

TAPa Purification Protocol (Small Scale)

Rubio et al, Plant J. 2005 参照

Material: 約 0.4g seedlings/sample

*液体窒素ですりつぶす以外は、作業はすべて 4°Cで行う

- 1, 乳鉢（液体窒素使用）で seedlings をすりつぶす。
- 2, 400ul の cold protein extraction buffer を加えて、さらにすりつぶす。
- 3, 1.5ml エッペンに移す。
- 4, 15,000rpm, 4°C、10min 遠心。
- 5, sup を新しいエッペンに移す。
- 6, 15,000rpm, 4°C、5min 遠心。
- 7, sup を 0.22um のフィルターに通して、新しいエッペンに移す。
- 8, 各サンプルの濃度を測定して、total protein を同じにする。
- 9, cold protein extraction buffer で volume を 1ml に調整する。20ul をコントロール (total extract) としてとっておく。
- 10, 200ul の IgG beads (IgG sepharose 6 Fast Flow; GE healthcare)をサンプルに加えて、rotary shaker で 2h、4°Cインキュベートする。
- 11, 1,000rpm、4°C、2min 遠心して、上清を除去する。上清 20ul をコントロール (total extract after IgG beads) としてとっておく。
- 12, 1ml の cold 1SB を加えて、上下に軽く混ぜる。
- 13, 1,000rpm、4°C、2min 遠心して、上清を除去する。
- 14, 1SB での wash をさらに 2 回行う。
- 15, 1ml の cold 2SB を加えて、上下に軽く混ぜる。
- 16, 1,000rpm、4°C、2min 遠心して、上清を除去する。
- 17, 1ml の cold 2SB と 20ul の 3C protease (Prescission protease; GE healthcare)を加えて、rotary shaker で 2h、4°Cインキュベートする。
- 18, 1,000rpm、4°C、2min 遠心して、上清を 5-10ml チューブ(15ml ファルコンでも良い)に取る。
- 19, beads を 1ml の cold 1SB で再懸濁して、1,000rpm、4°C、2min 遠心する。上清を 18 で集めた上清と合わせる。100ul をコントロール (sup after 3C

- protease) として取っておく。
- 20, 5ml Econocolumns (BioRad)の下にコックを取り付ける。200ul Ni-NTA resin (QIAGEN)をカラムに入れて His beads カラムを調整する (サンプル数分用意する)。Cold room で 5ml の cold 1SB で resin を洗う。20-23 の操作中 Resin は枯らさないように。
 - 21, カラムにサンプルをアプライして、コックで流速を調節しながらゆっくりと流す。Flow through を取っておく。
 - 22, flowthrough をさらに 2 回カラムに通す。最後の flowthrough をコントロールとして 100ul 取っておく (flowthrough fraction after Ni-NTA)。
 - 23, 5ml cold His beads washing solution をカラムにアプライして、カラムを洗う (計 3 回)。それぞれの flowthrough をコントロールとして取っておく (washing solution)。
 - 24, 2ml cold His beads elution solution をカラムにアプライして、流速をコックで調節しながら、ゆっくりとタンパク質を溶出する。
 - 25, サンプルとコントロール (total extract と total extract after IgG beads 以外) を濃縮して、一部を SDS-PSGE してチェックする。Anti-myc antibody でウエスタンできる。

Buffer

Protein Extraction Buffer

- 50mM Tris-HCl, pH 7 to 8 (depending on your protein)
- 150mM NaCl
- 0.1% NP-40
- 1mM PMSF
- 1x Complete EDTA-free (Roche)

First Step Buffer (1SB)

- 50mM Tris-HCl, pH 7 to 8 (depending on your protein)
- 150mM NaCl
- 0.1% NP-40

Second Step Buffer (2SB)

50mM Tris-HCl, pH 7 to 8 (depending on your protein)

150mM NaCl

0.1% NP-40

1mM DTT

His Beads Washing Buffer

50mM Tris-HCl, pH 7 to 8 (depending on your protein)

150 to 500 mM NaCl (depending on the desired protein purity)

0.1% NP-40

10% Glycerol

His Beads Elution Buffer

50mM Tris-HCl, pH 7 to 8 (depending on your protein)

150mM NaCl

0.1% NP-40

10% Glycerol

0.1M Imidazol

Reference:

Rubio V et al (2005) An alternative tandem affinity purification atrategy applied to Arabidopsis protein complex isolation. *Plant J.* 41, 767-78.