

# Myc-tag Purification Protocol

Material: イネ培養細胞 (4xMyc tag)

- 1, 培養細胞 1g を液体窒素でよく冷やした乳鉢と乳棒でパウダー状になるまで、時々液体窒素を加えながら破砕する。
- 2, 10ml の抽出液を加えて、15ml ファルコンチューブに移す。Rotary shaker で 4°C、30min 回転混合する（バッファーが凍らないなら、乳鉢内に加えてさらにすりつぶしてもよい）。
- 3, 15ml ファルコンチューブに移す。
- 4, 10,000rpm, 4°C、15min 遠心する。
- 5, 上澄みを新しい 15ml ファルコンチューブに移す。
- 6, 15,000rpm, 4°C、15min 遠心する。
- 7, 上清を 0.45 $\mu$ m のフィルターに通して、新しい 15ml ファルコンチューブに移す。
- 8, 各サンプルの濃度を測定して、総タンパク質量を等しくする。

- 9, 0.5~2.0mg/ml の抽出液に対して、50  $\mu$ l の Protein G beads (Protein G sepharose 4 Fast Flow; GE healthcare)を加える。Rotary shaker で1h、4°Cで回転混合する。これにより、Protein G beads への非特異的吸着を除く。
- 10, 2000rpm、4°Cで2min遠心した後、上清を新しい15mlファルコンチューブに移す。Anti-myc antibody (mouse monoclonal ; nacalai) 4  $\mu$ gを加えた後、rotary shaker で1~16h、4°Cで回転混合する。
- 11, さらに50  $\mu$ l の Protein G beads を加えて、rotary shaker で2h、4°Cで回転混合する。
- 12, 2000rpm、4°Cで2min遠心した後、上清を捨てる。
- 13, Protein G beads に良く冷やした洗浄バッファー10mlを加えた後、軽く手で攪拌してbeadsを拡散させる。2000rpm、4°Cで2min遠心した後、上清を捨てる。この操作をさらに2回行う。
- 14, 上清をすべて取り除いたbeadsに、50  $\mu$ l の溶出バッファーを加える。  
Rotary shaker で2h、4°Cで回転混合する。
- 15, 2000rpm、4°Cで2min遠心して上清をエッペンチューブに移す（精製サン

プル)。

\*免疫沈降産物を SDS-PAGE にかける (非変性かつ溶出サンプルに IgG が含まれても問題ない場合) 時は、50  $\mu$ l の 2 $\times$ SDS Sample buffer を加え 95 $^{\circ}$ C、5min ボイルして、SDS-PAGE してもよい。

#### 抽出バッファー

---

- 25mM Tris-HCl (pH7.5)
  - 1mM EDTA (pH7.5)
  - 10mM MgCl<sub>2</sub>
  - 10% sucrose
  - 150mM NaCl
  - 10% PolyclarVT (Wako)
  - Complete EDTA-free, protease inhibitor cocktail tablets (Roche) 1tablet/50ml
  - 1.0% NP-40
- 

#### 洗浄バッファー

---

- 25mM Tris-HCl (pH7.5)
  - 1mM EDTA (pH7.5)
  - 10mM MgCl<sub>2</sub>
  - 10% sucrose
  - 150mM NaCl
  - 10% PolyclarVT (Wako)
  - 1.0% NP-40
- 

#### 溶出バッファー

---

50mM Tris-HCl (pH7.5)

150mM NaCl

0.5mg/ml myc peptide (Santa Cruz Biotechnology)

---