

Immuno-precipitation (IP) of *S.pombe*

by Miho Yamane

ここでは Bqt1、Bqt2、Rap1 の免疫沈降を行った際の方法を記載していますが、免疫沈降の cell extract を調整する際の Buffer 等は、実験の目的に応じて検討して下さい。

準備：マルチビーズショッカーの電源を入れて冷やしておく（1時間必要）

必要分のマルチビーズショッカー用チューブにビーズ（チューブの7割程度）を入れておく

用事調整の試薬（DTT、PMSF を調整する）

水、バッファーを調整し、冷やしておく

・ YES、EMM2 等目的に応じた 100ml の培養液にて $3\sim 6 \times 10^6$ cells / ml まで培養する

Option* タンパク質の分解が気になる場合は集菌する前に PMSF 処理を行う

PMSF 処理：0.2M PMSF (in DMSO 用事調整)を 10ml 培養液あたり $25 \mu\text{l}$ 添加し、そのまま 10min 培養を続ける（今回の場合は 100ml 培養液なので $250 \mu\text{l}$ の PMSF 溶液を添加）

- ・ 3×10^8 cells 相当量を 3000rpm、5min.遠心して回収する
- ・ 細胞を 1ml の ice-cold H_2O にて懸濁し、エッペンチューブにうつす（以下の操作は全て氷上にて）
- ・ 10000rpm (4°C)にて短時間スピンドウンし、上澄をとりのぞく
- ・ 細胞を $100 \mu\text{l}$ の HB300K (25mM MOPS, 5mM EGTA, 15mM MgCl_2 , 0.8% NP40, 300mM KCl, 1mMDTT*, 1mM PMSF*, *は使用前添加) に懸濁する
- ・ グラスビーズを入れたマルチビーズショッカー用のチューブに懸濁液をうつす
- ・ マルチビーズショッカーにて細胞を破砕する 2700rpm, 60sec. x 3 cycle
- ・ チューブの底に注射針で穴を開けて、キャップを少しゆるめた状態でエッペンドルフチューブと 2 段重ねし、3000rpm, 1min., 4°C にて遠心
- ・ 上段のチューブ（マルチビーズショッカー用チューブ）に $100 \mu\text{l}$ の HB0K (25mM MOPS, 5mM EGTA, 15mM MgCl_2 , 0.8% NP40, 1mMDTT*, 1mM PMSF*, *は使用前添加) を加え再度 3000rpm, 3min., 4°C にて遠心
- ・ 上段チューブを捨て、下段のエッペンチューブのみを遠心 15000rpm, 15min., 4°C
- ・ 上澄（cell extract）を新しいチューブに回収し、protein assay を行いタンパク質濃度を測定する

- 4mg 相当量の cell extract を新しいチューブにとりわけ、HB150K (KCl 濃度が 150mM) を加えて total の液量を 200 μ l にする。ここから input 用に 4 μ l (60 μ g 相当) をとりわけておく。
- HB150K にて平衡化した 50% slurry proteinG ビーズを 20 μ l 加え 4°C で 1 時間回転混和する (この操作により、ビーズに非特異的に吸着するものを除く)
- 12000rpm, 20sec., 4°C にて遠心し、上澄を新しいチューブにうつす
- 抗体を添加する
 - Anti-GFP JL8 の場合、2 μ l
 - Anti-myc 9E10 の場合、5 μ l
 - Anti-HA 3F10 の場合、5 μ l
- 4°C で 1 時間回転混和する
- HB150K にて平衡化した 50% proteinG を 20 μ l 加え 4°C で 1 時間回転混和する
- 5000rpm, 20sec., 4°C にて遠心し、上澄みを除く (必要であれば、免疫沈降の効率を調べるために残しておいて一緒に SDS-PAGE に流すとよい)
- ビーズを 500 μ l の HB150 にて 4 回洗浄する
- 15 μ l の 2 x sample buffer を加えて 98°C 5 分間ボイル (input 用に取り分けたサンプルも一緒に処理する)
- 15000rpm, 1min., 4°C にて遠心し、上澄を SDS-PAGE を行う