

1. 一つの sample あたり 10 cover slips 用いる (0.5–1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  の sample が 100  $\mu\text{l}$  できる).
2. cover slip を buffer A で wash する.
3. buffer A 50  $\mu\text{l}$  を cover slip に添加し, yellow tip で掻き取り, tube に回収する.
4. 3 を繰り返す.
5. 15,000 rpm, 4°C, 2 min
6. sup を捨て, ppt に buffer B を 100  $\mu\text{l}$  入れる (sample 濃度を濃くしたい場合は buffer 量を少なくすることができるが, volume 不足で次の sonication が難しくなる).
7. sonication (熱と泡に注意)
8. 15,000 rpm, RT, 30 min (buffer B は SDS が入っているので, 低温だと析出してしまふ).
9. sup 80  $\mu\text{l}$  を新しい tube へ入れる (残りはタンパク質定量用に別の tube にとっておく).
10. buffer C (+2-ME) を 20  $\mu\text{l}$  入れる (total 100  $\mu\text{l}$ ).
11. 95°C, 5 min
12. SDS-PAGE へ

buffer A (harvest buffer)

10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 20 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail

buffer B (lysis buffer)

buffer A + 2% SDS

buffer C without 2-ME

125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 60% glycerol, 4% SDS, BPB (適当量)

buffer C + 2-ME (5×sample buffer)

buffer C + 25% 2-ME (使用直前に入れる)