

AGPC 法による total RNA の調製

Denaturing solution

guanidinium thiocyanate (m.w. 118.16) (final 4 M)	18.9 g
sodium citrate (trisodium citrate dihydrate m.w. 294.1) (final 25 mM)	0.3 g
β -ME (final 0.1M)	0.3 ml
<i>N</i> -lauroylsarcosine (0.5%)	0.2 g
fill up to	40 ml

pH は正確に 7 に合わせる。アルカリになると RNA が分解する。
 β -ME を入れた状態で 1 ヶ月安定。

2 M NAOAc (m.w. 136.08) pH 4

10.9 g	fill up to	40 ml
--------	------------	-------

4 M LiCl (m.w. 42.39)

6.8 g	fill up to	40 ml
-------	------------	-------

Water-saturated phenol

49:1 (v/v) chloroform/isoamyl alcohol

chloroform	40 ml
isoamyl alcohol	0.8 ml

100% isopropanol

75% ethanol

ethanol	30 ml
dH ₂ O	10 ml

1. 1.5 ml エッペンチューブに細胞を集める。
2. 細胞 10^7 個あたり 1 ml の denaturing solution を加えて 7-10 回ピペッティングし、細胞を溶解する。
3. 2. に 100 μ l の 2 M NAOAc (pH 4) を加え、転倒攪拌し、1.5 ml チューブ 2 本に分ける。
4. 3. の 2 本のチューブに 500 μ l (等容量) ずつの water-saturated phenol を加え、激しく転倒攪拌する。

5. 4. の 2 本のチューブに 100 μ l ずつの 49:1 (v/v) chloroform/isoamyl alcohol を加え、激しく転倒攪拌する。
6. 5. を 氷上に 15 分間放置する。
7. 10000 x g、4 $^{\circ}$ C、20 分間遠心する。
8. 7. の 2 本のチューブの上層を新しい 1.5 ml エッペンチューブ 2 本に移す。中間層を吸わないように余裕を持って回収する。ぎりぎりまで取らない。
9. 8. の 2 本のチューブに 500 μ l (等容量) ずつの 100% isopropanol を加えて懸濁し、-80 $^{\circ}$ C で 10 分間放置する。
10. 9. を 10000 x g、4 $^{\circ}$ C、10 分間遠心する。
11. 10. の沈殿を 300 μ l の denaturing solution に懸濁し、1 本のチューブにまとめる。
12. 11. に 300 μ l の 100% isopropanol を加えて懸濁し、-80 $^{\circ}$ C で 10 分間放置する。
13. 12. を 10000 x g、4 $^{\circ}$ C、10 分間遠心し、上清を捨てる。
14. 13. の沈殿に 1 ml の 75% ethanol を加えて vortex し、10 分間室温で放置して、残っている guanidinium を溶解させる。
15. 14. を 10000 x g、4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心し、上清を捨てる。
16. RNA を 100 μ l の水に溶解する。-80 $^{\circ}$ C で保存する。

<以上>