

FavorPrep™ Tissue Total RNA Extraction Mini Kit

Cat. No. : FATR1020 (4 回分) / FATR1023 (50 回分) / FATR1024 (100 回分) / FATR1026 (300 回分)

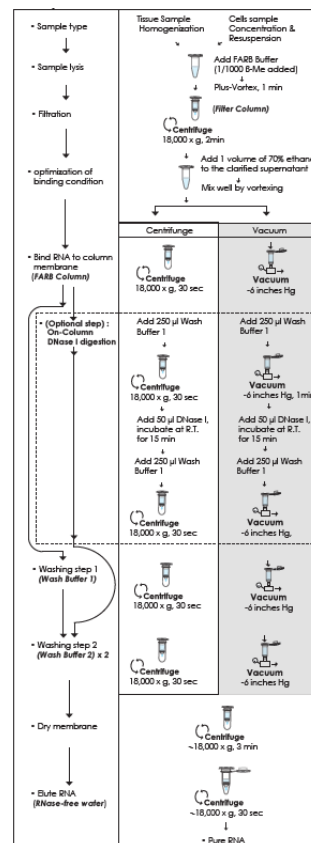
本製品は研究用です v 202509

● キットの内容

	FATR1020 (FATRK 000-Mini) (4 preps)	FATR1023 (FATRK 001) (50 preps)	FATR1024 (FATRK 001-1) (100 preps)	FATR1026 (FATRK 001-2) (300 preps)
FARB Buffer	1.5 ml × 2	25 ml	45 ml	130 ml
Wash Buffer 1	1.5 ml × 2	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 Tube	4 pcs	50 pcs	100 pcs	300 pcs
Micropestles	4 pcs	50 pcs	100 pcs	300 pcs
*添加する 96~100%エタノール量				
Wash Buffer 2	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
RNA サイズ	>200 bp
結合量	100 µg RNA/column
溶出量	30~50 µl
操作方法	遠心法 もしくは 吸引法



● 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)
動物細胞 (最大 5×10^6)	NIH/3T3	1×10^6 cells	10
	HeLa		15
	COS-7		30
	LMH		12
動物組織 (Mouse/rat) (最大 30 mg)	胚	10 mg	25
	心臓、脳		10
	腎臓		30
	肝臓		50
	脾臓		35
	肺		15
	胸線		45
細菌	E. coli	1×10^9 cells	60
	B. subtilis		40
酵母 (最大 5×10^7)	S. cerevisiae	1×10^7 cells	25

● 重要事項

<バッファー>

1. 本キットの構成品は、室温 (15~25°C) で保管してください。
2. 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。
3. 作業中はゴム手袋、白衣を着用してください。
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. 遠心分離は、~18,000 × gで行ってください。
6. Wash Buffer 2 は開封時にエタノール (96~100%) を加えてください。
7. Buffer を安全に取り扱うために、手順を開始する前に安全情報 (英語版マニュアル) をご確認ください。

<バキュームマニホールド及び真空装置>

1. カラム先端の形状が適合し、真空圧が-6 inHg に到達可能な機器をご使用ください
2. 同一圧力 (1 atm) での単位と値については、下表をご確認ください。

単位	値
atmosphere (atm)	1.000
millimeter of mercury (mmHg)	760.000
inches of mercury (inHg)	29.290
pascal (Pa)	101,325.000
kilopascal (KPa)	101.325
torr (torr)	760.000
pound per square inch (psi, lbs/in ²)	14.700

● 用意するもの

- 1) 滅菌済みピペット、ピペットチップ、遠心チューブ (1.5 ml、2.0 ml)
- 2) RNase-free 96~100%エタノール (Wash Buffer 2 の調製用)
- 3) 18,000 × g まで到達可能な遠心分離機、1.5 ml または 2.0 ml 用ローター

吸引法を用いる場合

- 4) 付属カラムに適合するアダプター付きバキュームマニホールド、-6 inches Hg に到達可能な真空装置

● バッファーの調製

- RNase-free DNase I solution (オプション)

反応毎に 60 μ l の RNase-free DNase I solution (0.25 U/ μ l) を以下の手順で調製します。

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

- lysozyme reaction solution (細菌サンプル)

反応毎に 100 μ l の Lysozyme reaction solution (10 mg/ml) を以下の手順で調製します。

20mM Tris-HCl (pH 8.0); 2mM EDTA; 1.2% Triton からなるバッファーを用いて lysozyme の最終濃度が 10 mg/ml になるように調製します。

