

FavorPrep™ Tissue Total RNA Extraction 96-Well Kit

Cat. No. : FATR107A (1 回分) / FATR107B (2 回分) / FATR107C (4 回分)

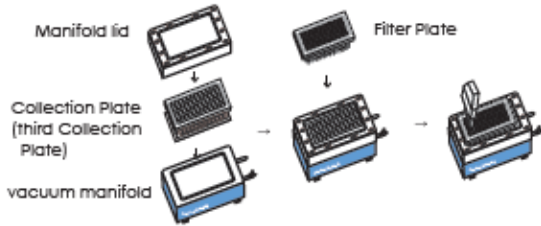
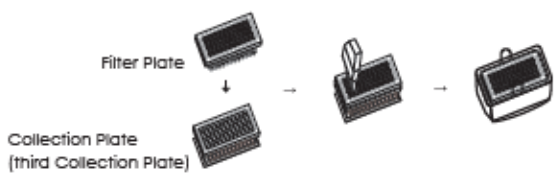
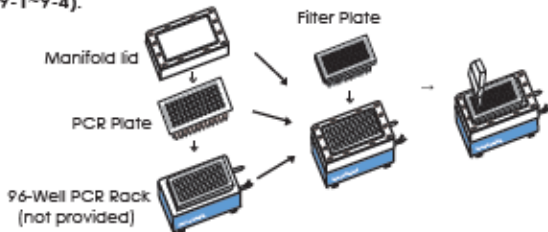
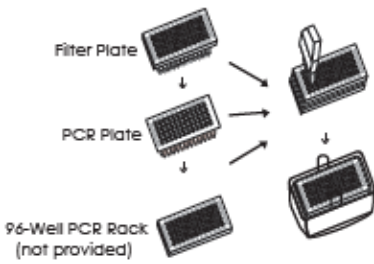
本製品は研究用です v 202509

● キットの内容

	FATR107A (FATRE 96001)	FATR107B (FATRE 96002)	FATR107C (FATRE 96004)
	(1 plate)	(2 plates)	(4 plates)
FARB Buffer	60 ml	120 ml	120 ml × 2
Wash Buffer 1 (Concentrate)*	55 ml	110 ml	110 ml × 2
Wash Buffer 2 (Concentrate)*	25 ml	50 ml	50 ml × 2
RNase-Free Water	15 ml	30 ml	30 ml × 2
Filter Plates (96-Well RNA Binding Plate)	1 plate	2 plates	4 plates
Collection Plates (96-Well 2ml Plate)	4 plates	8 plates	16 plates
Elution Plates (96-Well PCR Plate)	1 plate	2 plates	4 plates
Adhesive Films	2 pcs	4 pcs	8 pcs
*添加する 96~100%エタノール量			
Wash Buffer 1	20 ml	40 ml	40 ml × 2
Wash Buffer 2	100 ml	200 ml	200 ml × 2

● 基本情報

構成	シリカメンブレン (フィルタープレート)
サンプル量 /preparation	動物細胞: 最大 1×10^7 cells 動物組織: 最大 50 mg
所要時間	<60 分 /96 preparations
結合量	最大 75 μ g/well
溶出量	50~75 μ l
方法	遠心法 もしくは 吸引法
ダウンストリームアプリケーション	リアルタイム RT-PCR cDNA 合成 ノーザンブロットティング プライマー伸長 mRNA 選択など

