

## 遺伝子組換えマウス / ラットの脳抽出液の前処理方法

## (Tris/グアニジン塩酸による抽出方法)

## Preparation of transgenic mice or rat brain extract tissue samples

## (Tris / Guanidine Solution)

## 1. 脳を摘出

## 1. Remove brain tissue

2. 200mg あたり 0.8mL の TS(+)を加える(サンプルに対して 4 倍量)

## 2. Add 0.8mL TS (+) per 200mG of brain tissue (4 fold of the sample volume)

3. ホモジネート (grass-Teflon homogeniser) 10 ストローク

## 3. Homogenate (grass-Teflon homogeniser) 10 strokes

4. 350,000g (100K rpm) 4°Cで 20 分間遠心

## 4. Centrifuge at 350,000g (100K rpm) at 4°C for 20 minutes

5. ppt (supernatant は、TS(+)可溶性画分としてとっておく)

## 5. ppt (keep and store the supernatant as TS (+) soluble fraction.)

6. サンプルに対して 4 倍量の TBS(+)を加える

## 6. Add 4 times TBS (+) to samples

7. ホモジネート (grass-Teflon homogeniser) 10 strokes

## 7. Homogenate (grass-Teflon homogeniser) 10 strokes

8. 200,000g (70K rpm) 4°C 20 分間遠心

## 8. Centrifuge at 200,000g (70K rpm) 4°C for 20 minutes

9. ppt (すぐに使用しないなら、TS(+)不溶性画分として-80°C保存)

## 9. ppt (store as TS (+) insoluble fraction at -80°C if it is not immediately used.)

10. 6M グアニジン塩酸 (in 50mM Tris buffer pH7.6)を 50mg サンプル量に対して、500 $\mu$ l 加える。

10. Add 500 $\mu$ l of 6M Guanidine solution in 50mM Tris buffer pH7.6 per 50mG sample.

11. Sonicate (25% output;) 5sec.×4 を 2set

## 11. Sonicate (25% output;) 5sec. x 4 x 2 sets

12. Incubate 30min 室温

## 12. Incubate for 30minutes at room temperature

13. 200,000g (70K rpm) 4°C 20 分間遠心

## 13. Centrifuge at 200,000g (70K rpm) 4°C for 20 minutes

14. Supernatant を ELISA 用に回収する (測定時には IBL 希釈液で適当に希釈して使用)

## 14. Harvest supernatant for ELISA (dilute the sample with EIA buffer supplied as a kit component)

Content of TS-inhibitor (TS(+))

50mM Tris-HCl buffer pH7.4

NaCl 150mM, TM|LCK 1µg/mL, EGTA 1mM, antipain 1µg/mL, DIFP 0.5mL, pepstatin 0.1µg/mL, PMSF 0.5mM, leupeptin 1µg/mL