

TCA を用いた細胞破碎 edited by Kishimoto

- ・ 集菌して冷凍保存していた試料と同量〜少し多めのビーズを入れる。
- ・ 20%TCA 溶液を 200 μ l 入れて破碎。
 - ▶ ふたを閉めるときにビーズがないか確認。あったら拭き取る！
- ・ 上澄みを別のエッペン (B) に移す。
- ・ 元のエッペン (A) に 5%TCA を 200 μ l 加えてエッペンの壁面を洗いながらピペティング。——▶ 20%TCA を水で希釈。
- ・ その上澄みをエッペン (B) に。
- ・ もう一度同じ操作。
- ・ 遠心 (Max speed, 10min)。
- ・ 上澄みを TCA 廃液に捨て 1ml アセトンで wash。
- ・ 遠心 (Max speed, 5min)。
- ・ アセトンを吸い取って風乾・・・しすぎると厄介なのでほどほどに (2,3 分で OK)。
- ・ 1 M Tris-HCl (pH7.0) + サンプルバッファーに懸濁。Boil。
- ・ 遠心 (Max speed, 10sec)。

そのサンプルをタンパク定量する場合はこちら↓。

タンパク定量 (BioRad 社 DC protein Assay Kit)

- ・ 破碎して得たやつの上澄みから希釈液作る。
- ・ Reagent I 125 μ l ずつ加える→加えたら vortex して 1 分放置。
- ・ Reagent II 125 μ l ずつ加える→加えたら vortex。
- ・ 遠心 (Max speed, 5min)。
- ・ 上澄みを取り去って乾燥させる。
- ・ A と S を 50 : 1 の割合で混ぜた溶液を直前に作製し 127 μ l ずつ加える。
- ・ 5min 放置 (溶かす)。
- ・ B を 1ml 加えて発色→**暗所で** 15〜60min。
- ・ 吸光度 (750nm) で測定。