• STEP 1. Sample preparation and lysis • Collect samples in a Collection Plate (first Collection Plate) → • Add FARB Buffer → • Disrupt the samples → • Stand at room temperature for 5 mins	
• STEP 2. Clarify lysate • Seal with Adhesive Film. • Centrifuge at 5,600~6,000 ×g for 10 mins	
• STEP 3. Adjust binding condition: • Transfer upper clarified lysate to a clean Collection Plate (second Collection Plate) → • Add RNase-free 70% ethanol → • Mix by pipetting	
• STEP 4. Bind RNA to Filter Plate:	
Vacuum processing • Transfer the sample mixture to Filter plate. • Apply -12 inches Hg vacuum until the wells have emptied. 	Centrifuge processing • Transfer the sample mixture to Filter plate. • Centrifuge at 4,500~6,000 ×g for 2 mins. 
• (Optional) : Digest DNA by DNase I	
• A1. Add Wash Buffer 1. Apply vacuum at -12 inches Hg. • A2. Add RNase-free 70% ethanol. Apply vacuum at -12 inches Hg. • A3. Add DNase I mixture. Stand at R.T for 15 min. • A4. Add Wash Buffer 1. Apply vacuum at -12 inches Hg. • A5. Proceed to STEP 6.	• B1. Add Wash Buffer 1. Centrifuge at 4,500~6,000 ×g for 5 mins. • B2. Add RNase-free 70% ethanol. at 4,500~6,000 ×g for 5 mins. • B3. Add DNase I mixture. Stand at R.T for 15 mins. • B4. Add Wash Buffer 1. Centrifuge at 4,500~6,000 ×g for 2 mins. • B5. Proceed to STEP 6.
• STEP 5. Wash the Filter Plate with Wash Buffer 1	
• Add Wash Buffer 1. Apply vacuum at -12 inches Hg.	• Add Wash Buffer 1. Centrifuge at 4,500~6,000 ×g for 2 mins.
• STEP 6 & 7. Wash the Filter Plate with Wash Buffer 2	
• STEP 6 & 7: Add Wash Buffer 2. Apply vacuum at -12 inches Hg for 2 mins,	• STEP 6: Add Wash Buffer 2. Centrifuge at 5,600~6,000 ×g for 2 mins • STEP 7: Add Wash Buffer 2. Centrifuge at 5,600~6,000 ×g for 10 mins
• STEP 8. Dry the membranes of Filter Plate:	
• Tap the Filter Plate tips on paper towel • Return the Filter Plate and the Collection Plate to the manifold. • Apply vacuum at -12 inches Hg for an additional 10 mins.	• Stand the Filter plate on a clean paper towel at room temperature for 5 mins.
• STEP 9. RNA Elution:	
• Add RNase-Free Water to the Filter Plate. Stand for 3 mins. • Close the manifold valve. Turn on the vacuum source to build up a vacuum to -12 inches Hg. • Open the manifold valve to apply vacuum to elute RNA. Alternative: If the consistent volume of elutes are recommend, use centrifuge protocol to proceed this elution step. (Page 3, STEP 9-1~9-4).	• Add RNase-Free Water to the Filter Plate. Stand for 3 mins. • Centrifuge to elute RNA.
	

● 重要事項

1. 本キットの構成品は、室温(15~25℃)で保管してください。
2. Buffer を安全に取り扱うために、操作前に安全情報(英語版マニュアル)をご確認ください。
3. 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。
4. 作業中はゴム手袋、白衣を着用してください。
5. Wash Buffer 1 と Wash Buffer 2 は開封時にエタノール(RNase-free, 96~100%)を加えてください。
6. 開始前に、FARB Buffer と DNase I solution(オプション)を調製してください。
7. **警告: FARB Buffer と Wash Buffer 1 には、グアニジニウム塩が含まれています。漂白剤または酸性溶液を廃棄物に直接添加しないでください。**
8. **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。**
9. 溶出した RNA は直ちに氷上で保存してください。長期保存の場合は-70℃で凍結保存してください。
10. サンプルの損失やウェル間の汚染を防ぐため、プレートには Adhesive Film を貼り、十分に密封してください。Adhesive Film は再利用しないでください。

● バッファーの調製

1. FARB Buffer
 β -メルカプトエタノールを FARB Buffer に加え、十分に混和して 1% β -Me-FARB Buffer を調製します。
例) 1ml の FARB buffer に対して 10 μ l の β -メルカプトエタノールを添加する
2. 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℃, 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。

● 用意するもの

- 1) 滅菌済みのピペット、ピペットチップ(ヌクレアーゼフリー)
 - 2) β -メルカプトエタノール
 - 3) RNase-free 96~100%エタノール
 - 4) RNase-free 70%エタノール
 - 5) クラッシュアイス
 - 6) RNase-free DNase I と DNase I reaction buffer
 - 7) 96-Well PCR ラック
 - 8) 5,600~6,000 $\times g$ に到達可能なスイングローター式遠心機(厚さ 8.0cm のプレートを収容可能)
- 吸引法を用いる場合
- 9) 96-Well Plate 対応のバキュームマニホールド、-12inHg に到達可能な真空ポンプ

● サンプル量と収量

サンプル	推奨されるサンプル量		平均収量 (μg)
動物細胞(最大 1×10^7 cells)	HeLa	1×10^6 cells	10
高収量組織((Mouse)(最大 20 mg)	肝臓	10 mg	35
	脾臓	10 mg	45
低収量組織(Mouse)(最大 50 mg)	胚、肺	10 mg	10
	心臓、脳	10 mg	7.5
	腎臓	10 mg	20
	腸	10 mg	15

● 操作 ※操作前に「重要事項」をよくお読みください。

<吸引法>

STEP 1. サンプルの前処理と溶解

動物細胞

- 最大 1×10^7 の細胞を Collection Plate(付属品、1 枚目)の各ウェルに移します。4°C、 $500 \times g$ で 5 分間遠心分離し、上清を捨てます。
- 450 μl の FARB Buffer(β-メルカプトエタノール添加)を加え、上下にピペッティングし細胞を完全に懸濁します。
- 室温で 5 分間インキュベートします。

