあります。
14. 最大速度で1分間遠心分離し、RNA を溶出します。
15. 精製した RNA は-70°Cで保管します。

#### <動物細胞>

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

1. 4°C、300  $\times$  g で5分間遠心分離し、1~5  $\times$  10<sup>6</sup> 個の細胞をペレット化します。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. 350  $\mu$ l の FARB Buffer と 3.5  $\mu$ l 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、細胞を完全に再懸濁します。  
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、ピペティングで壊してください。
3. <ヒト血液>のステップ3に進みます。

#### <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もしくは 20G の針付シリンジ

$\beta$ -メルカプトエタノール、RNase-free 70%エタノール

1. 最大 30mg の組織サンプルを液体窒素と乳鉢、乳棒で粉砕し、新しい遠心チューブ(非付属品)に移します。  
メモ) 計量や粉砕時にサンプルが溶けないようにしてください。
2. 350  $\mu$ l の FARB Buffer と 3.5  $\mu$ l 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もしくは 20 G の針付シリンジに 10 回通して粉砕し、室温で5分間インキュベートします。  
重要！ 硬いサンプルからより多くの RNA を抽出するため、適切な破砕機(ローターステーター式ホモジナイザーなど)を使用することを推奨します。
3. <ヒト血液>のステップ3に進みます。

#### <細菌>

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

酸処理済みガラスビーズ (500~700  $\mu$ m)

1. 最大 1  $\times$  10<sup>9</sup> cell の細菌培養液を 2ml のスクリュー遠心チューブ(非付属品)に移します。  
メモ) サンプル量から推測して total RNA の収量がカラム結合量 (100  $\mu$ g) 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 量の推測が困難なサンプルの場合は、サンプル量を  $\leq 5 \times 10^8$  個にしてください。

2. 4°C、最大速度で 2 分間遠心分離し、上清をすべて捨てます。
3. 100  $\mu$ l の Lysozyme reaction solution を加えます。ピペッティングでペレットを再懸濁し、37°C で 10 分間インキュベートします。
4. 350  $\mu$ l の FARB Buffer と 3.5  $\mu$ l の  $\beta$ -メルカプトエタノールを加えます。
5. 250 mg の酸処理済みガラスビーズ (500~700  $\mu$ m) を加えます。5 分間ボルテックスし、細胞を破碎します。
6. 最大速度で 2 分間遠心分離します。上清を新しい遠心チューブ (非付属品) に移し、上清の体積を量ります。  
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。
7. <ヒト血液> のステップ 5 に進みます。

#### <酵母>

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

A) 酵素処理による破碎: 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)

B) 化学的手法による破碎: 2 ml のスクリュウ遠心チューブ

酸処理済みガラスビーズ (500~700  $\mu$ m)

1. 4°C、5,000  $\times$  g で 10 分間遠心分離し、最大  $5 \times 10^7$  個の酵母を回収します。上清をすべて捨てます。
2. A) 酵素処理による破碎
  - A-1. 600  $\mu$ l の Sorbitol Buffer (非付属品) を加え、再懸濁します。200 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。  
メモ) Sorbitol Buffer は使用直前に調製してください。
  - A-2. 300  $\times$  g で 5 分間遠心分離し、スフェロプラストを沈殿させます。上清をすべて捨てます。
  - A-3. 350  $\mu$ l の FARB Buffer と 3.5  $\mu$ l 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。室温で 5 分間インキュベートします。
- B) 化学的手法による破碎
  - B-1. 350  $\mu$ l の FARB Buffer と 3.5  $\mu$ l の  $\beta$ -メルカプトエタノールを加え、ボルテックスで細胞を完全に再懸濁します。
  - B-2. 2 ml のスクリュウ遠心チューブに移し、250 mg の酸処理済みガラスビーズ (500~700  $\mu$ m) を加えます。15 分間ボルテックスし、細胞を破碎します。
  - B-3. 上清を新しい遠心チューブ (非付属品) に移し、体積を測定します。
3. <ヒト血液> のステップ 5 に進みます。

#### <パラフィン包埋組織>

必要なもの: キシレン、エタノール (96~100%)

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もしくは 20G の針付シリンジ

$\beta$ -メルカプトエタノール、RNase-free 70%エタノール

1. 最大 15mg のパラフィン包埋組織を遠心チューブ（非付属品）に移します。  
メモ）余分なパラフィンを除去し、サンプル量を最小限にしてください。
2. 0.5 ml のキシレンを加え、十分に混和します。室温で 10 分間インキュベートします。
3. 最大速度で 3 分間遠心分離し、ピペットで上清を捨てます。
4. 0.25 ml のキシレンを加え、十分に混和します。室温で 3 分間インキュベートします。
5. 最大速度で 3 分間遠心分離し、ピペットで上清を捨てます。
6. ステップ 4 と 5 を繰り返します。
7. 0.3 ml のエタノール（96～100%）を加え、ボルテックスで十分に混和します。室温で 3 分間インキュベートします。
8. 最大速度で 3 分間遠心分離し、ピペットで上清を捨てます。
9. ステップ 7 と 8 を繰り返します。
10. ＜動物組織＞のステップ 1 に進み、サンプルを破碎してください。その後、＜ヒト血液＞のステップ 3 に進みます。

#### ＜RNA クリーンアップ＞

必要なもの：エタノール（96～100%）

1. 100  $\mu$ l の RNA サンプルを遠心チューブ（非付属品）に移します。  
メモ）RNA サンプルが 100  $\mu$ l 未満の場合は、RNase-Free Water を加えて 100  $\mu$ l に調製してください。
2. 300  $\mu$ l の FARB Buffer と 300  $\mu$ l の RNase-free エタノール（96～100%）を加え、ボルテックスで十分に混和します。
3. FARB Mini Column を Collection Tube に取り付け、混合液を移します。最大速度で 1 分間遠心分離し、ろ液を捨てます。FARB Mini Column を Collection Tube に戻します。
4. ＜ヒト血液＞のステップ 8 に進みます。