

FavorPrep™ Blood/Cultured Cells Total RNA Extraction Maxi Kit

Cat. No. : FABR1050 (2 回分) / FABR1051 (10 回分)

本製品は研究用です v 202505

● キットの内容

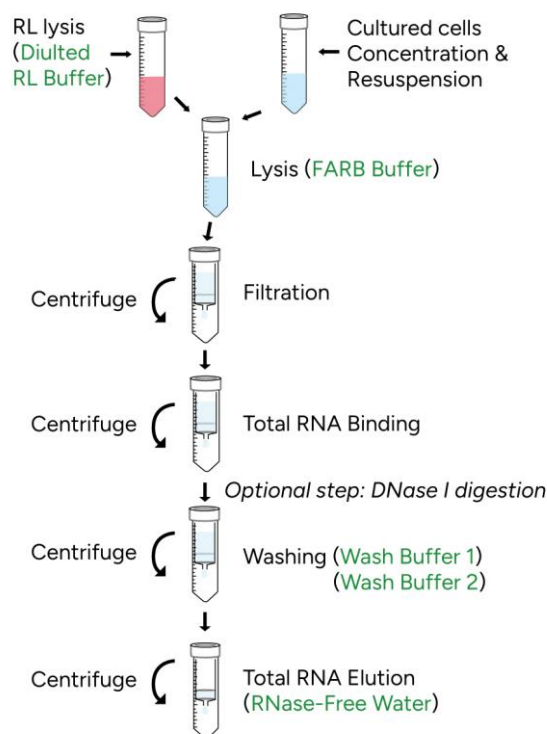
	FABR1050 (FABRK 000-Maxi)	FABR1051 (FABRK 003)
	(2 preps)	(10 preps)
10×RL Buffer	20 ml	100 ml
FARB Buffer	30 ml	150 ml
Wash Buffer 1	30 ml	135 ml
Wash Buffer 2 (Concentrate)*	12 ml	54 ml
RNase-Free Water	1.5 ml × 2	12 ml
Filter Columns	2 pcs	10 pcs
FARB Maxi Columns	2 pcs	10 pcs
Elution Tube (50ml tubes)	2 pcs	10 pcs
*添加する 96~100%エタノール量		
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 µg total RNA/column
操作方法	遠心法 もしくは 吸引法
最小溶出量	500 µl

● 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 ⁸ cells
	HeLa	
	COS-7	
	LMH	
細菌	E. coli	5 × 10 ¹⁰ cells
	B. subtilis	
酵母	S. cerevisiae	5 × 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. 作業中はゴム手袋、白衣を着用してください。
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 μ l の β -メルカプトエタノールを加えてください。
4. **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。**
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. 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 U/ μ l) を調製してください。
まず、1 M NaCl, 10 mM MnCl₂ または MgCl₂, 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/ μ l になるように調製します。
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: β -メルカプトエタノール、70% RNase-free エタノール

1. 抗凝固剤処理をした採血管に新鮮なヒト血液を移します。
2. 15 ml もしくは 50 ml の遠心チューブ (非付属品) に 3~10 ml のサンプルを加えます。
3. サンプルに対して 5 倍量の希釈した RL Buffer 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 の希釈した RL Buffer を加える。RL Buffer の希釈については、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ます。
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、上清を完全に捨てます。
6. サンプルに対して 2 倍量の希釈した RL Buffer を加え、軽くボルテックスします。
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、上清を完全に捨てます。
8. 12.5 ml の FARB Buffer (β -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。
メモ) 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。
すべての RNA を抽出するため、サンプルを完全に破碎する必要があります。サンプル毎に適した方法 (破碎機等) を用いて破碎してください。
9. Filter Column を新しい 50 ml チューブ (非付属品) に取り付け、混合液を移します。最大速度で 5 分間遠心分離します。
10. 上清を新しい 50 ml チューブ (非付属品) に移し、ライセートの量を調整します。
メモ) 上清を移す際、ペレットが混入しないように注意してください。

11. ライセートに同量の 70%エタノールを加え、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(非付属品)に取り付け、14 ml の混合液を移します。最大速度で 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。
メモ) 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. 6 ml の Wash Buffer 1 を加え、最大速度で 2 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。
 - B. 12 ml の 70%エタノールを加え、最大速度で 2 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。
 - C. 1 ml の RNase-free DNase I solution (0.25 U/ μ l, 非付属品)を FARB Maxi Column のメンブレンの中央に加え、ベンチトップ上で 10 分間静置します。
 - D. 6 ml の Wash Buffer 1 を加え、最大速度で 2 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。
 - E. ステップ 15 に進みます。
14. 12 ml の Wash Buffer 1 を加え、最大速度で 2 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。
15. 12.5 ml の Wash Buffer 2 を加え、最大速度で 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 を 50 ml チューブに戻します。
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。
16. さらに最大速度で 10 分間遠心分離し、FARB Maxi Column を乾燥させます。
重要! この操作により、残留液がその後の酵素処理を阻害することを防ぎます。
17. FARB Maxi Column を Elution Tube (50 ml チューブ, 付属品)に取り付けます。
18. 500~1,000 μ l の RNase-Free Water を FARB Maxi Column のメンブレンの中央に加え、5 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。
19. 最大速度で 5 分間遠心分離し、RNA を溶出します。
20. 精製した RNA を -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、70% RNase-free エタノール

1. 300 $\times$ g で 5 分間遠心分離し、最大 5×10^8 個の細胞をペレット化します。上清を完全に捨てます。
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。
メモ) 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(非付属品)に Filter Column を取り付け、混合液を移します。最大速度で 5 分間遠心分離します。
4. 上清を新しい 50 ml チューブ(非付属品)に移し、ライセートの量を調整します。
メモ) 上清を移す際、ペレットが混入しないようにしてください。

5. ライセートに同量の 70%エタノールを加え、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 に進みます。

<細菌>

必要なもの: β -メルカプトエタノール、70% RNase-free 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)

Lysozyme reaction solution (10 mg/ml lysozyme; 20mM Tris-HCl, pH 8.0; 2mM EDTA; 1.2% Triton)

1. 最大 5×10^{10} 個の培養細菌を 2 ml のスクリー遠心チューブ (非付属品) に移します。
2. $>3,000 \times g$ で 5 分間遠心分離し、上清を完全に捨てます。
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。
5. 13 ml の FARB Buffer (β -メルカプトエタノール添加) を加えます。ボルテックスで十分に混和し、室温で 5 分間インキュベートします。

メモ) 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。

6. 最大速度で 5 分間遠心分離し、上清を 50 ml チューブ (非付属品) に移します。
7. ライセートに同量の 70%エタノールを加え、ピペッティングで十分に混和します。
8. <ヒト血液>のステップ 12 に進みます。

<酵母>

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

Lyticase もしくは zymolyase

Sorbitol Buffer (1 M 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. 最大 5×10^9 個の酵母細胞を 50 ml チューブ (非付属品) に移します。
2. 4°C、 $500 \times g$ で 5 分間遠心分離し、上清を完全に捨てます。
3. 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; 0.1% β -メルカプトエタノール, 非付属品) で再懸濁し、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。

4. $500 \times g$ 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、上清を完全に捨てます。
5. 14 ml の FARB Buffer (β -メルカプトエタノール添加) を加えます。ボルテックスで十分に混和し、室温で 5 分間インキュベートします。

メモ) 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。

6. 最大速度で 5 分間遠心分離し、上清を 50 ml チューブ (非付属品) に移します。
7. ライセートに同量の 70%エタノールを加え、ピペッティングで十分に混和します。
8. <ヒト血液>のステップ 12 に進みます。