動物組織

- 最大 50 mg の動物組織を Collection Plate(付属品、1 枚目)の各ウェルに移します。
- 450 μl の FARB Buffer(β-メルカプトエタノール)を加えます。
- ホモジナイザーでサンプルを破碎します。
- 室温で 5 分間インキュベートします。

STEP 2. ライセートの清澄化

- Adhesive Film で封をし、 $5,600 \sim 6,000 \times g$ で 10 分間遠心分離します。

STEP 3. 結合条件の調整

- 350 μl の上清を新しい Collection Plate(付属品、2 枚目)の各ウェルに移します。
メモ) ペレットが混入しないよう注意してください。
- 350 μl の RNase-free 70%エタノールを各ウェルに加え、ピペッティングにより混和します。
メモ) エタノールとライセートが完全に混和したことを確認してください。

STEP 4. RNA の結合

- 新しい Collection Plate(付属品、3 枚目)をバキュームマニホールドに取り付け、カバーで固定します。その上に Filter Plate(付属品)を取り付けます。

- ・ 混合液を移し、2 枚目の Collection Plate を捨てます。
- ・ ウェルが空になるまで-12inHg で真空引きをします。
- ・ バキュームマニホールドを真空から解放します。
- ・ 3 枚目の Collection Plate を捨てます。
- ・ Filter Plate と Collection Plate (付属品、4 枚目) をバキュームマニホールドに取り付けます。

<オプション> DNase I による DNA の消化

- ・ 250 μ l の Wash Buffer 1 (エタノール添加) を各ウェルに加えます。-12inHg で 2 分間真空引きをした後、真空を解除します。
- ・ 750 μ l の RNase-free 70%エタノールを各ウェルに加えます。-12inHg で 2 分間真空引きをした後、真空を解除します。
- ・ 60 μ l の DNase I solution (0.25 U/ μ l, 非付属品) を各ウェルに加え、室温で 15 分間静置します。インキュベーション後は真空引きをせずに次の操作を行います。
- ・ 250 μ l の Wash Buffer 1 を各ウェルに加えます。空になるまで-12inHg で真空引きをした後、真空を解除します。ろ液を捨て、Filter Plate と Collection Plate をバキュームマニホールドに戻します。
- ・ STEP 6 に進みます。

STEP 5. Wash Buffer 1 による Filter Plate の洗浄

- ・ 500 μ l の Wash Buffer 1 (エタノール添加) を各ウェルに加えます。
- ・ 空になるまで-12inHg で真空引きをします。
- ・ バキュームマニホールドを真空から解放します。
- ・ ろ液を捨て、Filter Plate と Collection Plate をバキュームマニホールドに戻します。

STEP 6. Wash Buffer 2 による Filter Plate の洗浄

- ・ 500 μ l の Wash Buffer 2 (エタノール添加) を各ウェルに加えます。
- ・ -12inHg で 2 分間真空引きをします。
- ・ バキュームマニホールドを真空から解放します。
- ・ ろ液を捨て、Filter Plate と Collection Plate をバキュームマニホールドに戻します。

STEP 7. Filter Plate の再洗浄

- ・ STEP 6 を繰り返します。

STEP 8. Filter Plate の乾燥

- ・ Filter Plate の先端を清潔なペーパータオルで軽く叩き、残留液を取り除きます。
- ・ Filter Plate を Collection Plate に戻し、バキュームマニホールドに取り付けます。
- ・ -12inHg で 10 分間真空引きをします。
- ・ バキュームマニホールドを真空から解放します。
- ・ 4 枚目の Collection Plate を捨てます。

STEP 9. RNA の溶出

代替方法: 一定量の溶出液が推奨される場合は、＜遠心法＞の STEP 9 の方法で溶出してください。

- Elution Plate (付属品) を 96-Well PCR ラック (非付属品) に取り付けます。バキュームマニホールドにカバーで固定し、その上に Filter Plate を取り付けます。(上: Filter Plate 中: Elution Plate 下: 96-Well PCR ラック)
- 50~75 μ l の RNase-Free Water を Filter Plate のメンブレンの中央に加え、3 分間静置します。
メモ) 溶出液は RNase-Free Water の添加量よりも平均で約 25 μ l 少なくなります。
例) 50 μ l の RNase-Free Water に対して ~25 μ l の溶出液が回収できます。
メモ) 50 μ l 未満の RNase-Free Water で溶出しないでください。収量が減少する恐れがあります。
メモ) 効果的な溶出のため、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。
- バキュームマニホールドのバルブを閉じ、-12inHg で真空引きをします。
- バルブを開き、RNA を溶出します。
- バキュームマニホールドを真空から解放します。
- Elution Plate に Adhesive Film (付属品) で封をし、RNA を -70°C で保管します。

