

無細胞くんのタンパク質発現確認 (SDS-PAGE) のための前処理方法: アセトン沈殿法

無細胞くんの反応液には、高分子量のポリエチレングリコール(PEG)が含まれ、そのままSDS-PAGE等電気泳動に使用しますと、泳動を乱れてしまいます。予め下記に示した方法でPEGの除去を行った上で、電気泳動を行ってください。



反応終了後、氷上に置いて反応を終了させます。無細胞くんSIの場合は、透析内液を新しいチューブに回収し、氷上に置きます。

冷蔵保存しておいた未反応の反応液(ネガティブコントロール)を取り出し、氷上に置きます。

STEP 2

① 全画分

27μLのMilliQ水の入った全画分用のチューブに反応液をそれぞれ3μLを加えます。



STEP 1

全画分用



可溶性画分用



新しいチューブにMilliQ水 27μLを加えます。

* 全画分と可溶性画分用の2種類をご用意ください。サンプル数が多い場合は、8連ストラップチューブやプレートを使用すると便利です。サンプルが少ない場合は、0.6mLのマイクロチューブなどをご使用ください。

STEP 3

② 可溶性画分

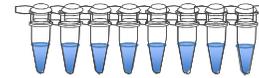
27μLのMilliQ水の入った全画分用のチューブに反応液をそれぞれ3μLを加えます。



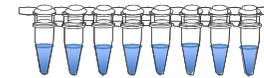
SDS-PAGEの結果ができるまで冷蔵で保存頂くか、他の分析等にご使用ください。

* 発現したタンパク質が沈殿している場合があります。遠心分離した溶液は、沈殿を含め、捨てずに氷上で保存してください。長時間保存される場合は、発現タンパク質を精製後保存されることをお勧めいたします。

① 全画分



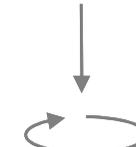
② 可溶性画分



STEP 4

反応液をそれぞれ3μL加えた全画分①と上清画分②のチューブに氷冷アセトンを60μL加えます。

よく混合し、氷上で10分間氷冷します。



12,000 rpmで10分間、4°Cで遠心分離します。

注) アセトンを使用される場合は、換気の良い、ドラフト内等で作業してください。

上清

沈殿(タンパク質画分)

沈殿をアルミブロックヒーターまたはサーマルサイクラー等で60°C、10-20分間乾燥させます。

* 完全に乾固させると溶解し難くなる場合があります。

1×SDSサンプルバッファーをそれぞれに30μL加えます。

* 非還元でのSDS-PAGEには、還元剤を含まないサンプルバッファーをご使用ください。

熱変性後、2-5μL/ウェルを目安としてSDS-PAGE用のゲルにアプライします。