

免疫沈降法

- 1) 遠心分離により得た P3 画分に homogenize buffer の 1/10 量の solubilize buffer を加え、Dounce type homogenizer を使い (40 strokes) 十分に懸濁した後、静かに攪拌 (40 min, 3/4 rpm, 4 ℃)
- 2) 超遠心により、未破碎画分を沈殿させる (200,000 g, 30 min, 4 ℃)
- 3) 上清を分取し、タンパク質濃度を 2 mg/ml に調整する。(total vol.:200 μ l)
- 4) Protein A Sepharose (10-20 μ l) を加え、静かに攪拌 (1- hr, 3/4 rpm, 4 ℃)
- 5) 抗体 (抗体/タンパク質 : 15- μ g/1,500 μ g) を加え、静かに攪拌 (1- hr, 3/4 rpm, 4 ℃)
- 6) Protein A Sepharose (10-20 μ l) を加え、静かに攪拌 (1- hr, 3/4 rpm, 4 ℃)
- 7) 洗浄 (軽いボルテックスなら可) 5 回洗浄した後、新しいチューブへ樹脂を移す。
- 8) 洗浄 (軽いボルテックスなら可) さらに 5 回同様に洗浄する。最後の洗浄は final wash buffer で行う。
- 9) Sample buffer (30- μ l) を入れ boil (3 min)

Solubilize buffer

20 mM Tris (pH 7.5)
0.32 M Sucrose
0.15 M NaCl
1.0% digitonin

Wash buffer

20 mM Tris (pH 7.5)
0.32 M Sucrose
0.15 M NaCl
0.1% digitonin

Final wash buffer

20 mM Tris (pH 7.5)
0.32 M Sucrose
0.15 M NaCl

参考文献

- a. タンパク実験プロトコール (pp.151-157)
- b. 分子間相互作用解析ハンドブック (pp.40-44)
- c. タンパク実験ハンドブック (pp.47-52, 234-238)