

StrepII-tag Purification Protocol

Modified Mr. Masaki Nishikiori' protocol

問い合わせは

農業生物資源研究所、植物・微生物間相互作用研究ユニット、

石川雅之研究室

可溶性画分にあるタンパク質の精製法

*すべての作業は 4°Cで行う。

Material: タバコ BY-2 細胞 20ml (packed cell volume, pcv)

細胞抽出液の調整

- 1, 細胞壁ありの BY-2 細胞をプロトプラストにする (約 10ml pcv)
- 2, 脱液胞化プロトプラストにする (約 1ml pcv)。脱液胞化プロトプラストの方法は reference を参照。
- 3, 脱液胞化プロトプラストを 4 倍量の破砕 buffer を加えて、ダウンスホモジナイザー(加圧型細胞破砕装置)で破砕する。

- 4, 800g, 4°C、10min 遠心して上清を得る（除核）。
- 5, 15,000g, 4°C、10min 遠心して上清を得る（生体膜成分を除去）。この段階で細胞抽出液は約 3ml 弱（濃度 10mg/ml）調整できる。

可溶性タンパク質の精製

- 1, Strep-tactin sepharose 200µl (IBA 社製；代理店フナコシ)に wash buffer を加えてレジンを混ぜた後、500g, 1min で遠心してレジンを沈殿させる。
上清を捨てて wash buffer を加える。この作業を計 3 回行う。（レジンの平衡化）
- 2, 細胞抽出液を 1 のレジンと合わせた後、ロータリーシェーカーで 2 時間、4°Cで振とうする。
- 3, 2 を 500g, 1min で遠心してレジンを沈殿させた後、上清を除去する。
- 4, Wash buffer を 1ml 加えてレジンと混ぜた後、500g, 1min で遠心してレジンを沈殿させて上清を除去する。この作業を計 5 回繰り返す。
- 5, 400µl の 2.5mM desthiobiotin (IBA 社)を含む wash buffer をレジンに加えて混ぜる。

6, 10min 氷上でインキュベートした後、500g, 1min で遠心して上清を精製画
分とする。

Buffer

破碎 buffer

30mM Hepes-KOH, pH7.4
80mM KOAc
1.8mM MgOAc
2mM DTT
Complete-mini EDTA free (1 tablet for 10ml; Roche)

Washing buffer

30mM Hepes-KOH, pH7.4
150mM NaCl
80mM KOAc
1mM MgOAc
0.1mM DTT
0.2% Lysophosphatidylcholine (detergent)
*5% Lysophosphatidylcholine (和光)ストックを調整しておく。
Lysophosphatidylcholine は 40℃で数分温めて溶解させる。

Reference

K. Ishibashi, K. Komoda, and M. Ishikawa. 2006. In vitro translation and replication of tobamovirus RNA in a cell-free extract of evacuated tobacco BY-2 protoplasts, p. 183-194. In T. Nagata, K. Matsuoka, and D. Inze (ed.), *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 58. Tobacco BY-2 cells: from cellular dynamics to omics. Springer, Berlin, Germany