

Flag Purification Protocol (Middle scale)

Material: 約 2.5g 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, 7ml の cold extraction buffer を加えて、さらにすりつぶす。Buffer が少なそうならば、さらに 1-2ml 加えても良い。
- 3, 15ml ファルコンに移す。
- 4, 10,000rpm, 4°C、10min 遠心。
- 5, sup を新しいファルコンに移す。
- 6, 10,000rpm, 4°C、15min 遠心。
- 7, sup を 0.8um のフィルターに通して、新しいファルコンに移す（低温室で行う）。50ul をコントロール（total extract）としてとっておく。
- 8, 各サンプルの濃度を測定して、total protein を同じにする（volume の多いサンプルと同じ volume になるように cold extraction buffer で調整）。
- 9, 100-125ul の glycine buffer で前処理した Flag beads (Anti-FLAG M2 affinity gel freezer-safe; Sigma)をサンプルに加えて、rotary shaker で 3h、4°Cインキュベートする。
- 11, 500g、4°C、1 sec 遠心して、上清を除去する。上清 50ul をコントロール（total extract after Flag beads）としてとっておく。
- 12, 5ml の cold washing buffer を加えて、上下に軽く混ぜる。
- 13, 500g、4°C、1 sec 遠心して、上清を除去する。
- 14, 5ml の cold washing buffer を加えて、上下に軽く混ぜる。rotary shaker で 10min、4°Cインキュベートする。
- 15, 500g、4°C、1 sec 遠心して、上清を除去する。
- 16, 14-15 の wash をさらに 2 回繰り返す。
- 17, 1ml の cold washing buffer で beads を 1.5ml エッペンに移す。24ul (final 100ug/ml)の 3xFlag peptides (5mg/ml stock) (Sigma)を加えて、rotary shaker で O/N、4°Cでインキュベートする（溶出）。
- 18, 1,000rpm、4°C、5min 遠心して、beads を取らないように注意しながら上

清を新しいエッペンに移す。

- 19, beads に 200ul の cold washing buffer を加えて、上下に軽く混ぜる。18 と同様に遠心して、上清を 18 で集めた上清と合わせる（精製サンプル）。
- 20, 精製サンプルをアセトンで濃縮して SDS 化する。コントロール（total extract と total extract after Flag beads）は濃縮しないで、そのまま 10ug/lane くらいになるように SDS 化する。精製サンプルの一部とコントロールを SDS-PSGE してチェックする。Anti-flag antibody (Anti-FLAG M2 antibody; Sigma) でウエスタンできる。

Flag beads の前処理

* flag beads を glycine buffer 中に 20min 以上置くと beads が使えなくなる (beads に bind している flag 抗体が失活する) ので、速やかに操作する。

* 操作は室温でかまわない。

- 1, エッペンに 200-250ul（液体を含まない beads の volume）の flag beads（Anti-FLAG M2 affinity gel freezer-safe; Sigma）を取る（サンプル数分用意）。
- 2, 1ml の glycine buffer を加えて、上下に軽く混ぜる。
- 3, 1,000rpm, 4°C、3 min 遠心して、上清を除去する。
- 4, 1ml の glycine buffer を加えて、上下に軽く混ぜる。
- 5, 1,000rpm, 4°C、3 min 遠心して、上清を除去する。
- 6, 1ml 1xPBS を加えて、上下に軽く混ぜる。
- 7, 1,000rpm, 4°C、3 min 遠心して、上清を除去する。
- 8, 6-7 をさらに 2 回繰り返して、pH を中性に戻す。1xPBS に懸濁しておけば、1 週間くらいは 4°C で保存できる。
- 9, 1ml の Extraction buffer を加えて、上下に軽く混ぜる（Washing buffer に置換する）。
- 10, 1,000rpm, 4°C、5min 遠心して、上清を除去する。
- 11, 9-10 の操作を再度繰り返す。
- 12, ビーズと等量の Washing buffer を加えて、氷上で冷やしておく。

Buffer

Extraction Buffer (20ml for 2 samples)

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

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

0.1% NP-40

10% Glycerol

1x Complete (Roche)

(1 tablet for 50ml, 1 tablet of Complete mini for 10ml)

Washing buffer (60ml for 2 samples)

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

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

0.1% NP-40

10% Glycerol

Glycine buffer (6ml for 2 samples)

100mM glycine-HCl, pH3.5

1xPBS (6ml for 2 samples)