- lyticase または zymolyase reaction solution (酵母サンプル)

反応毎に 500 μ l の lyticase または zymolyase reaction solution を以下の手順で調製します。

1M sorbitol; 100mM EDTA; 0.1% β -メルカプトエタノールからなるバッファーを用いて lyticase または zymolyase の最終濃度が 400 U/ml 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。

<動物細胞>

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

1. 4°C、300 × g で 5 分間遠心分離し、 $1 \sim 5 \times 10^6$ cells の細胞を回収します。上清を取り除きます。
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・精製度の低下につながります。
2. 350 μ l の FARB Buffer と 3.5 μ l 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、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られる場合は、ピペッティングで壊してください。
3. Filter Column を Collection Tube に取り付けます。混合液を加え、18,000 × g で 2 分間遠心分離します。
4. 上清を新しい遠心チューブ (非付属品) に移し、体積を量ります。Filter Column と Collection Tube を捨てます。
メモ) ペレットの断片が混入しないようにしてください。
5. 上清と同量の 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、混合液 (沈殿物を含む) を移します。

＜遠心法＞18,000 × g で 30 秒間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini column を Collection Tube に戻します。

＜吸引法＞カラムが空になるまで-6 inHg で真空引きをし、マニホールドの真空を解除します。

7. ＜オプション＞ゲノム DNA を除去する場合

A) 250 μ l の Wash Buffer 1 を加えます。

＜遠心法＞18,000 × g で 30 秒間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini Column を Collection Tube に戻します。

＜吸引法＞-6 inHg で 1 分間真空引きをし、マニホールドの真空を解除します。

B) 750 μ l の RNase-free 70%エタノールを加えます。

＜遠心法＞18,000 × g で 30 秒間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini Column を Collection Tube に戻します。

＜吸引法＞-6 inHg で 1 分間真空引きをし、マニホールドの真空を解除します。

C) 60 μ l の RNase-free DNase I solution (0.25 U/ μ 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 μ l の Wash Buffer 1 を加えます。

＜遠心法＞18,000 × g で 30 秒間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini Column を Collection Tube に戻します。

＜吸引法＞カラムが空になるまで-6 inHg で真空引きをし、マニホールドの真空を解除します。

E) ステップ 9 に進みます。

8. 500 μ l の Wash Buffer 1 を加えます。

＜遠心法＞18,000 × g で 30 秒間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini column を Collection Tube に戻します。

＜吸引法＞カラムが空になるまで-6 inHg で真空引きをし、マニホールドの真空を解除します。

9. 750 μ l の Wash Buffer 2 を加えます。

＜遠心法＞18,000 × g で 30 秒間遠心分離します。ろ液を捨て、FARB Mini Column を Collection Tube に戻します。

＜吸引法＞カラムが空になるまで-6 inHg で真空引きをし、マニホールドの真空を解除します。

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、もう一回洗浄します。

11. 18,000 × g で 3 分間遠心分離し、FARB Mini Column を乾燥させます。ろ液を捨てます。

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。

12. FARB Mini Column を Elution Tube (付属品) に取り付けます。

13. 30~50 μ l の RNase-free Water を FARB Mini Column のメンブレンの中央に加え、室温で 1 分間静置します。

重要！ 効率よく溶出させるため、RNase-Free Water をメンブレンの中央に滴下し、完全に吸着したことを確認してください。

メモ) 30 μ l 未満で溶出しないでください。収量が低下する恐れがあります。

14. 18,000 × g で 30 秒間遠心分離し、RNA を溶出します。RNA は-70℃で保管します。

<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または 20-G ニードルシリンジ

β -メルカプトエタノール、RNase-free 70%エタノール

A-1. 最大 30mg の組織サンプルを液体窒素と乳鉢、乳棒で粉碎し、新しいチューブ(付属品)に移します。

メモ) 計量や粉碎時にサンプルが溶けないようにしてください。

A-2. 350 μ l の FARB Buffer と 3.5 μ l 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または 20-G ニードルシリンジに 10 回通して粉碎し、室温で 5 分間インキュベートします。

重要! 硬いサンプルの場合、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)の使用を推奨します。

A-3. <動物細胞>のステップ 3 に進みます。

【別方法】

B-1. 最大 30mg のサンプルを遠心チューブに移し、350 μ l の FARB Buffer と 3.5 μ l の β -メルカプトエタノールを加えます。Micropestle(付属品)を使用して、十分にすり潰します。

