

ゲルろ過を用いてのタンパク質分離

Arabidopsis seedlings を材料として Superdex 200 にかける場合

* 目的タンパク質のサイズによってカラムの種類を選ぶ

- 1, エッペンで約 500 μ l の seedlings に 350 μ l の Extraction buffer を加えてすりつぶす。
- 2, 15,000rpm で 10min 遠心して上清を新しいエッペンに移す。
- 3, さらに 15,000rpm で 5min 遠心して上清を新しいエッペンに回収する。この上清を 0.22 μ m のフィルターに通す。タンパク質濃度を測定する。
- 4, running buffer であらかじめして平衡化しておいた（前日）Superdex 200 ゲル濾過クロマトグラフィー（他のカラムでも良い）にサンプルを 200 μ l インジェクトする。デットボリュームを含めて最低 300 μ l のサンプルが必要。残りを crude extract として取っておく。
- 5, Superdex 200 ゲル濾過クロマトグラフィーを流速 0.3ml/min で流す。開始 7ml 後から 20ml までサンプルを回収する(500 μ l/tube)。エッペンでフラクションを回収。
- 6, 分画された各フラクションにそれぞれ 10 μ l の Strata Clean Resin (Stratagene)を加えて室温で 15-30min 振とう（タンパク質を Strata Clean Resin に吸着させる）する（アセトン沈殿でも良い）。軽く遠心して（ちびたんで数秒）上清を除去した後、沈殿した Strata Clean Resin に 2xSDS 化サンプルバッファーを 20 μ l 加えて 5min ボイルする。

* Strata Clean Resin では吸着しないタンパク質があるので、吸着するかどうかわからない場合はアセトンか TCA で濃縮する。

カラムの平衡化

- 1, フィルターに通した 100ml の cold running buffer を流速 0.3ml/min で流す。

AKTA 使用の手順

- 1, 使用する DW、20%EtOH、buffer すべてフィルターを通して、4 度に冷や

- す
- 2, 長期に使用しない場合は 20%EtOH でシステムとカラムを置換してあるの
で、使用する前にフィルターをかけた DW(100ml)でシステムとカラムを洗
う
 - 3, buffer(100ml)で平衡化する
 - 4, run
 - 5, 十分量の buffer (100ml)でカラムを洗う
 - 6, DW(100ml)でシステムとカラムを洗う
 - 7, 20% EtOH(100ml)でシステムとカラムを置換する

Extraction buffer

1M Tris-HCl, pH 7.5	500ul	(50mM)
5M NaCl	300ul	(150mM)
0.5M EDTA	100ul	(5mM)
2-メルカプトエタノール	3.75ul	
グリセロール	1ml	(10%)
Complete mini (Roche)	1 tablet / 10ml	

*rotary shaker で Complete mini を溶かしたら、氷上で冷やす

Running buffer

1M Tris-HCl, pH 7.5	500ul	(50mM)
5M NaCl	300ul	(150mM)
0.5M EDTA	100ul	(5mM)
2-メルカプトエタノール	3.75ul	
グリセロール	1ml	(10%)

*0.22um のフィルターでろ過して、4 度に冷やしておく