

Myc-tag Purification Protocol

Modified Mr. Yusuke Kawaguchi's protocol

(問い合わせは島本研 or 植物ユニット藤原へ)

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碎する。
- 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ l の 2×SDS Sample buffer を加え 95°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 MgCl₂
 - 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 MgCl₂
 - 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)