＜遠心法＞

STEP 1. サンプルの前処理と溶解

動物細胞

- 最大 1×10^7 cells のサンプルを Collection Plate (付属品、1 枚目) の各ウェルに移します。4°C、500 $\times$ g で 5 分間遠心分離し、上清を捨てます。
- 450 μ l の FARB Buffer (β -メルカプトエタノール添加) を加え、上下にピペッティングし細胞を完全に懸濁します。
- 室温で 5 分間インキュベートします。

動物組織

- 最大 50 mg の動物組織を Collection Plate (付属品、1 枚目) の各ウェルに移します。
- 450 μ l の FARB Buffer (β -メルカプトエタノール添加) を加えます。
- ホモジナイザーでサンプルを破碎します。
- 室温で 5 分間インキュベートします。

STEP 2. ライセートの清澄化

- Collection Plate に Adhesive Film で封をし、5,600~6,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離します。

STEP 3. 結合条件の調整

- 350 μ l の上清を新しい Collection Plate (付属品、2 枚目) の各ウェルに移します。
メモ) ペレットが混入しないよう注意してください。
- 350 μ l の RNase-free 70% エタノールを各ウェルに加え、ピペッティングにより混和します。
メモ) エタノールとライセートが完全に混和したことを確認してください。

STEP 4. RNA の結合

- Filter Plate (付属品) を新しい Collection Plate (付属品、3 枚目) に取り付けます。
- 混合液を移し、2 枚目の Collection Plate を捨てます。
- 組み合わせたプレートを $5,600 \sim 6,000 \times g$ で 2 分間遠心分離します。
- 3 枚目の Collection Plate を捨てます。
- Filter Plate を新しい Collection Plate (付属品、4 枚目) に取り付けます。

<オプション> DNase I による DNA の消化

- $250 \mu\text{l}$ の Wash Buffer 1 (エタノール添加) を各ウェルに加え、 $5,600 \sim 6,000 \times g$ で 5 分間遠心分離します。ろ液を捨て、Filter Plate を Collection Plate に戻します。
- $750 \mu\text{l}$ の RNase-free 70% エタノールを各ウェルに加え、 $5,600 \sim 6,000 \times g$ で 5 分間遠心分離します。ろ液を捨て、Filter Plate を Collection Plate に戻します。
- $60 \mu\text{l}$ の DNase I solution ($0.25 \text{ U}/\mu\text{l}$, 非付属品) を各ウェルに加え、室温で 15 分間静置します。インキュベーション後は遠心分離をせずに次の操作を行います。
- $250 \mu\text{l}$ の Wash Buffer 1 を各ウェルに加え、 $5,600 \sim 6,000 \times g$ で 2 分間遠心分離します。ろ液を捨て、Filter Plate を Collection Plate に戻します。
- STEP 6 に進みます。

STEP 5. Wash Buffer 1 による Filter Plate の洗浄

- $500 \mu\text{l}$ の Wash Buffer 1 (エタノール添加) を各ウェルに加えます。
- $5,600 \sim 6,000 \times g$ で 2 分間遠心分離します。
- ろ液を捨て、Filter Plate を Collection Plate に戻します。

STEP 6. Wash Buffer 2 による Filter Plate の洗浄

- $500 \mu\text{l}$ の Wash Buffer 2 (エタノール添加) を各ウェルに加えます。
- $5,600 \sim 6,000 \times g$ で 2 分間遠心分離します。
- ろ液を捨て、Filter Plate を Collection Plate に戻します。

STEP 7. Filter Plate の再洗浄

- $500 \mu\text{l}$ の Wash Buffer 2 (エタノール添加) を各ウェルに加えます。
- $5,600 \sim 6,000 \times g$ で 10 分間遠心分離します。
- 4 枚目の Collection Plate を捨てます。

STEP 8. Filter Plate の乾燥

- Filter Plate をペーパータオル (非付属品) の上に置き、室温で 5 分間静置します。

STEP 9. RNA の溶出

- Elution Plate (付属品) を 96-Well PCR ラック (非付属品) に取り付け、その上に Filter Plate を取り付けます。

(上: Filter Plate 中: Elution Plate 下: 96-Well PCR ラック)

- 50~75 μ l の RNase-Free Water を Filter Plate のメンブレンの中央に加え、3 分間静置します。
メモ) 溶出液は RNase-Free Water の添加量よりも平均で約 25 μ l 少なくなります。
例) 50 μ l の RNase-Free Water に対して ~25 μ l の溶出液が回収できます。
メモ) 50 μ l 未満の RNase-Free Water で溶出しないでください。収量が減少する恐れがあります。
メモ) 効果的な溶出のため、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。
- 組み合わせたプレート を 5,600~6,000 $\times$ g で 5 分間遠心分離し、RNA を溶出します。
- Elution Plate に Adhesive Film (付属品) で封をし、RNA を -70°C で保管します。