B-2. 20-G ニードルシリンジに 10~20 回通して粉碎し、室温で 5 分間インキュベートしてください。

メモ) 胞量が少ないまたは破壊しにくいサンプルは、上記 A-1~A-3 ステップで行うことを推奨します。

B-3. <動物細胞>のステップ 3 に進んでください。

<細菌>

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

ウォーターバスまた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

酸処理済みガラスビーズ(500~700 μ m)

1. 最大 1×10^9 cells の培養液を 2ml のスクリュー遠心チューブに移します。

メモ) サンプル量から推測し、total RNA の収量がカラム結合量(100 μ 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・精製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には、サンプル量を $\leq 5 \times 10^8$ cells にしてください。

2. 4°C、18,000 $\times$ g で 2 分間遠心分離し、上清を捨てます。

3. 100 μ l の Lysozyme reaction solution を加えます。上下にピペティングし、再懸濁します。37°C で 10 分間インキュベートします。

4. 350 μ l の FARB Buffer と 3.5 μ l の β -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 μ m)を加えます。5 分間ボルテックスし、細胞を破砕します。

6. 18,000 $\times$ g で 2 分間遠心分離します。上清を新しい遠心チューブ(付属品)に移し、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. <動物細胞>のステップ 5 に進みます。

<酵母>

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

A) 酵素破碎: lyticase または zymolyase reaction solution
ウォーターバスまたはヒーティングブロック(37°C)

B) 機械破碎: 2 ml スクリュー遠心チューブ
酸処理済みガラスビーズ(500~700 μ m)

1. 4°C、5,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離し、25 mg の酵母を回収します。上清を取り除きます。

2. A) 酵素破碎

A-1. 500 μ l の lyticase または zymolyase reaction solution で再懸濁し、37°C で 30 分間インキュベートします。

メモ) lyticase または zymolyase reaction solution は使用直前に調製してください。

A-2. 5,000 $\times$ g で 5 分間遠心分離し、上清を取り除きます。

A-3. 350 μ l の FARB Buffer と 3.5 μ l 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、スフエ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) 機械破碎

B-1. 350 μ l の FARB Buffer と 3.5 μ l の β -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. 混合液を 2 ml スクリュー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 μ m)を加えます。15 分間ボルテックスし、細胞を破碎します。

3. <動物細胞>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または 20-G ニードルシリンジ

β -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。

・ サンプル量を減らすため、余分なパラフィンを除去してください。

2. 0.5 ml のキシレンを加え、十分に混ぜます。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、ピペティングで上清を取り除きます。

4. 0.25 ml のキシレンを加え、十分に混ぜます。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、ピペティングで上清を取り除きます。

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、脱パラフィン化させます。ボルテックスで優しく混和し、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、ピペティングで上清を取り除きます。

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、サンプルを破碎します。その後、<動物細胞>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 μ l の RNA サンプルを遠心チューブ(非付属品)に移します。
 - ・ RNA サンプルが 100 μ l 未満の場合、RNase-Free water を加えて 100 μ l に調整してください。
2. 300 μ l の FARB Buffer と 300 μ l 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。
3. FARB Mini Column を Collection Tube に取り付け、混合液を移します。18,000 $\times$ g 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. ＜動物細胞＞のステップ 8 に進みます。

● トラブルシューティング

低収量	
サンプルの保存状態が悪い、または繰り返し解凍している	長期保存の場合は、 -80°C で保存してください。凍結したサンプルの解凍は 1 回までとします。
RNA の分解	採取したサンプルはすぐに安定化してください。
FARB Buffer との混合が不十分	混合液をボルテックスで混和してください。
RNA の結合条件が最適化されていない	ライセート(ステップ 5)にエタノールが加えられていない、またはエタノールの濃度が正しくない。
RNA の溶出が正しく行われていない	RNase-Free Water を FARB Mini Column のメンブレンの中央に滴下し、完全に吸収したことを確認してください。
Wash Buffer 2 の調製に誤りがある	Wash Buffer2 に正しい量のエタノール(96～100%)が加えられていることを確認してください。
溶出した RNA がうまく機能しない	
残留エタノールによるコンタミネーション	洗浄ステップ後、FARB Mini Column を 18,000 $\times$ g で 3 分間遠心分離してください。(ステップ 11)