

ベクターの制限酵素処理と脱リン酸化

ここでは pBluescript を制限酵素の EcoRV で消化し、Shrimp Alkaline phosphatase (SAP、Fermentas 社 #EF0511) を使って脱リン酸化する場合について述べる。

1. 以下の試薬を混合する。

pBluescript II KS(-)	x μ l	(2 μ g)
10 x buffer	1.0 μ l	
水	y μ l	
EcoRV	1.0 μ l	
合計	10.0 μ l	

2. 37°C 2 時間反応させる。
3. 以下の試薬を混合する。ここで使用している SAP は広範なバッファー環境下で活性があるので、制限酵素のバッファーをそのまま使うことができる。詳しくは Fermentas 社のホームページで確認すること。

+ SAP (Fermentas)	1 μ l	(1 unit)
合計	11 μ l	

4. 37°C 30 分反応させる。
5. 酵素の失活が必要な場合は 65°C 15 分処理する。直ちに電気泳動して切り出す場合はこの処理は不要。
6. 電気泳動し、目的のバンドを切り出して回収する。

<以上>