

アルカリ SDS法 edited by Kishimoto

[材料]

Solution I 50 mM Tris-HCl (pH. 8.0), 10% Sucrose

Solution II 1% SDS, 0.2N NaOH (10% SDSと2N NaOHから毎回使用直前に調整)

Solution III 5 M CH₃COOK 60 ml, 酢酸 11.5 ml, 蒸留水 28.5 ml。

RNase RNase 10mg/ml、ボイルしてDNase freeにしておく。

PEG6000 Polyethyleneglycol #6000/2.5 M NaCl

[操作]

- 1 LB/Amp培地 5 mlで1晩培養、集菌。
- 2 100 μ lのSol.-Iに完全に懸濁→きちんと懸濁する
- 3 200 μ lのSol.-IIを混和、氷冷1分→この氷冷はあまり長くしない
- 4 150 μ lのSol.-IIIを混和、氷冷1分→5min~1hおいた方回収率が上がる
- 5 タンパクが析出するので遠心 (10min) して別のエッペンに上清を移す。
- 6 等量のPhe/Chlを加えvortex、室温で遠心 (14000rpm. 10min)
- 7 上層を別のエッペンにうつして、クロロホルムを等量入れてフェノクロと同じ操作をする。
- 8 上層にイソプロパノールを500 μ l (等量) 加え、4度Cで遠心 (14000rpm. 10min)。
- 9 75%エタノールリンス (1ml) 、遠心(3~5min)、Dry。
- 10 10 mg/ml RNaseを1000倍に希釈したTEあるいは滅菌水 50 μ lに溶かす
→50 μ lと量は決まっていない。量をかえて濃縮具合を変える。

さらにきれいにとる場合は、少し濃いRNaseで処理し30 μ lのPEG6000を加え氷冷を1時間以上する。遠心後、75%エタノールリンス、遠心、Dry。