

蛋白の限定分解後のアクチン結合部位の決定

白尾智明

01.8.16

Stock Solution

1 mg/ml α -chymotrypsin
skeletal actin (2 ~ 10 mg/ml)

Working Sloution

40 μ g/ml α -chymotrypsin in 水 (ロットにより異なるので注意)
saturated PMSF solution in DMSO (5mM程度) freshly made

前準備

ドレブリン溶液の濃縮：セントリコンにより濃縮する

0 水で予備洗いする必要はない

1 トミ-4 Nローター (50 ml 用) で 5000 回転 30 分

2 逆さまにして 5000 回転 3 分で回収

この操作により 1.5 ml 程度の溶液が 50 μ l から 150 μ l 程度にまで濃縮される。

ドレブリンはセントリコンに付着する危険性はないようである。

本操作

- 1 ドレブリン (約 25 μ g) (ゲル濾過後なの 0.1 M NaCl になっている) in 40 μ l + 1 μ l of α -chymotripsin
- 2 37 °C、20 分 インキュベート
- 3 PMSF (5mM) 1 μ l を加えて反応を停止する。
- 4 最終濃度 0.5 mg/ml になるようにアクチンを加える。
- 5 20 分、室温で インキュベートする。
- 6 airfuge
- 7 上清と沈澱画分の電気泳動 (全量を 4 レーン \times 2 で流す) (12% ゲル)
- 8 セミドライプロッター (日本エイドー) 20 ボルト、30 分 (これ以上だと焦げる)
- 9 P V D F 膜を蒸留水で良く洗う (15 分 \times 4 回)
- 10 C B B 染色 (さっと) 後、50% エタノールで脱色
- 11 きれいなビニール袋に入れて高木さんに送る。